



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

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

(11)



1-0047806

(51)⁷ A61K 48/00

(13) B

(21) 1-2017-03726

(22) 19/02/2016

(86) PCT/GB2016/050419 19/02/2016

(87) WO/2016/135457 01/09/2016

(30) 1503008.3 23/02/2015 GB

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/05/2018 362A

(73) UCL Business Ltd (GB)

University College London, Gower Street, London, England, WC1E 6BT, United Kingdom

(72) RIZZI, Matteo (IT); ALI, Robin (GB); SMITH, Alexander (NL); NISHIGUCHI, Koji (JP).

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

(54) VECTƠ VIRUT KẾT HỢP ADENO (AAV) CHỨA AXIT NUCLEIC MÃ HÓA SẢN PHẨM GEN NHẠY SÁNG VÀ/HOẶC ĐIỀU BIẾN QUÁ TRÌNH TRUYỀN TÍN HIỆU NHẠY SÁNG NỘI SINH, TẾ BÀO CHỦ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VECTƠ NÀY

(21) 1-2017-03726

(57) Sáng chế đề cập đến đến vectơ liệu pháp gen để cải thiện thị lực bằng cách đưa axit nucleic mã hóa sản phẩm gen nhạy sáng vào tế bào thụ cảm quang học hình que khỏe mạnh của bệnh nhân bị loạn chức năng và/hoặc thoái hóa thụ cảm quang học tế bào hình nón và/hoặc điều biến quá trình truyền tín hiệu nhạy sáng nội sinh trong tế bào thụ cảm quang học, sao cho phạm vi cường độ ánh sáng mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng được mở rộng và/hoặc tốc độ tại đó mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng với ánh sáng được tăng. Sáng chế còn đề cập đến catxet biểu hiện chứa axit nucleic, vectơ chứa catxet biểu hiện và tế bào chủ chứa vectơ như được nêu trong bản mô tả.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các vectơ liệu pháp gen để cải thiện thị lực của bệnh nhân.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ở nhiều loài động vật có vú bao gồm chuột và người, số lượng các thụ cảm quang học tế bào hình que điều tiết thị lực dưới ánh sáng mờ lớn hơn nhiều so với số lượng các thụ cảm quang học tế bào hình nón (Curcio et al, 2000). Tuy nhiên, trong thế giới công nghiệp hóa nơi sự chiếu sáng cho phép các tế bào hình nón hoạt động trong suốt cả ngày, thị lực được điều tiết bởi tế bào hình que ít quan trọng hơn. Nhiều bệnh nhân không có chức năng của tế bào hình que từ khi sinh ra chỉ được nhận biết một cách tình cờ, và trong thực tế không thể nhận ra được thị lực bất thường của họ (Dryja, 2000). Ngược lại, khi sự rối loạn chức năng tế bào hình nón xảy ra, các bệnh nhân thường có triệu chứng và thường bị khuyết tật về thị lực phụ thuộc vào mức độ rối loạn chức năng tế bào hình nón của họ. Tuy nhiên, trong một số điều kiện, chỉ (hoặc phần lớn) các tế bào hình nón bị mất đi hoặc bị rối loạn chức năng, còn các tế bào hình que vẫn được bảo toàn một cách tương đối. Ví dụ, chứng mù màu là chứng loạn dưỡng võng mạc di truyền nghiêm trọng hoàn toàn thiếu vắng chức năng của tế bào hình nón từ khi sinh ra, nhưng có thể là vẫn có chức năng của tế bào hình que bình thường (Hess et al, 1986; Nishiguchi et al, 2005). Các đột biến trong nhiều gen bao gồm *CNGA3* (Kohl et al 1998) và *PDE6C* (Chang et al, 2009; Thiadens et al, 2009) có liên quan đến bệnh này. Mỗi trong số các gen gây bệnh này mã hóa thành phần chủ yếu của thác chuyển đổi quang học ở tế bào hình nón mà chuyển hóa ánh sáng thành tín hiệu điện bằng cách gây ra quá trình tăng phân cực của tế bào thụ cảm quang học. Ở bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), sự suy giảm thị lực chủ yếu là do sự thoái hóa của hố mắt giàu tế bào hình nón ở điểm trung tâm. Do đó, các bệnh nhân này mất thị lực trung tâm và độ tinh của mắt, nhưng thường có điểm ngoại biên được bảo toàn tương đối tốt, và nhờ đó còn lại đôi chút thị lực hữu ích mà bị giới hạn bởi lượng tế bào hình nón thiếu hụt bên ngoài hố mắt.

Các tế bào hình que rất nhạy sáng, cho phép chúng có thể cảm nhận được lượng ánh sáng nhỏ trong điều kiện mờ. Ngược lại, các tế bào hình nón ít nhạy hơn, nhưng có khả năng xử lý lượng ánh sáng lớn và liên tục truyền tín hiệu thị giác trong ánh sáng ban ngày. Sự khác biệt về mặt chức năng này một phần là do tác dụng của bộ máy bất hoạt sự truyền tín hiệu quang học, là phức hợp GTPaza bao gồm RGS9, R9AP (còn được gọi là RGS9BP) và Gβ5. RGS9 là thành phần xúc tác mà thủy phân GTP ghép cặp với protein G, trong khi R9AP và Gβ5 là các cấu trúc siêu phân tử cơ định thiết yếu (Burns et al, 2009; Burns et al, 2010). Quan trọng là, R9AP gắn phức hợp này vào màng đĩa tại vùng bên ngoài của thụ cảm quang học, nơi mà sự truyền tín hiệu chuyển đổi quang học cũng diễn ra (Baseler et al, 2002). Sự biểu hiện của R9AP quyết định mức của phức hợp GTPaza sao cho RGS9 bất kỳ tạo ra lượng dư R9AP đều có thể bị phân giải nhanh chóng (Martyemyanov et al, 2009). Sự biểu hiện quá của R9AP ở các tế bào hình que của chuột đủ để làm tăng hoạt tính GTPaza và để về cơ bản là đẩy nhanh động học làm bất hoạt của chúng, như được chứng minh bằng các giá trị ghi tế bào đơn lẻ (Krispel et al, 2006). Ở các tế bào hình nón, sự biểu hiện của RGS9 được ước tính là cao hơn khoảng 10 lần so với sự biểu hiện ở các tế bào hình que (Cowan et al, 1998; Zhang et al, 2003). Điều này tạo cơ sở cho khả năng khôi phục nhanh chóng của các tế bào hình nón từ việc tiếp xúc với ánh sáng, và nhờ đó duy trì chức năng đối với tác nhân kích thích ánh sáng liên tục. Nó cũng cho phép các tế bào hình nón đáp ứng với sự kích thích nhanh hơn. Thật vậy, về phương diện lâm sàng, các bệnh nhân có sự bất hoạt dòng thác chuyển đổi quang học bị trì hoãn gây ra bởi các thiếu sót di truyền trong *RGS9* hoặc *R9AP*, hoặc chứng mất thích nghi chậm (bradyopsia), bị suy yếu đáng kể về thị lực được điều tiết bởi tế bào hình nón, bao gồm chứng mù vào ban ngày và khả năng nhìn vật chuyển động giảm (Nishiguchi et al, 2004; Michaelides et al, 2010). Trong khi đó, thị lực được điều tiết bởi tế bào hình que ít bị ảnh hưởng bởi đột biến giống như vậy.

Một số tình trạng bệnh thoái hóa điểm vàng, như bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD) và tình trạng bệnh thoái hóa điểm vàng do di truyền cũng biểu hiện sự loạn chức năng tế bào hình nón nhưng chức năng của tế bào hình que vẫn bình thường hoặc ít bị suy yếu. Bệnh thoái hóa điểm vàng là nguyên nhân hàng đầu gây mù lòa ở các nước phát triển, và vì tỷ lệ mắc bệnh tăng gấp bốn lần trong mỗi thập kỷ của cuộc đời, ca AMD dự kiến sẽ tăng trong những năm tới khi tuổi thọ tăng. Các thuốc dùng để điều trị AMD đã chiếm hơn 1% của tổng ngân sách cho thuốc của Dịch vụ y tế Quốc gia của

Vương quốc Anh (UK's National Health Service). Mặc dù các bệnh nhân mắc bệnh AMD tiến triển có thể được rèn luyện để cố định tập trung bên ngoài hố mắt, nhưng tỷ lệ làm mới thấp và ngưỡng mất màu thấp của các tế bào hình que hạn chế chất lượng của thị lực thu được.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Bằng cách sử dụng chuột không có chức năng của tế bào hình nón, các tác giả sáng chế đã chứng minh rằng sự biểu hiện quá được điều tiết bởi AAV của protein neo bám Rgs9 (R9AP), một thành phần quan trọng của phức hợp GTPaza mà điều tiết việc bất hoạt dòng thác chuyển đổi quang học, dẫn đến sự mất nhạy và “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của điện võng mạc đồ được điều khiển bởi tế bào hình que. Việc điều trị cho phép các tế bào hình que đáp ứng với ánh sáng chói hơn (lên đến khoảng 2,0 log) so với các tế bào không được điều trị, nhưng phải đánh đổi chức năng dạ thị (mức độ ánh sáng thấp hơn). Các phép đo bằng mảng đa điện cực sử dụng các võng mạc được điều trị cho thấy rằng các tế bào hạch võng mạc cũng thể hiện “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của các tế bào hình que, bằng việc thể hiện các đáp ứng phân cấp ở các mức độ ánh sáng thích ứng. Chức năng nhạy tương phản được đo bằng cách định lượng số chuyển động theo dõi đầu để đáp ứng với các cách tử hình sin chuyển động quay cho thấy sự cải thiện về độ nhạy lên đến 25 lần trong điều kiện ánh sáng trong phòng và đáp ứng nhanh hơn với tác nhân kích thích lặp lại. Hơn nữa, phép đo hóa sinh đối với các mức rodopsin có thể mất màu ở các con chuột này chỉ ra rằng chu kỳ thị giác không làm giới hạn chức năng của tế bào hình que.

Các tác giả sáng chế cũng đề xuất bơm proton được điều khiển bởi ánh sáng nhanh, ArchT (Han et al, 2011) trong thụ cảm quang học tế bào hình que. Các hạt AAV8 mang ArchT-EGFP dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu rodopsin (Rho) được tiêm dưới võng mạc ở chuột trưởng thành. Sự biểu hiện của Rho-ArchT-EGFP được giới hạn ở màng của thụ cảm quang học tế bào hình que. Sự biểu hiện của ArchT cho phép các đáp ứng ánh sáng cực nhanh, trong khi đáp ứng của tế bào hình que nội tại được bảo toàn và tương đương với đáp ứng quan sát thấy ở thụ cảm quang học tế bào hình que không chuyển hóa. Nhìn chung, sự biểu hiện ArchT không làm thay đổi khả năng của thụ cảm quang học tế bào hình que trong việc đáp ứng với tác nhân kích thích dạ thị, mà việc này tạo ra khả năng bổ sung để đáp ứng với các đáp ứng không mất màu nhanh đối với các mức độ chiếu sáng cao hơn. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng các tế

bào hình que được chuyển hóa chắc chắn là có thể duy trì việc truyền nhanh “giống tế bào hình nón” này, trong đó các tế bào hình que biểu hiện ArchT điều khiển sự tăng đột ngột của tế bào hạch võng mạc (RGC) duy trì ở cường độ ánh sáng cao và ở tần số xấp xỉ tần số của thụ cảm quang học tế bào hình nón. Sự biểu hiện của Rho-ArchT-EGFP ở chuột CNGA3^{-/-} và PDE6C^{-/-} mất thị lực được điều tiết bởi tế bào hình nón cũng mở rộng độ nhạy của các con chuột này đối với tác nhân kích thích ánh sáng chói và đem lại khả năng nhìn nhanh cho các con chuột này. Tần số tối đa của tác nhân kích thích mà chuột biểu hiện ArchT có thể theo được là tương tự với tần số của thụ cảm quang học tế bào hình nón.

Cùng với nhau, các kết quả này cho thấy rằng, sau khi tải nạp tế bào hình que khỏe mạnh bằng gen mã hóa protein nhạy sáng đặc trưng của tế bào hình nón hoặc gen mã hóa phân tử mà làm tăng tốc độ của cơ chế truyền tín hiệu tế bào hình que nội sinh, các tế bào hình que vận hành giống như các tế bào hình nón hơn, và do đó có thể bù đắp cho sự loạn chức năng tế bào hình nón. Điều này gợi ý đến phương pháp điều trị nhiều loại rối loạn thị lực trong đó chức năng của tế bào hình nón bị giảm, nhưng vẫn còn ít nhất là một số tế bào hình que khỏe mạnh. Điều này trái ngược với các phương pháp tiếp cận trước đây (Busskamp et al, 2010; Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2012258530), trong đó mục tiêu là nhằm phục hồi chức năng bị mất ở các tế bào hình nón. Việc thay đổi chức năng của các tế bào hình que theo cách thức theo sáng chế có ưu điểm ở chỗ là các tình trạng bệnh trong đó các tế bào hình nón bị loạn chức năng nhưng có thể sửa chữa được (ví dụ trong giai đoạn đầu của chứng thoái hóa võng mạc khi chức năng của thụ cảm quang học bị mất nhưng synap lưỡng cực đối với thụ cảm quang học có thể vẫn còn nguyên vẹn) là hiếm, trong khi các tình trạng bệnh trong đó sự loạn chức năng tế bào hình nón là nghiêm trọng hoặc tiến triển và không thể sửa chữa được, hoặc các tế bào hình nón bị mất hoàn toàn nhưng vẫn còn ít nhất là một số thụ cảm quang học tế bào hình que khỏe mạnh, là phổ biến (xem ở trên). Ngoài ra, sáng chế cho phép tạo ra ‘hồ mắt giả’, là vùng nhỏ chứa các tế bào hình que giống tế bào hình nón mà sẽ cải thiện thị lực trong các tình trạng bệnh trong đó các tế bào hình nón trong hồ mắt bị mất hoặc loạn chức năng.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất vectơ chứa axit nucleic mã hóa sản phẩm gen nhạy sáng và/hoặc điều biến quá trình truyền tín hiệu nhạy sáng nội sinh trong tế bào thụ cảm quang học, để sử dụng trong phương pháp cải thiện thị lực của bệnh nhân

bị loạn chức năng và/hoặc bị thoái hóa thụ cảm quang học tế bào hình nón bằng cách đưa axit nucleic này vào các thụ cảm quang học tế bào hình que khỏe mạnh trong võng mạc của bệnh nhân và biểu hiện sản phẩm gen này ở đó, sao cho phạm vi cường độ ánh sáng mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng được mở rộng và/hoặc tốc độ mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng với ánh sáng được làm tăng lên.

Sáng chế cũng đề cập đến vector như nêu trên, tế bào chủ chứa vector này và phương pháp điều trị được thực hiện nhờ vector này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Sự biểu hiện của ArchT ở thụ cảm quang học tế bào hình que tạo ra các dòng được điều khiển bởi ánh sáng nhanh.

(a) Các bảng bên trên: sự chuyển hóa ArchT-EGFP được điều tiết bởi AAV8 (màu xanh lá, xem bảng bên trái) dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu rodopsin. Không quan sát thấy sự chồng lấp với các tế bào hình nón (màu tím: arrestin tế bào hình nón, xem bảng giữa, màu trắng: DAPI, xem bảng bên phải). Các bảng bên dưới: tính đặc hiệu của sự biểu hiện cũng có thể được quan sát thấy ở cấp độ synap. (b) ArchT-EGFP được khu trú ở màng của thụ cảm quang học tế bào hình que, bao gồm các vùng bên trong và bên ngoài. (c) Việc định lượng sự phát huỳnh quang ở các đầu cuối của tế bào hình que biểu hiện ArchT-EGFP (màu xanh lá, đỉnh bên trái) và các đầu cuối của tế bào hình nón dương tính arrestin tế bào hình nón (màu tím, đỉnh bên phải) cho thấy hai dải khác biệt tương ứng với lớp dưới nơi mà các synap của tế bào hình que và tế bào hình nón khu trú một cách tương ứng ($n=22$). (d) Giá trị ghi tế bào đơn lẻ thu được từ các thể tế bào của thụ cảm quang học tế bào hình que biểu hiện ArchT. Các dòng được điều tiết bởi quá trình chuyển đổi quang học ở tế bào hình que nội tại (đường bên trên) để đáp ứng với các xung ánh sáng 10 ms 530nm (màu xanh lá, xem các thanh dọc) được bảo toàn. Các dòng được tạo ra bởi ArchT nhanh hơn (đường bên dưới). Khung tỷ lệ: (a) các bảng bên trên: 50 μ m; (a) các bảng bên dưới và (b): 10 μ m.

Fig.2: Sự biểu hiện ArchT điều khiển các đáp ứng tần số cao ở các tế bào hình que và sự truyền nhanh đến các tế bào hạch võng mạc.

(a) Các dòng được gây ra bởi ánh sáng ở tế bào hình que nội tại trong võng mạc C57BL6 không được tiêm. (b) Các dòng được điều tiết bởi ArchT có thể tuân theo các tần số kích thích cao hơn nhiều. (c) Các đáp ứng được khóa thời gian đối với việc trình

diện tác nhân kích thích (các thanh dọc màu xanh lá). (d) Các tế bào hình que biểu hiện ArchT đáp ứng với sự kích thích bằng tần số lên đến 80 Hz mà không dao động, trong khi các đáp ứng của tế bào hình que nội tại giảm xuống ở tần số khoảng 20 Hz. (e) Dữ liệu tóm tắt cho thấy rằng sự biểu hiện ArchT không làm thay đổi đáp ứng nội tại của thụ cảm quang học tế bào hình que, trong khi các đáp ứng ArchT bắt đầu ở mức độ ánh sáng chói hơn. (f) Các giá trị ghi của mảng đa điện cực thu được từ võng mạc biểu hiện PDE6C^{-/-} ArchT. Các đáp ứng tế bào hình que nội tại không tạo ra được sự tăng đột ngột chắc chắn của tế bào hạch võng mạc ở tần số cao hơn 20 Hz. Ngược lại, việc hoạt hóa tế bào hình que được điều tiết bởi ArchT điều khiển sự tăng nhanh đột ngột của các tế bào hạch võng mạc đến mức độ tương đương với thụ cảm quang học tế bào hình nón.

Fig.3: Sự hoạt hóa tế bào hình que được điều tiết bởi ArchT điều khiển đáp ứng hành vi đối với tác nhân kích thích cường độ ánh sáng cao và nhanh.

(a) Các bảng bên trên: sơ đồ về hành vi lo sợ có điều kiện. Nói ngắn gọn, tác nhân kích thích thị lực được kết nối với tác nhân gây sốc. Sau 24 giờ, hành vi ngừng hoạt động được thử nghiệm trong một bối cảnh mới. Các bảng bên dưới: chuột CNGA3^{-/-} và PDE6C^{-/-} không được tiêm thất bại trong việc học hỏi nhiệm vụ (cặp thanh bên trái trong mỗi đồ thị). Tuy nhiên, sự hiệu hiện ArchT điều khiển thành công hành vi ngừng hoạt động ở chuột (cặp thanh bên phải trong mỗi đồ thị). (b) Phép thử vận mắt. Chuột biểu hiện ArchT có thể theo được tác nhân kích thích ở các tần số tương đương với các tần số mà tế bào hình nón có thể theo được một cách đáng tin cậy.

Fig.4: Sự biểu hiện quá của R9AP được điều tiết bởi AAV ở các tế bào hình que và sự bất hoạt sóng a được tăng tốc ở chuột *Cnga3*^{-/-}.

A. Sự biểu hiện RGS9 được tăng ở mắt của chuột *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng rRAAV2/8.Rho.mR9ap. Sự biểu hiện quá của R9AP dẫn đến tính phản ứng miễn dịch tăng đối với RGS9 (màu đỏ) xuyên suốt lớp thụ cảm quang học ở mắt được điều trị (trái) so với mắt không được điều trị (phải). Phương pháp thẩm tách Western cho thấy sự biểu hiện của RGS9 tăng cả ở võng mạc và biểu mô sắc tố võng mạc (RPE) ở mắt biểu hiện quá R9AP (bên dưới). Một lượng nhỏ protein RGS9 cũng được phát hiện trong RPE của mắt được điều trị. Điều này có thể phản ánh “hiệu ứng lan tỏa” của protein dư thừa trong màng đĩa bị thực bào. Khung tỷ lệ thể hiện 25 μ m.

B. Tốc độ phục hồi biên độ sóng a tăng ở mắt *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng

rAAV2/8.Rho.mR9ap và rAAV2/8.CMV.mR9ap. Các đường ERG đại diện đối với chớp sáng thăm dò (đường màu đen, xem các đường có đỉnh nằm giữa của khoảng thời gian) và đối với chớp sáng thứ hai (đường màu đỏ) hiện diện trong khoảng thời gian giữa các tác nhân kích thích (inter-stimulus interval) (ISI) là 2 giây từ mắt được điều trị (bên trên) và mắt không được điều trị (bên dưới) từ cùng con vật. Lưu ý rằng chớp sáng thứ hai tạo ra sóng a nhỏ (mũi tên) có thể nhìn thấy được rõ ràng ở mắt được điều trị, trong khi sóng a không thể nhìn thấy được (mũi tên) ở mắt còn lại không được điều trị. Đồ thị về sự phục hồi sóng a tại các ISI khác nhau ở mắt được điều trị và mắt không được điều trị. Mắt được tiêm rAAV2/8.CMV.mR9ap ($n = 5$) hoặc rAAV2/8.Rho.mR9ap ($n = 7$) có động học phục hồi nhanh hơn mắt không được điều trị ($n = 5$) mà có thể nhìn thấy rõ nhất với các ISI ngắn hơn. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học. OE: sự biểu hiện quá.

Fig.5: Sự đạt được chức năng thích ứng ánh sáng bởi các tế bào hình que thông qua việc biểu hiện quá R9AP ở chuột *Cnga3*^{-/-}.

A. Sự tăng ngưỡng đáp ứng và sự thay đổi thích ứng ánh sáng của các ERG 6Hz thông qua việc biểu hiện quá R9AP ở các tế bào hình que của chuột *Cnga3*^{-/-}. Các đường ERG 6Hz đại diện từ chuột *Cnga3*^{-/-} trong đó một mắt được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap và mắt còn lại không được điều trị (bảng bên trên). Các đường ERG được sắp hàng từ các đáp ứng đối với chớp sáng mờ nhất ($-6,0 \log \text{cd.s/m}^2$) đến chớp sáng chói nhất ($2,0 \log \text{cd.s/m}^2$; dưới cùng) từ trên xuống dưới ở bước $0,5 \log \text{cd.s/m}^2$. Lưu ý rằng cường độ chớp sáng có ngưỡng thấp hơn tại đó các đáp ứng xuất hiện được tăng, kết hợp với ngưỡng đáp ứng tăng đối với chớp sáng chói nhất. Điều này dẫn đến “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của chức năng võng mạc ở mắt được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap. Tóm tắt các kết quả của ERG 6Hz chứng minh cho sự thay đổi thích ứng ánh sáng của chức năng võng mạc sau khi điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap hoặc rAAV2/8.Rho.mR9ap (bảng bên dưới). Các đáp ứng ERG từ chuột *Gnat1*^{-/-} không có chức năng của tế bào hình que thể hiện chức năng được điều tiết bởi tế bào hình nón. Trong khi đó, các đáp ứng từ chuột C57BL6 được thu từ cả thụ cảm quang học tế bào hình que và hình nón. Dữ liệu được trình bày dưới dạng % biên độ so với đáp ứng tối đa và được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học. ERG được ghi lại từ chuột *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap (*Cnga3*^{-/-} CMV.R9ap; $N = 8$), chuột *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng

rAAV2/8.Rho.mR9ap (*Cnga3*^{-/-} Rho.R9ap; N = 6), chuột *Cnga3*^{-/-} không được điều trị (*Cnga3*^{-/-} không được điều trị; N = 8), chuột *Gnat1*^{-/-} không được điều trị (*Gnat1*^{-/-} không được điều trị; N = 6), và chuột C57BL6 không được điều trị (C57BL6 không được điều trị; N = 6)

B. Các đáp ứng của võng mạc tăng đối với chớp sáng dài ở mắt của chuột *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap. Hình chữ nhật trống biểu thị khoảng thời gian của chớp sáng. Lưu ý rằng ở mắt được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap, các đáp ứng có thể phát hiện được với việc tăng thời gian kích thích ánh sáng. Ngược lại, mắt đối bên không được điều trị thể hiện rất ít hoặc không có đáp ứng khi được ghi lại đồng thời ở các điều kiện giống nhau.

C. Sự đạt được chức năng võng mạc trong điều kiện thích ứng ánh sáng ở mắt của chuột *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap. Lưu ý rằng mắt được điều trị thể hiện các đáp ứng trong các điều kiện ghi thích ứng ánh sáng (ánh sáng nền trắng 20 cd/m²), trong khi mắt đối bên không được điều trị được ghi lại đồng thời vẫn không đáp ứng.

Fig.6: Sự truyền hiệu quả tín hiệu thụ cảm quang học được thay đổi đến các tế bào lưỡng cực trong mắt biểu hiện quá R9AP

A. Các đường ERG đại diện. ERG được ghi lại sau khi tiêm rAAV2/8.CMV.mR9ap (đường màu đỏ, đường bên dưới) ở chuột *Cnga3*^{-/-} bằng cách sử dụng chớp sáng bão hòa (1,9 log cd.s/m²). Mắt đối bên đóng vai trò làm đối chứng không được điều trị (đường màu đen, đường bên trên).

B. Sự hoạt hóa bị trì hoãn của các tế bào lưỡng cực đối với chớp sáng. Thời gian ẩn của sóng a và sóng b được đo từ đáp ứng ERG đối với chớp sáng bão hòa (1,9 log cd.s/m²) ở mắt được điều trị và mắt không được điều trị.

C. Đường cong đáp ứng cường độ đối với các biên độ sóng a và sóng b được ghi lại từ chuột *Cnga3*^{-/-} (N=5) với một mắt được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap (đường cong màu đỏ) và mắt còn lại không được điều trị (đường cong màu đen). Tất cả dữ liệu đều được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học. OE: sự biểu hiện quá.

Fig.7: Sự đạt được cảm nhận về thị giác duy trì sau khi biểu hiện quá R9AP ở chuột *Cnga3*^{-/-}.

A. Chức năng nhảy tương phản cải thiện đo được bằng các đáp ứng chuyển động mắt. Ở chuột *Cnga3*^{-/-} được điều trị bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap ở mắt trái, chức năng nhảy tương phản (CSF) được đo theo cách khác nhau cho các chuyển động theo dõi đầu theo chiều kim đồng hồ (đại diện cho mắt trái được điều trị) và ngược chiều kim đồng hồ (đại diện cho mắt phải không được điều trị) dựa với các cách tử hình sin. CSF đối với mắt được điều trị (đường cong màu đỏ) tốt hơn so với CSF đối với mắt không được điều trị (đường cong màu xanh lam), CSF này tương tự với CFS đối với chuột *Cnga3*^{-/-} không được điều trị (đường cong màu đen; giá trị trung bình của cả hai mắt). Lưu ý rằng CSF đối với mắt được điều trị là tương đương, nếu không phải là tốt hơn một chút, với CSF của các đối chứng kiểu đại không được điều trị (màu xanh lá; giá trị trung bình của cả hai mắt). N= 5 đối với tất cả các nhóm. Tất cả dữ liệu đều được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học. OE: sự biểu hiện quá.

B. Mức rodopsin được duy trì sau khi tiếp xúc kéo dài với thử nghiệm Optomotry. Giá trị ghi đại diện của độ hấp thụ quang học của mẫu mắt sử dụng thiết bị đo quang phổ quét (bảng bên trái trong ô vuông vẽ bằng vạch đứt màu xanh lá). Việc trừ đi độ hấp thụ của các mẫu mắt đo được sau khi mất màu quang học hoàn toàn (đường màu xanh lam, đường trên cùng nằm trong khoảng từ 300 đến 400nm) từ độ hấp thụ của các mẫu mắt đo được trước khi mất màu quang học hoàn toàn (đường màu đỏ) cho thấy λ_{min} đạt đỉnh ở khoảng 380 nm tương ứng với sản phẩm quang học được giải phóng cùng với λ_{max} đạt đỉnh ở khoảng 500 nm đại diện cho lượng rodopsin có thể mất màu được trong mẫu (bảng bên phải trong ô vuông vẽ bằng vạch đứt màu xanh lá). Tốc độ mất màu rodopsin được đánh giá bằng cách đo phổ khác biệt (λ_{max}) ở mắt giãn hoàn toàn được điều trị hoặc không được điều trị bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap ở chuột *Cnga3*^{-/-} sau 5 phút tiếp xúc với ánh sáng trắng 7,0 mW (dưới cùng bên trái; giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học). Mức rodopsin cũng được đo sau khi cho chuột *Cnga3*^{-/-} tiếp xúc với thử nghiệm Optomotry lên đến 120 phút (dưới cùng bên phải; N=3 tại mỗi thời điểm) sau khi tiêm một bên bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap. Vùng màu xám biểu thị mức rodopsin (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn) được ghi lại từ chuột *Cnga3*^{-/-} không được điều trị (N=8) sau khi thích nghi với bóng tối qua đêm. Đường chấm thể hiện giá trị trung bình. Lưu ý rằng mức rodopsin vẫn ổn định trong ít nhất 2 giờ ở cả mắt được

điều trị bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap và mắt không được điều trị của chuột *Cnga3*^{-/-}. Dữ liệu với thanh sai số được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học.

Fig.8: Việc biểu hiện quá R9AP làm tăng tốc độ phục hồi của đáp ứng quang học của tế bào hình que ở chuột *Pde6c*^{-/-}.

Hệ số thời gian (σ) để phục hồi 50% của biên độ sóng a được làm giảm khoảng 50% ở mắt của chuột *Pde6c*^{-/-} được tiêm rAAV2/8.CMV.mR9ap ($\sigma = \sim 5,75$ giây) so với mắt đối bên không được điều trị ($\sigma = \sim 11,46$ giây), phù hợp với việc làm bất hoạt tăng tốc sự chuyển đổi quang học sau khi điều trị. N = 6. Dữ liệu với thanh sai số được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học.

Fig.9: Sự biểu hiện quá R9AP dẫn đến “thay đổi thích ứng ánh sáng” của đường cong cường độ-đáp ứng ở chuột *Pde6c*^{-/-}.

Mắt được tiêm rAAV2/8.CMV.mR9ap cho thấy sự thay đổi thích ứng ánh sáng của các đáp ứng ERG 6 Hz đối với cường độ chớp sáng gia tăng so với mắt đối bên không được điều trị ở chuột *Pde6c*^{-/-} (N = 6). Dữ liệu được trình bày dưới dạng % biên độ so với đáp ứng tối đa và được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học.

Fig.10: Tác dụng duy trì của sự biểu hiện quá R9AP mà không có bằng chứng rõ ràng về sự thoái hóa võng mạc tại thời điểm 5 tháng sau khi tiêm rAAV2/8.CMV.mR9ap ở chuột *Cnga3*^{-/-}.

Profin đáp ứng được chuẩn hóa theo biên độ tối đa khẳng định sự có mặt của “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của đường cong cường độ-đáp ứng với các chớp sáng 6Hz (đồ thị trên cùng). Dữ liệu tương tự nhưng không được chuẩn hóa cho thấy không có bằng chứng về sự giảm biên độ ở mắt được điều trị (đồ thị dưới cùng). N = 5. Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học.

Fig.11: Điều trị cho chuột kiểu đại bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap cho thấy không có tác dụng rõ ràng đối với đường cong cường độ-đáp ứng ERG 6 Hz.

Mắt được điều trị bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap cho thấy không có sự thay đổi trong đường cong cường độ-đáp ứng ERG 6 Hz so với đường cong cường độ-đáp ứng ERG 6

Hz của mắt đối bên không được điều trị ở chuột C57BL6 (N = 5). Dữ liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học.

Fig.12: Không đạt được cảm nhận về thị giác sau khi biểu hiện quá R9AP ở chuột C57BL6.

Ở chuột C57BL6 được điều trị bằng rAAV2/8.Rho.mR9ap chỉ ở mắt trái, chức năng nhảy tương phản (CSF) được đo theo cách khác nhau về các chuyển động theo dõi đầu theo chiều kim đồng hồ (đại diện cho mắt trái được điều trị) và ngược chiều kim đồng hồ (đại diện cho mắt phải không được điều trị) đối với các cách tử hình sin chuyển động quay. CSF đối với cả mắt được điều trị (đường cong màu hồng) và mắt không được điều trị (đường cong màu xanh dương) cho thấy các kết quả tương tự, các kết quả này tương tự với các kết quả đối với chuột C57BL6 không được điều trị (đường cong màu xanh lá; giá trị trung bình của cả hai mắt). N= 5 đối với tất cả các nhóm. Tất cả dữ liệu đều được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học. OE: sự biểu hiện quá.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vector theo sáng chế chứa axit nucleic mà sự biểu hiện của nó để tạo ra sản phẩm gen, thường là protein, mà sẽ thực hiện việc điều trị tình trạng bệnh về mắt như được mô tả ở đây, được liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu để tạo thành catxet biểu hiện.

Axit nucleic và sản phẩm gen

Vector theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa sản phẩm gen nhạy sáng và/hoặc điều biến quá trình truyền tín hiệu nhạy sáng nội sinh ở tế bào thụ cảm quang học và làm cho tế bào hình que được tải nạp với axit nucleic theo sáng chế vận hành giống như tế bào hình nón bằng cách mở rộng phạm vi cường độ ánh sáng mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng và/hoặc làm tăng tốc độ mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng với ánh sáng. Do đó, bản thân protein này có thể là protein nhạy sáng trực tiếp, ví dụ nó có thể thay đổi độ dẫn màng ở các tế bào hình que theo cách tạo ra sự tăng phân cực (dòng điện đi ra ngoài) khi kích thích ánh sáng. Protein này sẽ, ví dụ, là protein màng ghép cặp với G đóng mở bằng ánh sáng hoặc nhạy sáng, kênh ion, bơm ion hoặc yếu tố vận chuyển ion. Protein nhạy sáng được ưu tiên bao gồm ArchT, Jaws (cruxhalorodopsin) (Chuong et al, 2014) và iC1C2. Theo cách khác, bản thân protein

này không thể nhạy sáng trực tiếp nhưng có thể gián tiếp điều biến quá trình truyền tín hiệu nhạy sáng nội sinh ở tế bào thụ cảm quang học tế bào hình que. Ví dụ về protein này là các thành phần của phức hợp RGS9, đặc biệt là R9AP (còn được gọi là RGS9BP), và Gβ5. Theo cách khác, axit nucleic có thể mã hóa sản phẩm gen khác bất kỳ mà làm tăng tốc độ của cơ chế truyền tín hiệu tế bào hình que nội sinh. Trong tất cả các trường hợp này, trình tự có thể mã hóa protein kiểu đại hoặc thể đột biến hoặc biến thể hoặc dạng được cắt ngắn mà vẫn giữ được hoạt tính của protein kiểu đại. Axit nucleic cũng có thể được tối ưu hóa codon để biểu hiện ở kiểu tế bào đích.

Sau khi biểu hiện sản phẩm gen, các tế bào hình que sẽ thể hiện sự điều biến mạnh hơn và/hoặc nhanh hơn đối với tác nhân kích thích ánh sáng so với các tế bào hình que không tải nạp, ở cường độ cao hơn cường độ bình thường. Các ví dụ bao gồm cường độ điều biến được cải thiện và/hoặc động học kích hoạt/bất hoạt nhanh hơn. Do đó, các tế bào hình que được tải nạp theo sáng chế sẽ phản ứng mạnh hơn và/hoặc nhanh hơn đối với sự chiếu sáng trong vùng sáng trung gian và/hoặc vùng thích ứng ánh sáng so với các tế bào hình que không được tải nạp. Tốt hơn là, đáp ứng của các tế bào hình que đối với điều kiện chiếu sáng dạn thị không bị ảnh hưởng hoặc không bị ảnh hưởng đáng kể, nghĩa là các tế bào hình que đạt được khả năng đáp ứng mạnh hơn và/hoặc nhanh hơn đối với ánh sáng chói hơn mà không bị mất khả năng đáp ứng với ánh sáng mờ.

Trình tự khởi đầu và các yếu tố điều hòa khác

Trong cấu trúc biểu hiện, axit nucleic mã hóa sản phẩm gen thường được liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu. Trình tự khởi đầu có thể là cơ định nhưng tốt hơn là trình tự khởi đầu đặc hiệu thụ cảm quang học hoặc ưu tiên thụ cảm quang học, tốt hơn nữa là trình tự khởi đầu đặc hiệu tế bào hình que hoặc ưu tiên tế bào hình que như rodopsin (Rho), trình tự khởi đầu protein khóa kéo leuxin đặc hiệu võng mạc thần kinh (NRL) hoặc phosphodiesteraza 6B (PDE6B). Trình tự khởi đầu được đưa vào catxet biểu hiện có thể có chiều dài bất kỳ miễn là có hiệu quả trong việc điều khiển sự biểu hiện sản phẩm gen, tốt hơn là sự biểu hiện đặc hiệu thụ cảm quang học hoặc ưu tiên thụ cảm quang học hoặc sự biểu hiện đặc hiệu tế bào hình que hoặc ưu tiên tế bào hình que.

Trình tự khởi đầu đặc hiệu thụ cảm quang học có nghĩa là trình tự khởi đầu điều khiển sự biểu hiện chỉ ở hoặc gần như là chỉ ở thụ cảm quang học, ví dụ vùng mà điều khiển sự biểu hiện ở thụ cảm quang học mạnh hơn ít nhất 100 lần so với ở kiểu tế bào

khác bất kỳ. Trình tự khởi đầu đặc hiệu tế bào hình que có nghĩa là trình tự khởi đầu điều khiển sự biểu hiện chỉ ở hoặc gần như là chỉ ở thụ cảm quang học, ví dụ vùng mà điều khiển sự biểu hiện ở thụ cảm quang học mạnh hơn ít nhất 100 lần so với ở kiểu tế bào khác bất kỳ, bao gồm tế bào hình nón. Trình tự khởi đầu ưu tiên thụ cảm quang học có nghĩa là trình tự khởi đầu ưu tiên biểu hiện ở thụ cảm quang học nhưng cũng có thể điều khiển sự biểu hiện ở một mức độ nhất định ở các mô khác, ví dụ vùng mà điều khiển sự biểu hiện ở thụ cảm quang học mạnh hơn ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc ít nhất 50 lần so với ở kiểu tế bào bất kỳ khác. Trình tự khởi đầu ưu tiên tế bào hình que có nghĩa là trình tự khởi đầu ưu tiên điều khiển sự biểu hiện ở thụ cảm quang học nhưng cũng có thể điều khiển sự biểu hiện ở một mức độ nhất định ở các mô khác, ví dụ vùng mà điều khiển sự biểu hiện ở thụ cảm quang học mạnh hơn ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 20 lần, hoặc ít nhất 50 lần so với ở kiểu tế bào khác bất kỳ, bao gồm tế bào hình nón.

Một hoặc nhiều yếu tố điều hòa khác, như yếu tố tăng cường, cũng có thể có mặt cũng như trình tự khởi đầu.

Vector

Vector theo sáng chế có thể thuộc loại bất kỳ, ví dụ nó có thể là vector plasmid hoặc ADN vòng nhỏ.

Tuy nhiên, thông thường, vector theo sáng chế là vector virus. Vector virus có thể, ví dụ, được dựa trên virus herpes simplex, adenovirus hoặc lentivirus. Vector virus có thể là vector virus kết hợp adeno (AAV) hoặc dẫn xuất của nó. Dẫn xuất của vector virus có thể là dẫn xuất dạng khảm, được xáo trộn hoặc được cải biến capsit.

Vector virus có thể chứa hệ gen AAV từ kiểu huyết thanh có nguồn gốc tự nhiên, nhóm cô lập hoặc nhóm nhánh của AAV. Kiểu huyết thanh này có thể, ví dụ, là AAV2, AAV5 hoặc AAV8.

Nhìn chung, hiệu quả của liệu pháp gen phụ thuộc vào việc vận chuyển đầy đủ và hiệu quả của ADN được truyền. Quá trình này thường được điều tiết bởi vector virus. Virus kết hợp adeno (AAV), một thành viên của họ parvovirus, thường được sử dụng trong liệu pháp gen. AAV kiểu đại, chứa các gen của virus, chèn vật liệu thuộc hệ gen của chúng vào nhiễm sắc thể 19 của tế bào chủ. Hệ gen ADN sợi đơn của AAV chứa

hai đoạn lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR) và hai khung đọc mở, chứa các gen cấu trúc (cap) và đóng gói (rep).

Đối với mục đích trị liệu, các trình tự duy nhất được yêu cầu *in cis*, ngoài gen trị liệu, là ITR. Do đó, virus AAV được cải biến: các gen virus được lấy ra khỏi hệ gen, tạo ra AAV tái tổ hợp (rAAV). rAAV này chỉ chứa gen trị liệu, là hai ITR. Việc lấy các gen virus ra làm cho rAAV không có khả năng chủ động chèn hệ gen của nó vào ADN của tế bào chủ. Thay vào đó, hệ gen rAAV dung hợp thông qua các ITR, tạo thành cấu trúc thể bổ sung (episome) dạng vòng, hoặc chèn vào chỗ đứt nhiễm sắc thể có từ trước. Để tạo ra virus, các gen cấu trúc và đóng gói, giờ đã được lấy ra khỏi rAAV, được cung cấp ở dạng *trans*, ở dạng plasmit trợ giúp.

AAV là vector được quan tâm đặc biệt vì vector này nói chung không gây bệnh; đa số người bị nhiễm virus này trong suốt cuộc đời của họ mà không có tác dụng phụ.

Đặc quyền miễn dịch của mô mắt, kết quả của hàng rào giải phẫu và các yếu tố điều hòa miễn dịch, giúp cho mắt tránh được phần lớn các đáp ứng miễn dịch bất lợi mà có thể được gây ra ở các mô khác bởi AAV (Taylor 2009).

Vector AAV bị hạn chế bởi dung lượng đóng gói tương đối nhỏ khoảng 4,8kb và sự bắt đầu chậm việc biểu hiện sau khi chuyển hóa. Mặc dù có những hạn chế nhỏ, nhưng AAV vẫn là vector virus được sử dụng phổ biến nhất trong liệu pháp gen dùng cho võng mạc.

Hầu hết các cấu trúc vector đều được dựa trên kiểu huyết thanh AAV 2 (AAV2). AAV2 liên kết với các tế bào đích thông qua thụ thể proteoglycan sulphat heparin. Hệ gen AAV2, giống như hệ gen của tất cả các kiểu huyết thanh AAV, có thể được bao bọc trong nhiều protein capsit khác nhau. AAV2 có thể được đóng gói trong capsit AAV2 tự nhiên của nó (AAV2/2) hoặc nó có thể được tạo kiểu giả (pseudotype) với các capsit khác (ví dụ, hệ gen AAV2 trong capsit AAV1; AAV2/1, hệ gen AAV2 trong capsit AAV5; AAV2/5 và hệ gen AAV2 trong capsit AAV8; AAV2/8).

rAAV tải nạp vào các tế bào thông qua sự nhập bào được điều tiết bởi thụ thể đặc hiệu kiểu huyết thanh. Yếu tố chính ảnh hưởng tới động học của việc biểu hiện gen chuyển rAAV là tỷ lệ của hạt virus tháo vỏ bọc trong thể nhân. Về phần mình, điều này phụ thuộc vào kiểu capsit bao bọc vật liệu di truyền (Ibid.). Sau khi tháo vỏ bọc, hệ gen rAAV sợi đơn thẳng được làm ổn định bằng cách tạo ra phân tử sợi kép thông qua quá

trình tổng hợp *de novo* sợi hỗ trợ. Việc sử dụng ADN tự hỗ trợ có thể bỏ qua giai đoạn này bằng cách tạo ra ADN gen chuyển sợi kép. Natkunarajah và cộng sự (2008) đã phát hiện ra rằng việc biểu hiện gen AAV2/8 tự hỗ trợ có sự bắt đầu nhanh hơn và biên độ cao hơn, so với AAV2/8 sợi đơn. Do đó, bằng cách tránh thời gian trễ liên quan tới việc tổng hợp sợi thứ hai, mức độ biểu hiện gen được làm tăng lên so với sự biểu hiện gen chuyển từ cấu trúc sợi đơn tiêu chuẩn. Các nghiên cứu tiếp theo khảo sát tác động của ADN tự hỗ trợ ở các kiểu giả AAV khác (ví dụ AAV2/5) cũng tạo ra các kết quả tương tự. Một lưu ý đối với kỹ thuật này là, do AAV có dung lượng đóng gói khoảng 4,8kb, nên hệ gen tái tổ hợp tự hỗ trợ phải có kích thước phù hợp (nghĩa là 2,3kb hoặc nhỏ hơn).

Ngoài việc thay đổi dung lượng đóng gói, việc tạo kiểu giả hệ gen AAV2 với các capsit AAV khác còn có thể làm thay đổi đặc trưng của tế bào và động học của việc biểu hiện gen chuyển. AAV2/8 được báo cáo là chuyển đổi thụ cảm quang học hiệu quả hơn so với AAV2/2 hoặc AAV2/5 (Natkunarajah et al. 2008).

Do đó, vectơ theo sáng chế có thể chứa hệ gen virus kết hợp adeno (AAV) hoặc dẫn xuất của nó.

Hệ gen AAV là trình tự polynucleotit mã hóa các chức năng cần thiết cho việc tạo ra hạt virus AAV. Các chức năng này bao gồm các chức năng vận hành trong chu trình sao chép và đóng gói của AAV trong tế bào chủ, bao gồm quá trình capsit hóa hệ gen AAV thành hạt virus AAV. Virus AAV có trong tự nhiên không có khả năng sao chép và dựa vào sự cung cấp các chức năng trợ giúp ở dạng *trans* để hoàn thành chu trình sao chép và đóng gói. Theo đó và với việc loại bỏ tiếp các gen AAV *rep* và *cap*, hệ gen AAV của vectơ theo sáng chế không có khả năng sao chép.

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

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

Thông thường, các virus AAV được gọi theo kiểu huyết thanh của chúng. Kiểu huyết thanh tương ứng với các phân loài biến thể của AAV mà, nhờ vào protein biểu hiện kháng nguyên bề mặt capsit, có khả năng phản ứng đặc biệt mà có thể được sử dụng để phân biệt nó với các phân loài biến thể khác. Thông thường, virus có kiểu huyết thanh AAV cụ thể không phản ứng chéo một cách hiệu quả với kháng thể trung hòa đặc hiệu cho kiểu huyết thanh AAV khác bất kỳ. Các kiểu huyết thanh AAV bao gồm AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 và AAV11, cả các kiểu huyết thanh tái tổ hợp, như Rec2 và Rec3, gần đây đã được xác định từ não của động vật linh trưởng. Trong vector theo sáng chế, hệ gen có thể có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV bất kỳ. Capsit cũng có thể có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV bất kỳ. Hệ gen và capsit có thể có nguồn gốc từ cùng một kiểu huyết thanh hoặc từ các kiểu huyết thanh khác nhau.

Trong vector theo sáng chế, ưu tiên là hệ gen có nguồn gốc từ kiểu huyết thanh AAV 2 (AAV2), kiểu huyết thanh AAV 4 (AAV4), kiểu huyết thanh AAV 5 (AAV5) hoặc kiểu huyết thanh AAV 8 (AAV8). Ưu tiên nhất là hệ gen có nguồn gốc từ AAV2, nhưng các kiểu huyết thanh được quan tâm đặc biệt khác để sử dụng trong sáng chế bao gồm AAV4, AAV5 và AAV8, mà chuyển hóa hiệu quả mô trong mắt, như biểu mô sắc tố võng mạc. Ưu tiên là capsit có nguồn gốc từ AAV5 hoặc AAV8, đặc biệt là AAV8.

Các bài viết về các kiểu huyết thanh AAV có thể được tìm thấy trong tài liệu của Choi và cộng sự (*Curr gen Ther.* 2005; 5(3); 299-310) và Wu và cộng sự (*Molecular Therapy.* 2006; 14(3), 316-327). Các trình tự của hệ gen AAV hoặc của các yếu tố của hệ gen AAV bao gồm các trình tự ITR, các gen rep hoặc cap để sử dụng trong sáng chế có thể có nguồn gốc từ các số truy cập sau đây đối với các trình tự hệ gen AAV đầy đủ: Adeno-associated virus 1 NC_002077, AF063497; Adeno-associated virus 2 NC_001401; Adeno-associated virus 3 NC_001729; Adeno-associated virus 3B NC_001863; Adeno-associated virus 4 NC_001829; Adeno-associated virus 5 Y18065, AF085716; Adeno-associated virus 6 NC_001862; AAV gia cầm ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; AAV gia cầm chủng DA-1 NC_006263, AY629583; AAV bò NC_005889, AY388617.

Các virus AAV cũng có thể được gọi theo nhóm nhánh hoặc dòng vô tính. Điều này đề cập đến mối quan hệ phát sinh chủng loại của các virus AAV có nguồn gốc tự nhiên, và thường đề cập đến nhóm phát sinh chủng loại của các virus AAV mà có thể

được truy ngược trở lại đến tổ tiên chung, và bao gồm tất cả các đời sau của chúng. Ngoài ra, các virus AAV còn có thể được gọi theo nhóm cô lập đặc hiệu, nghĩa là nhóm cô lập di truyền của virus AAV đặc hiệu tìm thấy trong tự nhiên. Thuật ngữ “nhóm cô lập di truyền” mô tả quần thể virus AAV đã trải qua quá trình trộn gen có giới hạn với các virus AAV có trong tự nhiên khác, do đó xác định một quần thể khác biệt rõ rệt ở cấp độ di truyền.

Ví dụ về các nhóm nhánh và nhóm cô lập của AAV mà có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm:

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

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

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

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

Nhóm nhánh E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604, Hu37 AY530600, Rh40 AY530559, Rh2 AY243007, Bb1 AY243023, Bb2 AY243022, Rh10 AY243015, Hu17 AY530582, Hu6 AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pi1 AY530553, Pi3 AY530555,

Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rh61 AY530572, Rh52 AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rh1 AY530556

Nhóm nhánh F: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597, nhóm cô lập vô tính AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4 NC_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003/

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể lựa chọn kiểu huyết thanh, nhóm nhánh, dòng vô tính hoặc nhóm cô lập thích hợp của AAV để sử dụng trong sáng chế trên cơ sở kiến thức chung thông thường của họ. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng hệ gen AAV thuộc các kiểu huyết thanh khác mà có thể chưa được xác định hoặc mô tả đặc điểm. Kiểu huyết thanh AAV xác định tính đặc hiệu mô của sự lây nhiễm (hoặc tính hướng kích thích) của virus AAV. Theo đó, các kiểu huyết thanh AAV được ưu tiên để sử dụng trong virus AAV được sử dụng cho bệnh nhân theo sáng chế là các kiểu huyết thanh AAV có tính hướng kích thích tự nhiên hoặc có hiệu quả lây nhiễm thụ cảm quang học tế bào hình que cao.

Thông thường, hệ gen AAV thuộc kiểu huyết thanh hoặc nhóm cô lập hoặc nhóm nhánh có nguồn gốc tự nhiên của AAV chứa ít nhất một trình tự lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR). Vector theo sáng chế thường chứa hai ITR, tốt hơn là một ITR ở mỗi đầu của hệ gen. Trình tự ITR hoạt động ở dạng *cis* để tạo ra điểm khởi đầu sao chép chức năng, và cho phép kết hợp và cắt bỏ vector ra khỏi hệ gen của tế bào. Các trình tự ITR được ưu tiên là các trình tự của AAV2 và biến thể của nó. Hệ gen AAV thường chứa các gen đóng gói, như các gen *rep* và/hoặc *cap* mà mã hóa chức năng đóng gói cho hạt virus AAV. Gen *rep* mã hóa một hoặc nhiều protein Rep78, Rep68, Rep52 và Rep40 hoặc biến thể của nó. Gen *cap* mã hóa một hoặc nhiều protein capsit như VP1, VP2 và VP3 hoặc biến thể của chúng. Các protein này tạo thành capsit của hạt virus AAV. Biến thể của capsit được đề cập bên dưới.

Tốt hơn là, hệ gen AAV được tạo dẫn xuất nhằm mục đích sử dụng cho bệnh nhân. Việc tạo dẫn xuất này là tiêu chuẩn trong lĩnh vực này và sáng chế bao gồm việc sử dụng dẫn xuất đã biết bất kỳ của hệ gen AAV, và các dẫn xuất mà có thể được tạo ra

bằng cách áp dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Việc tạo dẫn xuất của hệ gen AAV và của capsit AAV được nêu trong, ví dụ, các tài liệu của Choi và cộng sự và Wu và cộng sự, được nhắc đến bên trên.

Các dẫn xuất của hệ gen AAV bao gồm dạng cắt ngắn hoặc dạng cải biến bất kỳ của hệ gen AAV mà cho phép sự biểu hiện của gen chuyển Rep-1 từ vector theo sáng chế *in vivo*. Thông thường, có thể cắt ngắn hệ gen AAV một cách đáng kể sao cho bao gồm trình tự virus tối thiểu nhưng vẫn giữ được chức năng nêu trên. Điều này được ưu tiên vì lý do an toàn để giảm thiểu nguy cơ của sự tái tổ hợp vector này với virus kiểu dại, và cũng để tránh sự khởi động đáp ứng miễn dịch tế bào bởi sự có mặt của protein gen virus trong tế bào đích.

Thông thường, dẫn xuất bao gồm ít nhất một trình tự lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR), tốt hơn là nhiều hơn một ITR, như hai ITR hoặc nhiều hơn. Một hoặc nhiều ITR có thể có nguồn gốc từ các hệ gen AAV có các kiểu huyết thanh khác, hoặc có thể là ITR dạng khảm hoặc ITR đột biến. ITR đột biến được ưu tiên là ITR có đột biến khuyết *trs* (terminal resolution site–vùng phân giải cuối). Đột biến khuyết này cho phép tiếp tục trình tự sao chép hệ gen để tạo ra hệ gen sợi đơn chứa cả trình tự mã hóa và trình tự hỗ trợ, nghĩa là hệ gen AAV tự hỗ trợ. Điều này cho phép bỏ qua việc sao chép ADN trong tế bào đích, và do đó có thể gia tăng việc biểu hiện gen chuyển.

Một hoặc nhiều ITR sẽ tốt hơn nếu kẹp bên sườn catxet cấu trúc biểu hiện chứa trình tự khởi đầu và gen chuyển theo sáng chế. Việc bao gồm một hoặc nhiều ITR được ưu tiên để hỗ trợ quá trình đóng gói của vector theo sáng chế vào các hạt virus. Theo các phương án ưu tiên, các yếu tố ITR sẽ là các trình tự duy nhất được giữ lại từ hệ gen AAV tự nhiên trong dẫn xuất. Do đó, dẫn xuất tốt hơn là không bao gồm các gen *rep* và/hoặc *cap* của hệ gen tự nhiên và các trình tự khác bất kỳ của hệ gen tự nhiên. Điều này được ưu tiên vì các lý do được nêu ở trên, và cũng để giảm bớt khả năng vector kết hợp vào hệ gen tế bào chủ. Ngoài ra, việc giảm kích thước của hệ gen AAV cho phép tăng tính linh động trong việc kết hợp các yếu tố trình tự khác (như các yếu tố điều hòa) vào vector ngoài gen chuyển.

Do đó, đối với hệ gen AAV2, các phần sau đây có thể bị loại ra trong dẫn xuất theo sáng chế: Một trình tự lặp đoạn cuối đảo ngược (ITR), gen sao chép (*rep*) và gen capsit (*cap*). Tuy nhiên, theo một vài phương án, bao gồm các phương án *in vitro*, các

dẫn xuất có thể còn bao gồm một hoặc nhiều các gen *rep* và/hoặc gen *cap* hoặc các trình tự hệ gen AAV của virus khác.

Dẫn xuất có thể là dẫn xuất dạng khảm, được xáo trộn hoặc được cải biến capsit của một hoặc nhiều virus AAV có trong tự nhiên. Sáng chế bao gồm việc cung cấp các trình tự protein capsit từ các kiểu huyết thanh, nhóm nhánh, dòng vô tính, hoặc nhóm cô lập khác nhau của AAV trong cùng một vector. Sáng chế bao gồm việc đóng gói hệ gen của một kiểu huyết thanh vào capsit của kiểu huyết thanh khác nghĩa là tạo kiểu giả.

Các dẫn xuất dạng khảm, được xáo trộn hoặc được cải biến capsit thường sẽ được chọn để tạo ra một hoặc nhiều chức năng mong muốn cho vector virus. Do đó, các dẫn xuất này có thể có hiệu quả chuyển gen tăng, tính sinh miễn dịch giảm (của thể dịch hoặc tế bào), khoảng hướng kích thích thay đổi và/hoặc khả năng nhắm đích kiểu tế bào cụ thể được cải thiện so với vector virus AAV chứa hệ gen AAV có trong tự nhiên, như hệ gen của AAV2. Hiệu quả chuyển gen tăng có thể được tác động nhờ việc liên kết thụ thể hoặc đồng thụ thể được cải thiện tại bề mặt tế bào, sự nhập bào được cải thiện, việc vận chuyển trong tế bào và vào nhân tế bào được cải thiện, việc cởi vỏ của hạt virus được cải thiện và quá trình chuyển hóa hệ gen sợi đơn thành dạng sợi kép được cải thiện. Hiệu quả tăng có thể cũng liên quan đến khoảng hướng kích thích hoặc việc nhắm đích quần thể tế bào cụ thể thay đổi, sao cho liều lượng vector không bị pha loãng khi sử dụng cho các mô nơi không cần đến.

Protein capsit dạng khảm bao gồm các protein capsit dạng khảm được tạo ra bằng việc tái tổ hợp giữa hai hoặc nhiều trình tự mã hóa capsit của các kiểu huyết thanh AAV có trong tự nhiên. Việc tái tổ hợp này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phương pháp giải cứu gen đánh dấu mà trong đó các trình tự capsit chưa gây nhiễm của một kiểu huyết thanh được đồng gây nhiễm bằng các trình tự capsit của kiểu huyết thanh khác, và việc lựa chọn có định hướng được sử dụng để chọn ra các trình tự capsit có các đặc tính mong muốn. Các trình tự capsit của các kiểu huyết thanh khác này có thể được thay đổi bằng việc tái tổ hợp tương đồng trong tế bào để tạo ra protein capsit dạng khảm mới.

Protein capsit dạng khảm cũng bao gồm các protein capsit dạng khảm được tạo ra bằng cách thiết kế các trình tự protein capsit để chuyển miền protein capsit cụ thể, vòng tròn bề mặt hoặc các gốc axit amin cụ thể giữa hai hoặc nhiều protein capsit, ví dụ giữa hai hoặc nhiều protein capsit của các kiểu huyết thanh khác nhau.

Protein capsit được xáo trộn hoặc dạng khảm cũng có thể tạo ra bằng cách xáo trộn ADN hoặc bằng PCR tạo lỗi ngẫu nhiên. Các gen capsit AAV lai có thể được tạo ra bằng cách phân đoạn ngẫu nhiên trình tự của các gen AAV liên quan, ví dụ các gen mã hóa các protein capsit của các kiểu huyết thanh khác nhau và sau đó lắp ráp lại các đoạn này trong phản ứng polymeraza tự mỗi, mà có thể cũng gây ra trao đổi chéo trong các vùng tương đồng trình tự. Thư viện gen AAV lai được tạo ra theo cách này bằng cách xáo trộn các gen capsit của một vài kiểu huyết thanh có thể được sàng lọc để xác định dòng virus có chức năng mong muốn. Tương tự, PCR tạo lỗi ngẫu nhiên có thể được sử dụng để gây đột biến ngẫu nhiên cho các gen capsit AAV để tạo ra thư viện đa dạng của các biến thể mà sau đó có thể được chọn lọc các đặc tính mong muốn.

Trình tự của các gen capsit cũng có thể được cải biến về mặt di truyền để đưa vào các đột biến khuyết, thay thế hoặc cài xen cụ thể đối với trình tự kiểu đại tự nhiên. Cụ thể là, các gen capsit có thể được cải biến bằng việc cài xen trình tự của protein hoặc peptit không liên quan vào trong khung đọc mở của trình tự mã hóa capsit, hoặc ở đầu tận cùng N và/hoặc C của trình tự mã hóa capsit.

Tốt hơn là, protein hoặc peptit không liên quan có thể là protein hoặc peptit hoạt động như phối tử đối với kiểu tế bào cụ thể, từ đó giúp cải thiện việc liên kết với tế bào đích hoặc cải thiện tính đặc hiệu của việc nhắm đích của vector đến quần thể tế bào cụ thể.

Protein không liên quan cũng có thể là protein hỗ trợ việc tinh chế hạt virus như là một phần của quy trình sản xuất nghĩa là epitop hoặc nhân ái lực. Vị trí của các đoạn cài xen thường sẽ được chọn để không can thiệp vào các chức năng khác của hạt virus ví dụ sự nhập bào, việc vận chuyển của hạt virus. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các vị trí cài xen thích hợp dựa trên kiến thức chung thông thường của họ. Các vị trí cụ thể được bộc lộ trong tài liệu của Choi và cộng sự, được tham khảo ở trên.

Sáng chế còn bao gồm việc đưa ra các trình tự của hệ gen AAV theo thứ tự và cấu trúc khác với thứ tự và cấu trúc của hệ gen AAV tự nhiên. Sáng chế cũng bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gen hoặc trình tự AAV bằng các trình tự từ virus khác hoặc bằng các gen khảm chứa các trình tự từ nhiều hơn một virus. Các gen khảm này có thể chứa các trình tự từ hai hoặc nhiều protein virus liên quan của các loài virus khác nhau.

Vector theo sáng chế có dạng vector virus bao gồm trình tự khởi đầu và cấu trúc biểu hiện theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề cập đến hạt virus AAV chứa vector theo sáng chế. Các hạt AAV theo sáng chế bao gồm các dạng chuyển capsit trong đó hệ gen AAV hoặc dẫn xuất có ITR của một kiểu huyết thanh được đóng gói trong capsit của kiểu huyết thanh khác nhau. Các hạt AAV theo sáng chế cũng bao gồm các dạng khảm trong đó hỗn hợp các protein capsit không cải biến từ hai hoặc nhiều các kiểu huyết thanh khác nhau tạo thành vỏ bao của virus. Hạt AAV cũng bao gồm các dạng cải biến hóa học mang các phối tử được hấp phụ lên bề mặt của capsit. Ví dụ, các phối tử này có thể bao gồm các kháng thể để nhắm đích thụ thể của bề mặt tế bào cụ thể.

Sáng chế còn đề cập đến tế bào chủ chứa vector hoặc hạt virus AAV theo sáng chế.

Vector theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để cung cấp các vector cho liệu pháp gen. Do đó, các phương pháp chuyển nhiễm miễn công khai, tinh chế và đóng gói đã được biết rõ có thể được sử dụng để tạo ra chế phẩm vector thích hợp.

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

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

Vector virus được đóng gói được đặc biệt ưu tiên để sử dụng trong sáng chế chứa hệ gen được tạo dẫn xuất của AAV2 kết hợp với protein capsit AAV5 hoặc AAV8.

Như được đề cập ở trên, các virus AAV không có khả năng sao chép và do đó các chức năng virus hỗ trợ, tốt hơn là các chức năng adenovirus hỗ trợ thường cũng sẽ được tạo ra trên một hoặc nhiều cấu trúc bổ sung để cho phép sao chép AAV.

Toàn bộ các cấu trúc bổ sung ở trên có thể được cung cấp làm plasmit hoặc các yếu tố episom khác trong tế bào chủ, hoặc theo cách khác là một hoặc nhiều cấu trúc có thể được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ.

Dược phẩm, liều dùng và phương pháp điều trị

Vector theo sáng chế có thể được bào chế theo công thức thành dược phẩm. Các dược phẩm này ngoài vector có thể bao gồm tá dược, chất mang, chất đệm, chất ổn định dược dụng hoặc các vật liệu khác đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật liệu này cần phải không gây độc và không can thiệp vào tính hiệu quả của thành phần hoạt tính. Bản chất chính xác của chất mang hoặc vật liệu khác có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này theo đường sử dụng, nghĩa là tiêm trực tiếp vào võng mạc, dưới võng mạc hoặc trong dịch kính.

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

Để tiêm tại vị trí bị đau, thành phần hoạt tính sẽ ở dạng dung dịch nước mà không có chất gây sốt và có độ pH, tính đẳng trương và tính ổn định thích hợp. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chế các dung dịch thích hợp bằng cách sử dụng, ví dụ, chất dẫn thuốc đẳng trương như dung dịch tiêm natri clorua, dung dịch tiêm Ringer, dung dịch tiêm Ringer lactat hóa, dung dịch Hartmann. Chất bảo quản, chất làm ổn định, chất đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc các chất phụ gia khác có thể được bao gồm, theo yêu cầu.

Đối với việc giải phóng chậm, vector có thể được bao gồm trong dược phẩm mà được bào chế để giải phóng chậm, như trong vi nang được tạo ra từ polyme tương hợp sinh học hoặc trong hệ thống chất mang liposom theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các vector và/hoặc được phẩm theo sáng chế có thể được đóng gói vào một bộ kit.

Nhìn chung, việc chuyển vector theo sáng chế trực tiếp vào võng mạc, dưới võng mạc hoặc trong dịch kính, thường bằng cách tiêm, được ưu tiên. Do đó, việc chuyển đến khoảng không của võng mạc, dưới võng mạc hoặc khoảng không trong dịch kính được ưu tiên. Các vector cũng có thể được đưa vào các thụ cảm quang học tế bào hình que *in vitro* bằng cách cấy ghép tế bào vào võng mạc.

Các vector và/hoặc được phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với liệu pháp bất kỳ khác để điều trị hoặc phòng ngừa sự rối loạn thị lực. Ví dụ, các vector hoặc được phẩm này có thể được sử dụng kết hợp với các phương pháp điều trị đã biết mà sử dụng chất đối kháng VEGF, ví dụ kháng thể kháng VEGF như Bevacizumab hoặc Ranibizumab hoặc chất đối kháng thụ thể hòa tan như Aflibercept, để điều trị AMD hoặc các rối loạn về mắt khác như được nêu trong bản mô tả này.

Liều dùng và chế độ liều có thể được xác định trong phạm vi kỹ năng bình thường của người làm nghề y để sử dụng được phẩm. Liều dùng của vector theo sáng chế có thể được xác định theo các thông số khác nhau, đặc biệt là theo độ tuổi, cân nặng và tình trạng của bệnh nhân được điều trị; đường dùng; và chế độ trị liệu yêu cầu. Một lần nữa, thầy thuốc sẽ có thể xác định đường dùng và liều dùng cần thiết cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ.

Liều đơn điển hình là khoảng từ 10^{10} đến 10^{12} hạt trong hệ gen, phụ thuộc vào số lượng mô võng mạc cần tải nạp. Hạt trong hệ gen được định nghĩa ở đây là capsit AAV chứa phân tử ADN sợi đơn mà có thể được định lượng bằng phương pháp đặc hiệu trình tự (như PCR thời gian thực). Liều này có thể được cung cấp dưới dạng liều đơn, nhưng có thể được lặp lại đối với mắt bên kia hoặc trong các trường hợp vector không thể nhắm đến vùng chính xác của võng mạc vì bất kỳ lý do gì (như biến chứng phẫu thuật). Tốt hơn nếu việc điều trị này là điều trị đơn trong thời gian dài cho mỗi mắt, nhưng tiêm lặp lại, ví dụ trong những năm tiếp theo và/hoặc bằng các kiểu huyết thanh AAV khác có thể được xem xét.

Điều trị

Các vector theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh về mắt bất kỳ trong đó có sự loạn chức năng, sự thoái hóa hoặc thiếu các tế bào hình nón nhưng

vẫn còn ít nhất một vài tế bào hình que khỏe mạnh. Chức năng của tế bào hình nón có thể bị thiếu toàn bộ hoặc một phần, ví dụ ít nhất 10%, ít nhất 25%, ít nhất, ít nhất 50%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc thiếu nhiều hơn. Các tế bào hình que khỏe mạnh là các tế bào hình que có khả năng thực hiện bình thường hoặc một phần chức năng của tế bào hình que bình thường, ví dụ ít nhất 10%, ít nhất 25%, ít nhất, ít nhất 50%, ít nhất 75% hoặc ít nhất 90% của chức năng của tế bào hình que bình thường đối với sự cảm nhận ánh sáng ở mức độ dạ thị.

Do đó, tình trạng bệnh có thể được điều trị bằng cách sử dụng vector theo sáng chế bao gồm bệnh thoái hóa điểm vàng, bệnh mù màu và bệnh mù lòa bẩm sinh Leber. Thoái hóa điểm vàng có thể là bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (AMD), ví dụ AMD ướt hoặc AMD tạo mạch mới hoặc teo địa lý, tình trạng bệnh thoái hóa điểm vàng do di truyền hoặc chứng loạn dưỡng tế bào hình nón do di truyền. Theo một vài phương án, sáng chế sẽ dẫn đến việc tạo ra ‘hổ mắt giả’, vùng nhỏ của các tế bào hình que giống tế bào hình nón mà cải thiện thị lực đối với tình trạng bệnh trong đó các tế bào hình nón của hổ mắt bị mất hoặc loạn chức năng.

Nhìn chung, bệnh nhân được điều trị bằng các vector theo sáng chế là người. Bệnh nhân có thể là nam hoặc nữ và ở bất kỳ độ tuổi nào.

Các ví dụ sau đây minh họa thêm cho sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Phương pháp thử nghiệm ArchT.

Động vật

Chuột hoang (C57BL/6J) được mua từ Harlan Laboratories (Blackthorn, UK). Các con chuột CNGA3^{-/-} và PDE6C^{-/-} được nuôi trong nhà. Toàn bộ các con chuột được duy trì trong điều kiện ánh sáng theo chu kỳ (12 giờ sáng-tối); ánh sáng chiếu trong lồng là 7 ngọn nến trong suốt chu kỳ ánh sáng. Toàn bộ các thử nghiệm đã được phê chuẩn bởi Ủy ban Chăm sóc và Sử dụng động vật địa phương (Institutional Animal Care and Use Committees) (UCL, London, UK) và tuân theo các hướng dẫn về việc chăm sóc và sử dụng động vật được thông qua bởi Hiệp hội Khoa học thần kinh và Hiệp hội nghiên cứu Thị lực và Nhãn Khoa (the Society for Neuroscience and the Association for Research in Vision and Ophthalmology) (Rockville, MD).

Cấu trúc plasmit, sản xuất virus và quy trình tiêm

Cấu trúc gen chuyển (ArchT-EGFP) được cung cấp tốt bởi Prof Ed Boyden (MIT, USA) và chứa trình tự cADN của gen ArchT được dung hợp với protein huỳnh quang EGFP. Plasmit được đóng gói vào AAV8 để tạo ra vector virus AAV tái tổ hợp, AAV8.hRho.ArchT-EGFP. Vector AAV8 tái tổ hợp được sản xuất thông qua phương pháp chuyển nhiễm nhanh ba lần như đã được mô tả trước đó. Cấu trúc plasmit, plasmit đóng gói đặc hiệu kiểu huyết thanh AAV và plasmit hỗ trợ được trộn bằng polyetylenimin (Polysciences Inc.) để tạo thành các phức hợp chuyển nhiễm, mà sau đó được bổ sung vào các tế bào 293T và để trong 72 giờ. Các tế bào được thu hoạch, được cô và dung giải để giải phóng vector. AAV8 được tinh chế bằng cách sử dụng cột AVB Sepharose (GE Healthcare). Cả hai được rửa trong 1X PBS và được cô đến thể tích 100–150 μ L. Độ chuẩn hạt virus được xác định bằng ADN thăm điểm so sánh thu được từ vật liệu gốc của virus đã tinh chế và các đối chứng plasmit đã xác định. Nồng độ vector tinh khiết được sử dụng cho toàn bộ các thử nghiệm là 5×10^{12} hạt virus/ml. Quy trình tiêm dưới võng mạc được thực hiện như đã được mô tả trước đó và gồm 2 lần tiêm, mỗi lần 2 μ L.

Hóa mô miễn dịch

Động vật được làm chết nhẹ nhàng, nhãn cầu đã được bóc nhân và giác mạc, nhãn mắt và móng mắt được lấy ra. Đối với phần của võng mạc, đài mắt được cố định trong paraformaldehyt (PFA) 4% trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, trước khi được đặt vào trong môi trường nhiệt độ cắt tối ưu (OCT). 30 μ m đoạn cắt lạnh được cắt theo hướng đối xứng dọc, được rửa bằng PBS và được phong bế trong huyết thanh dê thông thường (NGS) 10%, albumin huyết thanh bò (BSA) 3% và Triton-X100 0,1%. Các mẫu tương ứng được ủ với kháng thể bậc một trong dung dịch phong bế ở nhiệt độ 4°C qua đêm bằng cách sử dụng kháng arrestin tế bào hình nón của thỏ (pha loãng 1:500). Sau khi rửa PBS, hỗn hợp tương ứng của kháng thể bậc hai (toàn bộ pha loãng 1:500, life technologies) bao gồm Alexa Fluor 546 dê kháng thỏ (#A11035), Alexa Fluor 633 dê kháng chuột (#A21052) và streptavidin, Alexa Fluor 633 liên hợp (#S21375) được sử dụng để ghi nhãn các mẫu trước khi các mẫu này được phản chất nhuộm bằng DAPI và được thực hiện bằng môi trường mang huỳnh quang DAKO (DAKO, S3023, Denmark). Các hình ảnh được thu bằng kính hiển vi đồng tiêu (Leica DM5500Q).

Các giá trị hút thụ cảm quang học đơn ghi được

Động vật được cho thích nghi với bóng tối trong 12 giờ trước khi bắt đầu các thử nghiệm. Các con chuột được cho sử dụng quá liều hỗn hợp gây mê chứa ketamin thông qua đường trong ổ bụng, để tạo ra quá trình gây mê mất phẳng phẫu thuật cuối cùng. Các con chuột sau đó bị làm chết bằng cách làm trật khớp cổ và được tách nhãn cầu. Mắt được giải phẫu trong điều kiện chiếu sáng mờ, ánh sáng xa ánh sáng đỏ. Vỡng mạc đã tách ra được nhúng trong dung dịch agarosa 1% nóng chảy ít và sau đó được cắt bằng cách sử dụng vibrotome (leica) thành các lát bề mặt dày 230um. Các lát này được đặt trong phòng ghi và được truyền môi trường Ames bão hòa carbogen (95% O₂ 5% CO₂) chứa 100µm 9-cis của vỡng mạc (Sigma) và BSA 0,2% (Sigma). Nhiệt độ của dung dịch truyền được duy trì ở nhiệt độ 37°C bằng cách sử dụng thành phần làm nóng dòng dưới sự điều khiển hồi tiếp (Scientifica). Các pipet lắp ráp tính kháng rất thấp (1-2MΩ) được làm từ mao mạch thủy tinh borosilicat có dây tóc (Harvard Apparatus Ltd) bằng cách sử dụng máy kéo thẳng đứng PC-10. Pipet được đổ đầy bằng dung dịch ngoài, gắn trên headstage và áp suất nhỏ được đặt lên qua đầu pipet (~30mbar). Sử dụng ánh sáng hồng ngoại và kính hiển vi để hỗ trợ quá trình hiện hóa pipet được đặt lên bề mặt của vỡng mạc, và sau đó giảm xuống khoảng 50um vào lát, cho tới khi các đoạn thụ cảm quang học xuất hiện nguyên vẹn và được sắp xếp gọn gàng. Áp suất âm nhỏ được áp dụng qua đầu pipet như nó được tăng lên từ từ qua mô của vỡng mạc, sử dụng xung thử nghiệm 100ms, 10mV để theo dõi điện trở qua đầu pipet. Khi điện trở tăng đến khoảng 20-30MΩ các đáp ứng gây ra ánh sáng được thử nghiệm. Tác nhân kích thích ánh sáng từ cặp nguồn ánh sáng LED (bước sóng đỉnh 530nm) đến chỉ dẫn ánh sáng lỏng, được chuyển qua mục tiêu kính hiển vi (Olympus). Bộ lọc mật độ trung tính được sử dụng để kiểm soát chính xác cường độ của tác nhân kích thích ánh sáng. Yếu tố kích thích ánh sáng gồm các xung sóng vuông được lập trình bằng cách sử dụng phần mềm P-Clamp (Molecular Devices), và vận chuyển thông qua bảng DAC (Axon Instruments) kết hợp với trình điều khiển LED (Thorlabs). Các giá trị ghi điện sinh lý được thực hiện bằng cách sử dụng bộ khuếch đại Multiclamp 700B (Molecular Devices). Dữ liệu được số hóa ở 20kHz.

Giá trị ghi MEA

Động vật được cho thích nghi với bóng tối trong 12 giờ trước khi bắt đầu các thử nghiệm. Các con chuột được sử dụng quá liều hỗn hợp gây mê chứa ketamin thông qua

đường trong ổ bụng, để tạo ra quá trình gây mê mặt phẳng phẫu thuật cuối cùng. Các con chuột này sau đó bị làm chết bằng tách nhãn cầu và trật khớp cổ. Mắt của các con chuột này được giải phẫu trong môi trường Ames bão hòa carbogen (95% oxy, 5% cacbon dioxit) (Sigma), trong điều kiện ánh sáng đỏ mờ. Giác mạc và nhãn mắt được lấy ra, bằng cách lấy ra cẩn thận để loại bỏ càng nhiều thủy tinh thể từ bề mặt của võng mạc càng tốt. RPE được tách ra từ võng mạc và một cánh phẳng có bề ngang 1-3 mm được cắt bỏ từ của hố võng mạc. Cánh của võng mạc được đặt ở bên dưới của hạch – tế bào trên bề mặt của mạng nhiều cực, và tổn hao vòng tròn được cấu trúc từ dây platin trơ (Sigma) và nylon được sử dụng để giữ cho cánh này đúng vị trí. Trong suốt quá trình ghi chép, mô được truyền dịch bằng môi trường carbogen bão hòa Ames (Sigma), duy trì ở nhiệt độ 36,5°C hoặc ghi chép bao gồm các điều kiện thích nghi tối hoặc ánh sáng trung bình, môi trường dịch truyền được tạo thành bao gồm 9-cis võng mạc (Sigma), ở nồng độ 100 μ M, trong BSA 0,2% (Sigma). Mảng giá trị ghi chép 60 điện cực được đục lỗ, gồm các điện cực vonfam được đặt cách nhau 100 μ m (Multi Channel Systems) được sử dụng để ghi lại khả năng của hạch tế bào ngoại bào. Sự thay đổi điện áp được khuếch đại và được số hóa ở 50kHz bằng hệ thống MC Card, sử dụng phần mềm MC Rack (Multi Channel Systems).

Phân tích dữ liệu điện sinh lý học

Dữ liệu điện sinh lý học được phân tích bằng cách sử dụng các macro tùy chỉnh bằng văn bản trong IgorPro 6. Các dòng synaptic và điện thế được phát hiện bằng cách sử dụng giải thuật ngưỡng biên độ mà ngưỡng cho việc phát hiện kết quả được thiết lập ở mức 2 lần độ lệch chuẩn của tiếng động cơ bản (thông thường khoảng 10pA). Các dòng và điện thế được phát hiện được kiểm tra bằng tay thông qua sự kiểm tra kỹ của tất cả dữ liệu điện sinh lý học.

Điều tiết nỗi sợ

Các con chuột được rèn luyện và được thử nghiệm bằng cách sử dụng hệ thống điều tiết nỗi sợ có trên thị trường (Med Associates). Để đảm bảo tình trạng bị mù, người làm thử nghiệm tiến hành tập luyện và thử nghiệm luôn mù đối với các dòng chuột và các tình trạng điều trị. Tóm lại, việc cài đặt gồm buồng điều tiết không khí (20x30 cm) với một sàn lưới thép không gỉ được đặt bên trong buồng làm giảm âm thanh. Hành vi của chuột được theo dõi liên tục trong quá trình rèn luyện và thử nghiệm bằng thiết bị

máy ảnh kỹ thuật số hồng ngoại được tích hợp sẵn (30 khung/giá trị thu được) và ánh sáng hồng ngoại. Phần mềm Video Freeze (Med Associates) được sử dụng để kiểm soát quá trình phân phối tác nhân kích thích ánh sáng và tình trạng sốc. Tác nhân kích thích ánh sáng gồm đèn LED đơn (530 nm, Thorlabs) 5 Hz 50ms nhấp nháy độ sáng đầy đủ được tạo ra thông qua giao diện Arduino (Arduino Software) được đặt trên bảng điều khiển của buồng điều tiết không khí. Để đảm bảo rằng bối cảnh mà trong đó quá trình rèn luyện và thử nghiệm diễn ra khác nhau, bảng treo tường bị cong và sàn đã được lồng vào buồng cho thử nghiệm. Ánh sáng nền trắng được sử dụng để làm giảm cơ hội của quá trình hoạt hóa hình que và đồng tử được làm giãn bằng các giọt Tropicamit để tăng lượng ánh sáng đến võng mạc của chuột.

Các con chuột được đặt bên trong buồng và trải qua một buổi điều trị, gồm 6 cặp 5 giây, tác nhân kích thích ánh sáng kết thúc đồng thời với việc sốc điện ở chân 2 giây, 0,65 mA. Khoảng thời gian thử nghiệm được ngẫu nhiên hóa giả (khoảng trung bình 90 giây). Sau quá trình rèn luyện, chuột được trả lại lồng nuôi. 24 giờ sau khi được rèn luyện, chuột được thử nghiệm để gọi lại bộ nhớ bổ sung của thị lực. Chuột được đặt trong buồng thử nghiệm và được theo dõi tổng cộng 360 giây. Tác nhân kích thích ánh sáng điều tiết được đưa ra liên tục trong 120 giây cuối của thử nghiệm. Tất cả dữ liệu đều được thu và ghi lại tự động bởi phần mềm VideoFreeze (Med Associates). Tóm lại, phần mềm được hiệu chỉnh trước khi đặt động vật trong buồng. Phần mềm sau đó đo các thay đổi pixel diễn ra giữa mỗi khung hình video. Ngưỡng chuyển động được đặt ở mức thấp nhất có thể (20 đơn vị chỉ số chuyển động), và số lượng hành vi ngừng hoạt động liên tục được đặt thành tỷ lệ khung để đảm bảo rằng đọc ra chính xác nhất của chuyển động. Để đánh giá sự gọi lại ký ức bổ sung ánh sáng, phần trăm thời gian của hành vi ngừng hoạt động được tính trung bình trong 2 phút ngay trước khi và sau khi bắt đầu kích thích ánh sáng. Ý nghĩa thống kê được đánh giá bằng ANOVA một thông số. Các kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ S.E.M.

Phép đo thị lực

Độ tinh của thị lực được đo bằng cách quan sát các đáp ứng quang điện của chuột đối với các cách tử hình sin chuyển động quay (OptoMotry, Cerebral Mechanics). Quy trình được sử dụng tạo ra các số đo độc lập độ tinh của mắt phải và mắt trái dựa trên độ nhạy không đồng đều của hai mắt để xoay hình vì chỉ có sự chuyển động theo chiều hướng đến mũi dẫn đến phản ứng theo dõi. Kết quả là, mắt trái và mắt phải nhạy nhất

với chiều quay tương ứng theo ngược chiều kim đồng hồ (CCW) và theo chiều kim đồng hồ (CW). Tác nhân kích thích của tần số thời gian khác nhau được sử dụng để xác định ngưỡng mà tại đó có đáp ứng. Phương pháp so sánh cặp đôi định hướng mù kép được sử dụng, mà trong đó người quan sát bị “mù” theo hướng xoay hình, dù là chuột *CNGA3*-/- hoặc *PDE6C*-/- hoặc động vật đối chứng kiểu đại liên quan đến tuổi tác (*C57BL6*) được điều trị hoặc không được điều trị bởi ArchT. Độ tinh của thị lực được đo trong cả hai mắt của động vật thử nghiệm và được tính trung bình hoặc phân tích riêng rẽ cho mỗi mắt sau 4 thử nghiệm được tiến hành trong 4 ngày riêng biệt. Việc đo được thực hiện trên chuột được tiêm 3-10 tuần sau điều trị cùng với các đối chứng đồng hợp tử liên quan đến tuổi tác.

Ví dụ 2 - Việc hiểu hiện ArchT trong thụ cảm quang học tế bào hình que đem lại khả năng đáp ứng với các đáp ứng không mất màu nhanh

Thị lực được điều tiết bởi tế bào hình que được tối ưu hóa với mức ánh sáng thấp nhất, bao gồm việc phát hiện ra photon đơn. Tuy nhiên, các tế bào hình que không thể nói việc xâm nhập với việc phục hồi của các đáp ứng tế bào hình nón nhanh với ánh sáng (Fu et al., 2007, Pugh et al., 1999). Sự khác biệt về chức năng này, hữu ích để bảo đảm thị lực đáng tin cậy trong các môi trường khác nhau, trở nên bị yếu khi thị lực được điều tiết bởi tế bào hình nón bị mất trong tình trạng bệnh như trong bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già, khi các tế bào hình nón được đóng gói dày đặc trong hố mắt bị thoái hóa (de Jong 2006). Nó được nghiên cứu nếu các tế bào hình que có thể đáp ứng và hồi phục nhanh đối với tác nhân kích thích, điều này sẽ giúp giảm bớt sự suy yếu của chức năng gây ra bởi việc mất các tế bào hình nón.

Bơm proton được điều khiển bởi ánh sáng nhanh (ArchT) (Han et al., 2011) được biểu hiện trong thụ cảm quang học tế bào hình que. Các hạt AAV8 mang ArchT-EGFP dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu rodopsin (Rho) được tiêm dưới võng mạc ở chuột trưởng thành. Sự biểu hiện của Rho-ArchT-EGFP được giới hạn ở màng của thụ cảm quang học tế bào hình que (Fig.1a-b). Các đầu cuối của synap của các tế bào hình que biểu hiện Rho-ArchT-EGFP và các tế bào hình nón có thể dễ dàng được phân biệt sau quy trình hóa mô miễn dịch (Fig.1c). Định lượng PCR trên một quần thể được lựa chọn của các tế bào hình nón được xác nhận rằng sự biểu hiện Rho-ArchT-EGFP là đặc hiệu quần thể tế bào hình que và không có dấu hiệu rõ rệt của độ tinh được quan sát lên đến 6 tháng sau khi tiêm AAV8. Sự biểu hiện của ArchT cho phép đáp ứng ánh sáng

cực nhanh, trong khi các đáp ứng tế bào hình que nội tại được bảo toàn và là tương đương với quan sát thấy trong thụ cảm quang học tế bào hình que không chuyển hóa (Fig.1d). Các dòng được gây ra bởi ánh sáng thu được từ các tế bào hình que biểu hiện ArchT chứng minh động học nhanh hơn đáng kể so với các dòng hình que nội tại trong toàn bộ các mẫu chuột được thử nghiệm (Fig.2a-b). Các động học này cho phép gây ra các dòng ánh sáng được điều biến lên đến 80 Hz, vượt xa giới hạn của cả các tế bào hình que, mà dao động ở khoảng 20 Hz (Fig.2a-c), và các tế bào hình nón (Fu et al., 2007).

Bất ngờ là, việc hiệu hiện ArchT không làm thay đổi đặc tính của thụ cảm quang học tế bào hình que trong khi đem lại khả năng đáp ứng với các đáp ứng không mất màu nhanh (Fig.2e).

Ví dụ 3 - Các tế bào hình que biểu hiện Arch điều khiển việc tăng RGC duy trì ở cường độ ánh sáng cao và ở tần số xấp xỉ tần số của thụ cảm quang học tế bào hình nón.

Tiếp theo, việc hệ mạch điện được điều khiển bởi các tế bào hình que có khả năng theo thị lực được điều khiển bởi hình que nhanh hơn bình thường hay không được nghiên cứu. Đường dẫn tế bào hình que và tế bào hình nón biểu hiện một số điểm tương đồng và một số điểm khác biệt nổi bật và do đó không rõ sơ đồ mạch điện hình que có thể duy trì được quá trình truyền giống tế bào hình nón nhanh (Wässle et al., 2004). Các tế bào hình que được thấy là tiếp xúc xa (OFF) các tế bào lưỡng cực ‘hình nón’ trực tiếp (Soucy et al., 1998 và Hack et al., 1999) và sự kích thích xung theo cặp gợi ý rằng việc thay thế này có thể nhanh như tế bào hình nón xa khỏi tế bào hình nón lưỡng cực (Li et al., 2010). Tuy nhiên, không rõ ràng các đáp ứng này có thể được duy trì như thế nào và có các tế bào lưỡng cực hình que (ON) cũng có thể duy trì quá trình truyền nhanh. Hơn nữa, các phần cuối của synap của tế bào hình que có kích thước và đơn vị siêu cấu trúc khác nhau so với các tế bào hình nón và các tế bào lưỡng cực hình que không tiếp xúc các tế bào hạch của võng mạc (RGC) trực tiếp mà chỉ thông qua một quá trình bao gồm tế bào không sợi trục AII (Wässle et al., 2004). Để kiểm tra tốc độ tối đa mà con đường của tế bào hình que có thể đạt được, các giá trị ghi điện cực từ RGC trong các mẫu chuột thiếu chức năng của tế bào hình nón được thực hiện, để cách ly lượng RGC được điều tiết bởi tế bào hình que. Các đáp ứng được điều khiển bằng tế bào hình que trong RGC trong võng mạc không chuyển hóa được mất màu ở mức độ ánh sáng cao và không thể theo các tần số kích thích cao hơn khoảng 20 Hz (Fig.2f).

Ngược lại, các tế bào hình que biểu hiện ArchT điều khiển việc tăng đột ngột RGC duy trì ở cường độ ánh sáng cao và tại các tần số xấp xỉ tần số của thụ cảm quang học tế bào hình nón (Fig.2f).

Ví dụ 4 - Sự biểu hiện của Rho-ArchT-EGFP mở rộng độ nhạy của chuột thiếu thị lực được điều tiết bởi tế bào hình nón đối với tác nhân kích thích ánh sáng chói

Đề thị lực tế bào hình que nhanh hơn bình thường có ích, được cho là chuột có thể sử dụng các dòng được điều tiết bởi ArchT để đáp ứng một cách tin cậy với tác nhân kích thích chói và nhanh. Chuột *CNGA3^{-/-}* và *PDE6C^{-/-}* thiếu thị lực được điều tiết bởi tế bào hình nón (Biel et al., 1999 và Change et al., 2009) không nghiên cứu biểu đồ điều tiết nỗi sợ, trong đó tác nhân kích thích ánh sáng chói được kết cặp và kết thúc đồng thời với việc gây sốc nhẹ ở chân (Fig.3a). Tuy nhiên, sự biểu hiện của Rho-ArchT-EGFP mở rộng độ nhạy của các con chuột này đối với tác nhân kích thích ánh sáng chói, cho phép nghiên cứu về sự liên kết giữa tác nhân kích thích thị lực và cú sốc (Fig. 3a). Cuối cùng, sự liên kết giữa tác nhân kích thích thị lực và cú sốc được thử nghiệm có việc hiệu hiện ArchT đem lại thị lực nhanh đối với chuột *CNGA3^{-/-}* và *PDE6C^{-/-}*. Đánh giá tốc độ của thị lực bằng phép thử vận mắt (Umino et al., 2008) cho thấy rằng chuột biểu hiện bởi ArchT có thể chịu tác động của tác nhân kích thích nhanh hơn chuột mà không chịu đựng việc tiêm virus dưới võng mạc và chuột mà được nhận chỉ vector GFP (Fig.3b). Tần số tối đa của các tác nhân kích thích mà chuột biểu hiện bởi ArchT có thể chịu tác động tương tự với tần số tối đa của thụ cảm quang học tế bào hình nón (Fig.3b).

Kết hợp lại, các kết quả này chỉ ra rằng các tế bào hình que có thể được điều khiển nhanh hơn bởi dòng thác chuyển đổi quang học nội tại của chúng và mạch điều khiển hình que có thể duy trì việc truyền tín hiệu nhanh hơn. Quan trọng là, việc giải phóng synap từ các tế bào hình que không đòi hỏi quá trình dao động điện áp lớn, nhưng các dòng nhỏ có thể thay vào đó tạo ra các biến đổi điện áp đủ để làm thay đổi đáng kể quá trình truyền synap của chúng (Cangiano et al., 2012). Điều này mở rộng quá trình sử dụng theo sáng chế đối với mức độ sáng thấp hơn nhiều lần mức độ sáng trung bình được đòi hỏi cho quá trình thao tác quang di truyền trong hoạt động ở hầu hết các noron khác (Han et al., 2011).

Ví dụ 5 – Phương pháp cho thử nghiệm RPAP

Động vật

Các con chuột C57BL6 (Harlan, UK), *Cnga3*^{-/-} (J.R. Heckenlively, University of Michigan), *Pde6c*^{-/-} (J.R. Heckenlively, University of Michigan, MI) (Chang et al., 2009), và *Gnat1*^{-/-} (J. Lem, Tufts University School of Medicine, MA) (Calvert et al., 2000) được nuôi trong lồng nuôi động vật ở Đại học London (University College London). Các con chuột đực và cái trưởng thành ở độ tuổi 6-12 tuần tuổi ở thời điểm tiêm virus và được sử dụng cho các thử nghiệm ít nhất 2 tuần sau khi tiêm để cho phép việc biểu hiện đủ R9AP. Toàn bộ các con chuột được sử dụng là ở độ tuổi từ 2 đến 6 tháng và được liên kết tuổi giữa các nhóm thử nghiệm xác định. Toàn bộ các thử nghiệm được tiến hành theo Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research và theo ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Các con vật này được giữ trên tiêu chuẩn chu kỳ 12/12 giờ sáng-tối.

Cấu trúc plasmit và việc tạo ra chất tái tổ hợp AAV8

cADN của chuột *R9ap* được khuếch đại bằng PCR từ cADN vòng mạc của chuột bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà được thiết kế để bao gồm toàn bộ vùng mã hóa. *R9ap* cADN được tách dòng giữa trình tự khởi đầu (trình tự khởi đầu CMV hoặc trình tự khởi đầu rodopsin của bò) và vị trí bổ sung SV40. Các plasmit này được sử dụng để tạo thành 2 vector của virus kiểu giả AAV2/8, rAAV2/8.CMV.mR9ap và rAAV2/8.Rho.mR9ap, như được mô tả bên dưới.

Vector tái tổ hợp AAV2/8 được sản xuất thông qua phương pháp chuyển nhiễm tạm thời ba lần như được mô tả trước đây (Gao et al., 2002). Cấu trúc plasmit, plasmit hỗ trợ và plasmit đóng gói đặc hiệu kiểu huyết thanh AAV được trộn bằng polyetylenimin để tạo thành các phức hợp của quá trình chuyển nhiễm mà sau đó được bổ sung các tế bào 293T và để trong 72 giờ. Các tế bào được thu gom, được cô và được dung giải để giải phóng vector. AAV2/8 được tinh chế bằng sắc ký cột ái lực và được cô bằng cách sử dụng các cột siêu lọc (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany), được rửa trong PBS và được cô vào một thể tích 100–150 μ l. Chuẩn độ của hạt virus được xác định bằng thăm điểm hoặc bằng PCR thời gian thực. Các nồng độ vector được tinh chế được sử dụng là $1-2 \times 10^{12}$ hạt virus/ml.

Điện võng mạc đồ (ERG)

ERG được ghi lại từ cả hai mắt sau khi chuột được thích nghi với bóng tối qua đêm bằng cách sử dụng hệ thống có bán trên thị trường (Espion E2, Diagnosys LLC,

Lowell, MA). Các con vật đã được gây mê bằng cách tiêm trong màng bụng 0,007 ml/g hỗn hợp của medetomidin hydroclorua (1 mg/ml), ketamin (100 mg/ml), và nước ở tỷ lệ 5:3:42 trước khi ghi lại. Đồng tử được giãn hoàn toàn bằng cách sử dụng phenyleprin 2,5% và tropicamit 1,0%. Các điện cực tham chiếu đường giữa dưới da nền và miệng được đặt lần đầu, sau đó điện cực bạc dương được cho phép để chạm nhẹ vào trung tâm của giác mạc trong điều kiện ánh sáng đỏ mờ. Một giọt gel lỏng Viscotears 0,2% (Dr. Robert Winzer Pharma/OPD Laboratories, Watford, UK) được đặt ở bên trên của điện cực dương để giữ giác mạc ẩm trong suốt quá trình ghi chép và chuột được cho phép để thích nghi thêm với bóng tối trong 5 phút. Các tần số ngắt bởi bộ lọc thông dải bằng 0,312 Hz và 1000 Hz. Tốc độ phục hồi của đáp ứng quang học được đo bằng cách sử dụng mô hình ánh sáng ghép nơi mà các cặp chớp sáng với cường độ bão hòa giống nhau ($1,8 \log.cd.s/m^2$) được tách ra bằng các khoảng tác nhân kích thích trung bình khác nhau (ISI; 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 giây) được trình bày. Trong mô hình này, chớp sáng thứ nhất sẽ loại bỏ hoàn toàn các đáp ứng điện của cơ chế hình que mà cho phép quan sát tốc độ của quá trình phục hồi chức năng của chức năng của tế bào hình que bằng cách đưa ra chớp sáng thứ hai với ISI khác. Lượng thời gian đủ (150 giây) được cung cấp giữa các cặp chớp sáng để cho phép quá trình phục hồi hoàn toàn của chớp sáng thứ nhất. Sau đó quá trình phục hồi của biên độ sóng a đã quan sát nên phản chiếu tốc độ của quá trình làm bất hoạt các tế bào hình que trong động vật không có chức năng của tế bào hình nón vì chớp sáng chỉ cần mất màu một phần rodopsin (0,02%) (Lyubarsky et al., 2004 and Weymouth, A.E. & Vingrys 2008). Cường độ nhấp nháy dạ thị 6 Hz theo dãy được thực hiện như đã báo cáo với một vài sửa đổi (Seeliger et al., 2001). 17 bước của các cường độ chớp sáng được sử dụng trong khoảng từ -6 đến 2 $\log.cd.s/m^2$ mỗi đoạn tách bằng 0,5 log đơn vị. Đối với mỗi bước, sau 10 giây thích ứng, các dải 600 ms được tính trung bình 20 lần bằng cách sử dụng điều kiện chớp sáng giống nhau. Các đáp ứng thích nghi dạ thị theo dãy cũng được thu bằng cách sử dụng các chớp sáng dài hơn bằng khoảng ánh sáng 20, 100, và 200 ms tại 83,3 cd/m^2 . Các ghi chép dạ thị chớp sáng lẻ tiêu chuẩn được thu từ các con vật được thích nghi với bóng tối tại các cường độ ánh sáng ngày càng tăng: -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1,0, 1,5, và 1,9 $\log.cd.s/m^2$. Các giá trị chớp sáng chói được thực hiện sau các khoảng thời gian thích ứng ánh sáng 5 phút trên cường độ ánh sáng nền của 20 cd/m^2 , mà cũng được sử dụng làm ánh sáng nền trong

khoảng thời gian của các ghi chép. Cường độ chớp sáng chói được sử dụng là -2, -1, 0, 1, 1,5, và 1,9 log.cd.s/m².

Mô học

Sáu tuần sau khi tiêm một bên dưới võng mạc của rAAV2/8.Rho.mR9ap, cả hai mắt từ chuột *Cnga3*^{-/-} được lấy ra nhanh và cấp đông nhanh trong nitơ lỏng. Sau khi nhúng lạnh mắt trong OCT (RA Lamb, Eastborne, UK), mắt được cắt thành các phần ngang dày 15 μ m và được làm khô trong không khí trong 15 - 30 phút. Đối với quy trình hóa mô miễn dịch, các phần được chặn trước trong PBS chứa huyết thanh lừa bình thường (2%), albumin trong huyết thanh bò (2%) 1 giờ trước khi ủ bằng kháng thể kháng RGS9 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa 2 x 15 phút bằng PBS, các phần được bảo toàn trong tủ ẩm bằng kháng thể thứ hai được gắn bởi Alexa 546 một cách thích hợp (Invitrogen, Carlsbad, CA) trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT), được rửa và được phản chất nhuộm bằng Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Phần võng mạc được nhìn thấy trên kính hiển vi đồng tụ (Leica TCS SP2, Leica Microsystems; Wetzlar, Germany).

Thẩm tách Western

Mắt từ chuột *Cnga3*^{-/-} 4 tuần sau khi tiêm dưới võng mạc một bên của rAAV2/8.Rho.mR9ap được thu gom. Sau khi tách võng mạc của dây thần kinh từ phức hợp RPE/màng mạch/màng cứng, các mô được đồng nhất trong đệm RIPA và để trên đá trong 20 phút. Các mẫu này được ly tâm ở 16.000 g trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C và bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng. Phương pháp thẩm tách Western được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình đã biết.

Các phản ứng thị giác và chức năng nhảy tương phản

Độ nhảy tương phản và độ tinh của thị lực của mắt được điều trị và không được điều trị được xác định bằng cách quan sát các phản ứng thị giác của chuột đối với các cách tử hình sin chuyển động quay (OptoMotry™, Cerebral Mechanics, Lethbridge, AB Canada). Quy trình đã sử dụng tạo ra các số đo độc lập của độ tinh của mắt trái và mắt phải dựa trên sự nhảy không đồng đều của 2 mắt để xoay hình: mắt trái và mắt phải được điều khiển chủ yếu bằng quá trình quay tương ứng ngược chiều kim đồng hồ và theo chiều kim đồng hồ (Douglas et al., 2005). Chuột được đặt trên một chỗ tách riêng được cách ly với sàn nhà trong một không gian khép kín được bao quanh bởi 4 thiết bị

giám sát bằng cách tử hình sin chuyển động quay với độ sáng trung bình 62 cd/m². Phương pháp so sánh cặp đôi định hướng mù kép được dùng, mà trong đó người quan sát là “mù” với hướng xoay hình, cho dù đó là chuột được điều trị hoặc không được điều trị *Cnga3*^{-/-} hoặc động vật đối chứng kiểu đại phù hợp độ tuổi (C57BL6). Độ nhạy tương phản được đo tại 0,128, 0,256, 0,383, 0,511 vòng quay/độ được thể hiện tại 6 Hz như được xác định là 100 chia cho phần trăm tương phản thấp nhất tạo ra đáp ứng ngưỡng. Cả hai mắt của mỗi con chuột được thử nghiệm 4 lần vào những ngày riêng biệt. Dữ liệu được dự kiến trên biểu đồ Độ nhạy tương phản Campbell-Robson bằng các cách tử hình sin đại diện cho tần số không gian tương đối.

Phép đo rodopsin

Sau khi chuột được hoàn toàn thích nghi với bóng tối qua đêm, chuột được gây mê và đồng tử được làm giãn hết cỡ để đánh giá tốc độ mất màu sắc tổ của thị lực. Sau đó, chuột được đặt trong một hộp có ánh sáng với nguồn ánh sáng (7,0 mW) chiếu trực tiếp vào mắt trong 5 phút trước khi mắt được thu gom. Trong thử nghiệm khác, chuột được tiếp xúc với điều kiện giống như quá trình đo độ nhạy tương phản trong nhiều khoảng thời gian (0, 30, 60, 120 phút). Mắt chuột được lấy ra tại mỗi thời điểm và được đặt trong 250 μ l nước muối đệm phosphat và đóng băng trong nitơ lỏng trong ống kín ánh sáng và được giữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng. Một vài mắt được thu gom trong bóng tối ở điều kiện chiếu ánh sáng đỏ sau khi chuột thích ứng bóng tối qua đêm. Phép đo phổ quang kế của rodopsin được thực hiện như đã báo cáo trước đây với các sửa đổi nhỏ (Douglas et al., 1995). Tóm lại, các mẫu được rửa đông ở nhiệt độ trong phòng và được đồng nhất hóa. Điều này và các hoạt động tiếp theo được thực hiện trong điều kiện ánh sáng đỏ mờ mà làm mất màu các sắc tố thị giác tối thiểu. 50 microlit n-dodexyl β -D-maltosit (200 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) được bổ sung vào mỗi mẫu và hỗn hợp thu được được quay trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, sau đó ly tâm 10 phút (23.000 g) ở nhiệt độ 4°C. Chất nổi bề mặt được lấy ra và được đặt vào cuvet thạch anh trong quang phổ kế Shimadzu UV-2101PC (Shimadzu, Kyoto, Japan). Sau lần quét ban đầu của chiết xuất chưa mất màu từ 300 nm đến 700 nm, mẫu được tiếp xúc với ánh sáng đơn sắc (502 nm) trong 3 phút, cho thấy là đủ để làm mất màu rodopsin hoàn toàn (Longbottom et al., 2009), và được quét lại. Toàn bộ các phổ hấp thụ được điều chỉnh về không ở 700 nm. Các phổ khác nhau được xây dựng bằng cách sử dụng

các đường cong trước và sau khi mất màu và mật độ quang học tối đa được xác định ở khoảng 500 nm, biểu thị lượng sắc tố thị giác được chiết.

Ví dụ 6 - Sự biểu hiện quá R9AP trong các tế bào hình que và tốc độ bất hoạt thụ cảm quang học tăng.

RGS9, Gβ5, và R9AP là các thành phần bắt buộc của phức hợp GTPaza điều hòa. Để nghiên cứu tác động của sự biểu hiện quá của R9AP được điều tiết bởi AAV lên phức hợp GTPaza trong các tế bào hình que, mức độ và sự phân bố của RGS9 được kiểm tra sau khi tiêm rAAV2/8.Rho.mR9ap dưới võng mạc ở chuột *Cnga3*^{-/-}. Các con chuột này có chức năng của tế bào hình que bình thường nhưng thiếu chức năng của tế bào hình nón và đảm nhiệm vai trò làm mẫu của chúng mù màu. Bốn tuần sau, võng mạc được điều trị cho thấy khả năng phản ứng miễn dịch chống lại RGS9 tăng lên thông qua lớp thụ cảm quang học trong các võng mạc được điều trị so với không được điều trị (Fig.4A). Phép phân tích thẩm tách Western còn xác nhận sự biểu hiện protein RGS9 tăng trong võng mạc được điều trị (Fig.4B). Các kết quả này chỉ ra rằng sự biểu hiện quá của R9AP bằng cách sử dụng AAV2/8 làm tăng hiệu quả lượng thành phần xúc tác RGS9 và phức hợp GTPaza.

Tiếp theo, tác dụng chức năng của sự biểu hiện quá của R9AP được điều tiết bởi AAV2/8 lên quá trình chuyển đổi quang học tế bào hình que được nghiên cứu bằng cách áp dụng ERG chớp sáng ghép cặp (Lyubarsky và Pugh 1996). Trong mô hình này, một cặp cường độ chớp sáng giống nhau được với khoảng cách giữa các lần kích thích biến đổi và quá trình phục hồi của đáp ứng thứ hai có liên quan với đáp ứng thứ nhất được đo. Trong đường dẫn thụ cảm quang học tế bào hình que, tốc độ phục hồi của sóng a (quá trình khởi nguồn từ thụ cảm quang học) phụ thuộc vào tốc độ bất hoạt. Đã nhận thấy rằng hệ số thời gian (σ) để phục hồi 50% biên độ sóng a được giảm khoảng 60% ở mắt của chuột *Cnga3*^{-/-} được tiêm rAAV2/8.CMV.mR9ap ($\sigma = \sim 2,99$ giây) so với mắt không được điều trị ($\sigma = \sim 7,38$ giây; Fig.4C). Tương tự, tốc độ tăng lên của quá trình phục hồi sóng a được quan sát bằng cách sử dụng trình tự khởi đầu rodopsin (rAAV2/8.Rho.mR9ap; $\sigma = \sim 2,74$ giây; Fig.4C) trong cùng 1 dòng chuột (*Cnga3*^{-/-}) hoặc cùng virus (rAAV2/8.CMV.mR9ap) trong dòng chuột thiếu tế bào hình nón khác (Pde6c^{-/-}; Fig.8). Các quan sát này chỉ ra rằng việc tiêm dưới võng mạc rAAV2/8.CMV.mR9ap hoặc rAAV2/8.Rho.mR9ap có thể tăng đáng kể tốc độ làm bất

hoạt quá trình chuyển đổi quang học tế bào hình que thông qua việc tăng mức RGS9 và phức hợp GTPaza.

Ví dụ 7 - “Sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của chức năng tế bào hình que bởi sự biểu hiện quá của R9AP

Để nghiên cứu liệu tốc độ bất hoạt tăng lên đạt được bởi sự biểu hiện quá của R9AP và phức hợp GTPaza trong các tế bào hình que có thể làm thay đổi phạm vi hoạt động của chức năng của thụ cảm quang học hay không, các ERG nhấp nháy 6 Hz thích nghi với bóng tối được ghi lại bằng cách sử dụng cường độ chớp sáng gia tăng. Mắt được điều trị bằng rAAV2/8.CMV.mR9ap hoặc rAAV2/8.Rho.mR9ap cho thấy các phản ứng với chớp sáng chói nhất tăng lên so với mắt không được điều trị. Điều này dẫn đến sự tăng ngưỡng bên trên của đáp ứng tối đa khoảng 2 log đơn vị (Fig.5A), với tác động ít lên đáp ứng quang học tối đa ($151 \pm 17 \mu V$ trong mắt được điều trị so với $162 \pm 29 \mu V$ trong mắt không được điều trị; giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của trung bình số học). Như mong đợi, “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” này trong phạm vi hoạt động của các tế bào hình que được đi kèm bởi sự tăng tương ứng ngưỡng dưới của đáp ứng lên đến khoảng 1,5 log đơn vị. Trong khi, ngưỡng bên trên của các đáp ứng ERG của mắt của chuột hoang và mắt của chuột *Gnat1*^{-/-}, cả với chức năng của các tế bào hình nón, được tăng $\sim 4,0$ log đơn vị so với mắt không được điều trị của chuột *Cnga3*^{-/-}. Các kết quả tương tự thu được khi rAAV2/8.Rho.mR9ap được tiêm vào chuột *Pde6c*^{-/-} (Fig.9). Kết quả là, phương pháp điều trị cho phép các tế bào hình que đáp ứng với các chớp sáng của các khoảng thời gian dài hơn (Fig.5B) và với các chớp sáng dưới sự chiếu sáng nền cô lập bởi tế bào hình nón (Fig.5C). Các phương pháp này bao gồm các điều kiện trong đó các tế bào hình que không được điều trị cho thấy hầu như không có đáp ứng.

Cùng với nhau, các kết quả này thể hiện rằng sự biểu hiện quá của R9AP trong các tế bào hình que dẫn đến sự mất nhạy của chúng và giúp cho các tế bào đạt được chức năng thích ứng ánh sáng trong quá trình trao đổi đối với chức năng dạ thị. Sự cảm ứng có tính trị liệu này của “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của chức năng của tế bào hình que kéo dài ít nhất trong 5 tháng mà không có dấu hiệu rõ ràng của sự thoái hóa của võng mạc (Fig.10). Trong khi, quá trình điều trị cho chuột hoang bằng cách sử dụng cùng các vector virus không cho thấy quá trình thay đổi đo được về chức năng của võng mạc (Fig.11).

Ví dụ 8 – Con đường lưỡng cực tế bào hình que điều tiết việc truyền chức năng tế bào hình que thay đổi.

Việc này đã xác lập rằng sự biểu hiện quá của R9AP trong các tế bào hình que dẫn đến động học bất hoạt thụ cảm quang học nhanh hơn và cho phép noron đáp ứng với lượng lớn photon. Trong khi đó, việc làm bất hoạt tăng nhanh cũng cần dẫn đến khoảng thời gian ngắn hơn của quá trình giải phóng chất dẫn truyền thần kinh ở các đầu cuối của synap thụ cảm quang học. Do đó, được đánh giá liệu tín hiệu lưỡng cực của tế bào hình que xuôi dòng có được tác động bởi phương pháp điều trị hay không. Trước tiên, tốc độ và phạm vi của quá trình truyền của các tín hiệu từ thụ cảm quang học đến các tế bào lưỡng cực đến chớp sáng đơn ngắn được nghiên cứu bằng cách đo thời gian ẩn và biên độ của sóng a (nguồn gốc từ thụ cảm quang học) và sóng b (nguồn gốc từ các tế bào lưỡng cực) bằng cách sử dụng ERG (Fig.6a). Nhìn chung, hơi nhỏ hơn nhưng đường cong cường độ-đáp ứng gần giống được quan sát cho mắt được điều trị và không được điều trị cho cả sóng a và sóng b. Sự khác biệt nhỏ được quan sát có thể phản ánh hoặc hệ quả thực của việc làm bất hoạt thụ cảm quang học tăng nhanh hoặc chỉ đơn thuần gây ra thiệt hại về thần kinh bởi việc tiêm dưới võng mạc. Thời gian ẩn của sóng a biểu thị điểm mà tại đó sóng b điều khiển tế bào lưỡng cực trở nên có thể phát hiện được. Các tác giả sáng chế cũng quan sát thấy sự trì hoãn nhỏ trong thời gian ẩn của sóng a và sóng b, cho thấy việc trì hoãn bình thường có trong quá trình truyền tín hiệu thần kinh từ thụ cảm quang học đến các tế bào lưỡng cực. Tuy nhiên, biến đổi tương đối lớn của các đáp ứng ERG giữa các cá thể chỉ ra sự trì hoãn nhỏ hoặc sự giảm bớt ở đáp ứng của tế bào hình que không nhất thiết chuyển thành sự loạn chức năng thị giác (Birch và Anderson 1992).

Do đó, các kết quả này chỉ ra rằng, về nguyên tắc, các tế bào lưỡng cực gần như hoàn toàn thích ứng với sự thay đổi của chức năng thụ cảm quang học và, quan trọng là, hiển thị mối quan hệ liều dùng - đáp ứng thích hợp.

Ví dụ 9 – Sự biểu hiện quá R9AP dẫn đến chức năng nhạy tương phản được cải thiện

Tiếp theo, được quan tâm là liệu “sự thay đổi thích ứng ánh sáng” của chức năng của tế bào hình que bởi sự biểu hiện quá của R9AP có được chuyển thành chức năng thị giác được cải thiện dưới ánh sáng hay không bằng cách đo đáp ứng về thị lực với đáp ứng các cách tử hình sin chuyển động quay trong điều kiện giá trị ghi chói nhất khả thi

với màn hình máy tính tiêu chuẩn (62 cd/m^2) (Carvalho et al., 2011). Lợi thế đặc trưng của thử nghiệm hành vi này là chức năng thị giác của mỗi mắt có thể được nghiên cứu riêng lẻ; chức năng của mắt phải có thể được thăm dò bởi các đáp ứng với các cách tử ngược chiều kim đồng hồ (CCW) và mắt trái bởi tác nhân kích thích theo chiều kim đồng hồ (CW) (Douglas et al., 2005). Chức năng nhảy tương phản không gian (CSF) được nghiên cứu bằng một tần số thời gian cố định 6,0 Hz và phát hiện ra rằng chuột *Cnga3*^{-/-} giảm CSF so với chuột hoang (Fig.7). CSF, chức năng của nhảy tương phản và độ tinh của thị lực, hiển thị phạm vi ước tính của sự cảm nhận thị lực (động vật có thể cảm nhận các cách tử dưới đường cong nhưng không ở bên trên; Fig.7A). Bất ngờ là, sự tăng độ nhạy gấp 8,0 ($P = 0,005$) và gấp 5,4 ($P = 0,011$) bằng cách sử dụng các cách tử của cả 0,128 và 0,256 chu kỳ/độ (c/d), tương ứng, được quan sát khi độ nhạy tương phản của mắt được điều trị và không được điều trị được so sánh (Fig.7A bảng bên trái). Không có sự thay đổi rõ ràng của độ nhạy tương phản được quan sát cho các cách tử 0,383 ($P = 0,056$) và 0,511 ($P = 0,111$) c/d. Thú vị là, độ nhạy trung bình của mắt được điều trị ở chuột *Cnga3*^{-/-} vượt quá đôi chứng kiểu đại với chức năng tế bào hình nón bình thường. Tuy nhiên, khi chuột hoang được điều trị bằng cấu trúc của virus giống nhau, CSF không khác nhau giữa mắt được điều trị và không được điều trị (Fig.12).

Đã xác lập rằng việc biểu hiện quá R9AP dẫn đến việc đạt được chức năng thị giác khi quan sát các cài đặt màn hình sáng tối đa, sự biểu hiện quá của R9AP được tìm kiếm để xác định liệu thị lực đạt được này có thể bền vững hay không. Biết chắc rằng quá trình phục hồi sắc tố thị giác trong các tế bào hình que được biết là chậm hơn đáng kể so với của các tế bào hình nón (Wang và Kefalov 2011). Thứ nhất, được đánh giá là liệu việc điều trị có dẫn đến sự thay đổi tốc độ làm mất màu sắc tố thị giác hay không. Đã phát hiện ra rằng sự tiếp xúc của mắt được điều trị và không được điều trị với ánh sáng chói trong 5 phút đã không mang lại sự khác biệt bất kỳ nào ở các mức sắc tố thị giác có thể mất màu còn lại (Fig.7B bảng dưới bên trái). Thứ hai, lượng rodopsin mất màu trong mắt được nghiên cứu sau khi cho chuột *Cnga3*^{-/-} tiếp xúc trong một lượng thời gian biến đổi với cùng điều kiện thử nghiệm được thực hiện cho phép đo CSF. Các kết quả cho thấy mức sắc tố thị giác vẫn ổn định mà không có dấu hiệu giảm trong suốt 2 giờ tiếp xúc với các tác nhân kích thích thị giác tương ứng cho mắt được điều trị và không được điều trị (Fig.7B bảng dưới bên phải). Các kết quả này chỉ ra rằng việc đạt

được sự cảm nhận thị giác ở chuột *Cnga3*^{-/-} đã điều trị được hỗ trợ bằng việc cung cấp đủ phân tử rodopsin và là bền vững.

Tài liệu tham khảo

- Curcio, C.A., *et al.* *The Journal of comparative neurology* 292, 497-523 (1990).
- Dryja, T.P. *American journal of ophthalmology* 130, 547-563 (2000).
- Hess, R.F. & Nordby, K. *The Journal of physiology* 371, 365-385 (1986).
- Nishiguchi, K.M., *et al.* *Human mutation* 25, 248-258 (2005).
- Kohl, S., *et al.* *Nature genetics* 19, 257-259 (1998).
- Chang, B. *et al.* *P.N.A.S* 106, 19581-19586 (2009).
- Thiadens, A.A., *et al.* *American journal of human genetics* 85, 240-247 (2009).
- Burns, M.E. & Pugh, E.N. *Biophys J* 97, 1538-1547 (2009).
- Burns, M.E. & Pugh, E.N. *Physiology* 25, 72-84 (2010).
- Baseler, H.A., *et al.* *Nature neuroscience* 5, 364-370 (2002).
- Martemyanov, K.A. & Arshavsky, V.Y. *Prog Mol Biol Transl* 86, 205-227 (2009).
- Krispel, C.M., *et al.* *Neuron* 51, 409-416 (2006).
- Cowan, C.W., *et al.* *P.N.A.S.* 95, 5351-5356 (1998).
- Zhang, X., Wensel, T.G. & Kraft, T.W. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 1287-1297 (2003).
- Nishiguchi, K.M., *et al.* *Nature* 427, 75-78 (2004).
- Michaelides, M., *et al.* *Ophthalmology* 117, 120-127 e121 (2010).
- Han, X. *et al.* *Front Syst Neurosci.* 5, 18 (2011).
- Busskamp, V., *et al.* *Science* 329, 413-417 (2010).
- Fu, Y., Yau, K.W. *Pflugers Arch.* 454, 805-819 (2007).
- Pugh, E.N. Jr *et al.* *Curr Opin Neurobiol.* 9, 410-418 (1999).
- de Jong, P.V.T.M. *N Engl J Med* 355, 1474-1485 (2006).
- Wässle, H. *Nat Rev Neurosci.* 5, 747-757 (2004).
- Soucy, E. *et al.* *Neuron* 21, 481-493 (1998).
- Hack, I. *et al.* *P.N.A.S.* 96, 14130-14135 (1999).

- Li, W. *et al. Nat Neurosci* 13, 414-416 (2010).
- Biel, M. *et al. P.N.A.S.* 96, 7553-7557 (1999).
- Umino, Y. *et al. J Neurosci* 28, 189-198 (2008).
- Cangiano, L. *et al. J Physiol.* 590, 3841-3855 (2012).
- Berndt, A. *et al. Science* 344, 420-424 (2014).
- Wietek, J. *et al. Science* 344, 409-412 (2014).
- Calvert, P.D. *et al. P.N.A.S* 97, 13913-13918 (2000).
- Gao, G.P. *et al. P.N.A.S* 99, 11854-11859 (2002).
- Lyubarsky, A.L., *et al. Vision research* 44, 3235-3251 (2004).
- Weymouth, A.E. & Vingrys, A.J. *Progress in retinal and eye research* 27, 1-44 (2008).
- Seeliger, M.W., *et al. Nature genetics* 29, 70-74 (2001).
- Douglas, R.M., *et al. Visual neuroscience* 22, 677-684 (2005).
- Douglas, R.H., *et al. Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 177, 111-122 (1995).
- Longbottom, R., *et al. P.N.A.S.* 106, 18728-18733 (2009).
- Lyubarsky, A.L. & Pugh, E.N., Jr. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 563-571 (1996).
- Birch, D.G. & Anderson, J.L. *Archives of ophthalmology* 110, 1571-1576 (1992).
- Carvalho, L.S., *et al. Human molecular genetics* 20, 3161-3175 (2011).
- Wang, J.S. & Kefalov, V.J. *Progress in retinal and eye research* 30, 115-128 (2011).
- Taylor, A. W., Ocular immune privilege, *Eye*, 23, 1885-1889 (2009).
- Natkunarah, M. *et al.*, Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8, *Gene Ther.* 15, 463-467 (2008).
- Choi, V. W. *et al.*, AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery, *Curr. Gene Ther.*, 5, 299-310 (2005).

Wu, Z. *et al.*, Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy, *Mol. Ther.*, 14, 316-327 (2006).

Chuong, A.S. *et al.*, Non-invasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin, *Nat Neurosci.*, 17, 1123-1129 (2014).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vectơ virus kết hợp adeno (AAV) chứa axit nucleic mã hóa sản phẩm gen nhạy sáng và/hoặc điều biến quá trình truyền tín hiệu nhạy sáng nội sinh trong tế bào thụ cảm quang học, sao cho phạm vi cường độ ánh sáng mà thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng được mở rộng và/hoặc tốc độ mà tại đó thụ cảm quang học tế bào hình que đáp ứng với ánh sáng được làm tăng lên,

trong đó:

sản phẩm gen là ArchT hoặc R9AP, và trong đó axit nucleic được liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu đặc hiệu thụ cảm quang học hoặc ưu tiên thụ cảm quang học; và

capsit của vectơ AAV có nguồn gốc từ AAV8.

2. Vectơ virus kết hợp adeno (AAV) theo điểm 1, trong đó hệ gen của vectơ AAV có nguồn gốc từ AAV2.

3. Vectơ virus kết hợp adeno (AAV) theo điểm 1 hoặc 2, trong đó axit nucleic được biểu hiện dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu đặc hiệu tế bào hình que.

4. Vectơ virus kết hợp adeno (AAV) theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó axit nucleic được biểu hiện dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu Rhodopsin (Rho), protein khóa kéo leuxin đặc hiệu võng mạc thần kinh (NRL) hoặc phosphodiesteraza 6B (PDE6B).

5. Tế bào chủ chứa vectơ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

6. Dược phẩm chứa vectơ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

1/12

Fig. 1a

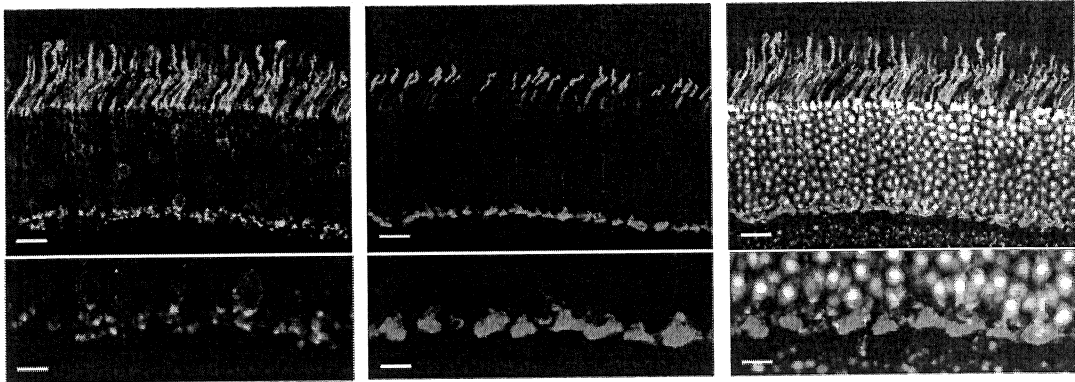


Fig. 1b



Fig. 1c

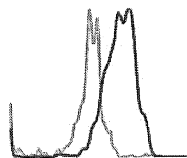
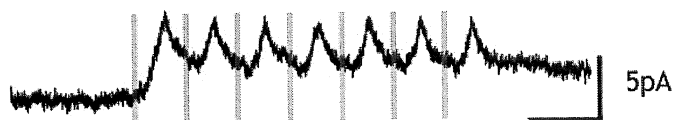
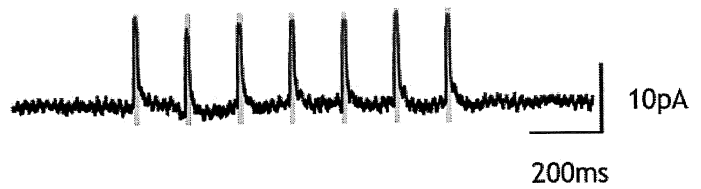


Fig. 1d

Được làm thích
nghi với bóng tối + 9cis



Được điều tiết ArchT



2/12

Fig. 2a

C57BL6, Chưa được tiêm

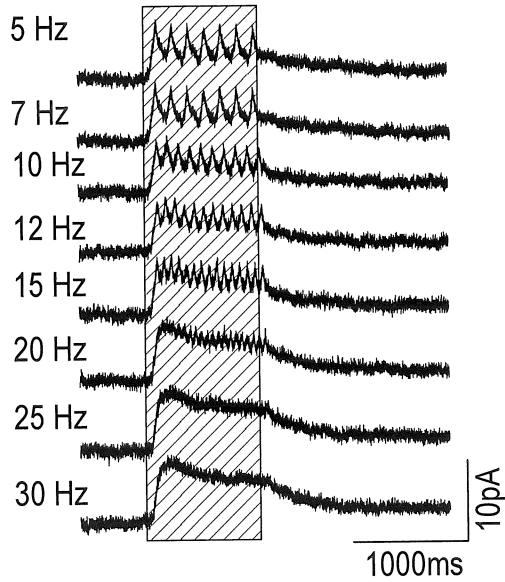


Fig. 2b

PDE6C, archT

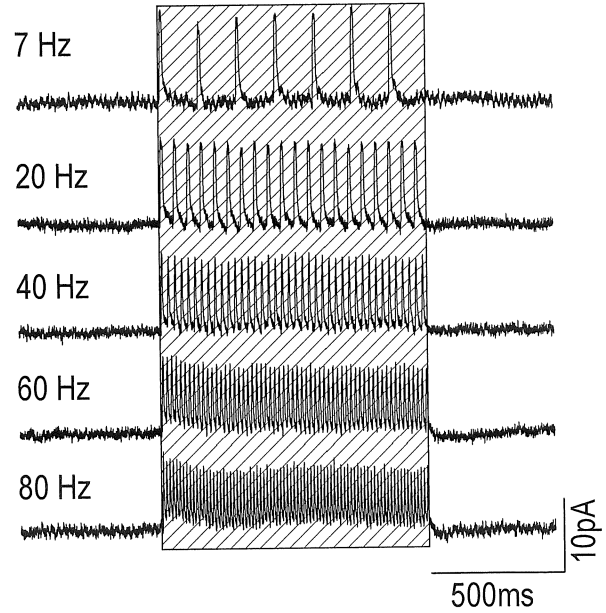


Fig. 2c

80 Hz, 5ms cường độ xung

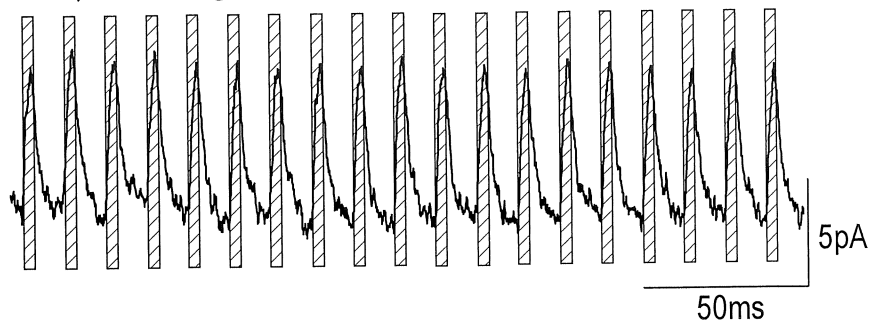
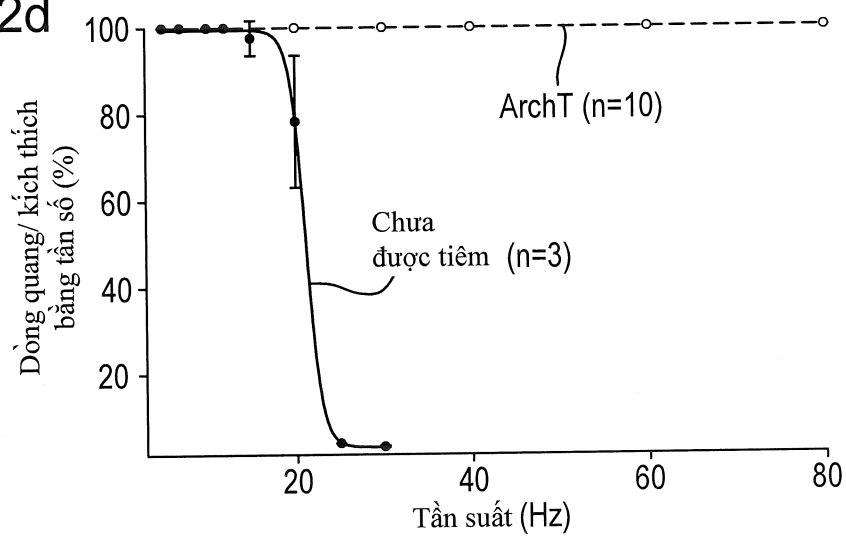


Fig. 2d



3/12

Fig. 2e

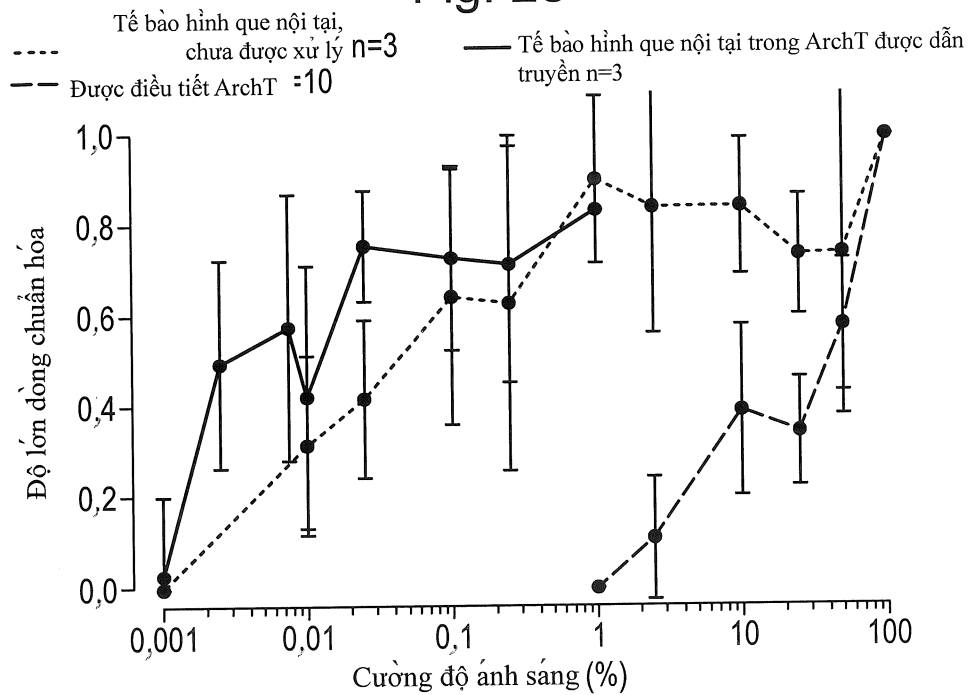
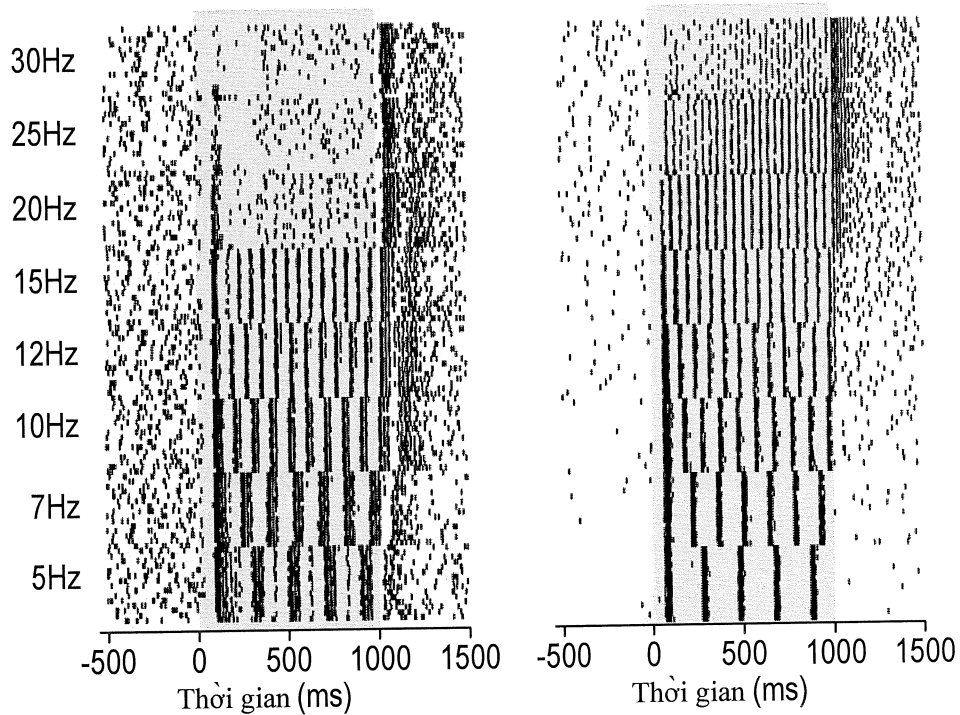


Fig. 2f

được xử lý PDE6C ArchT

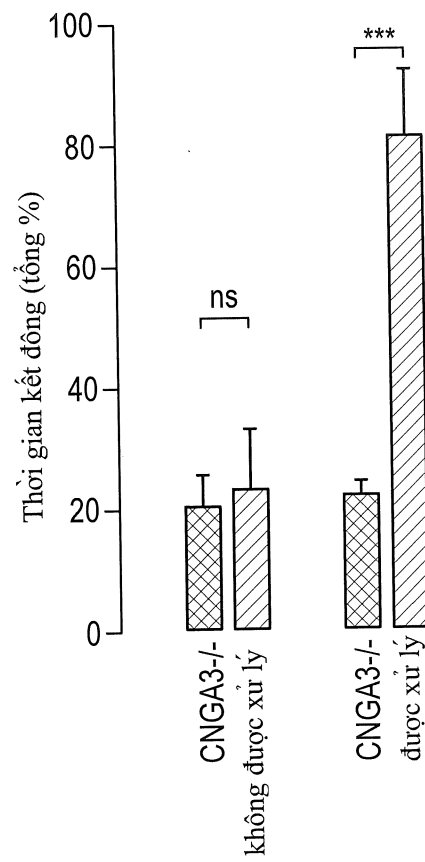
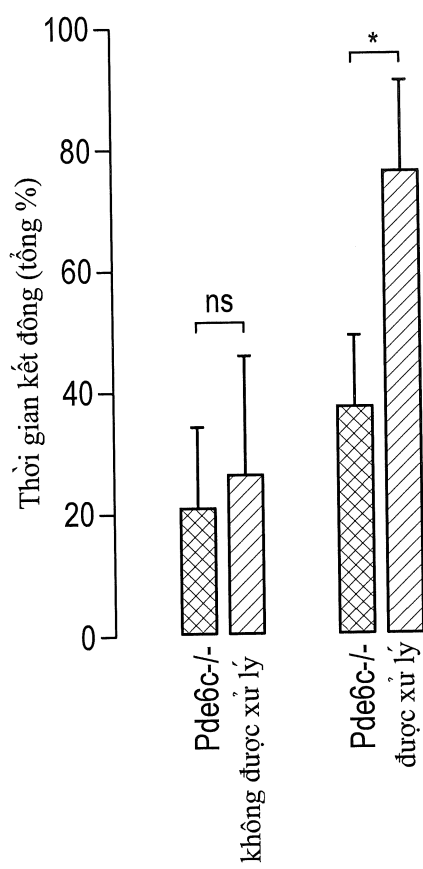
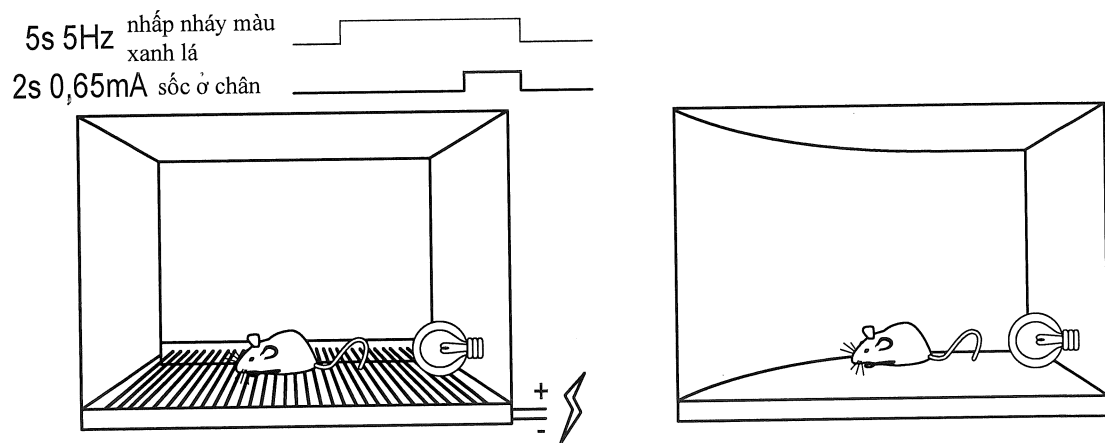
Được làm thích nghi với bóng tối, 9-cis,
0,01% cường độ ánh sáng

Được làm thích nghi với ánh sáng, 100% cường độ ánh sáng



4/12

Fig. 3a



5/12

Fig. 3b

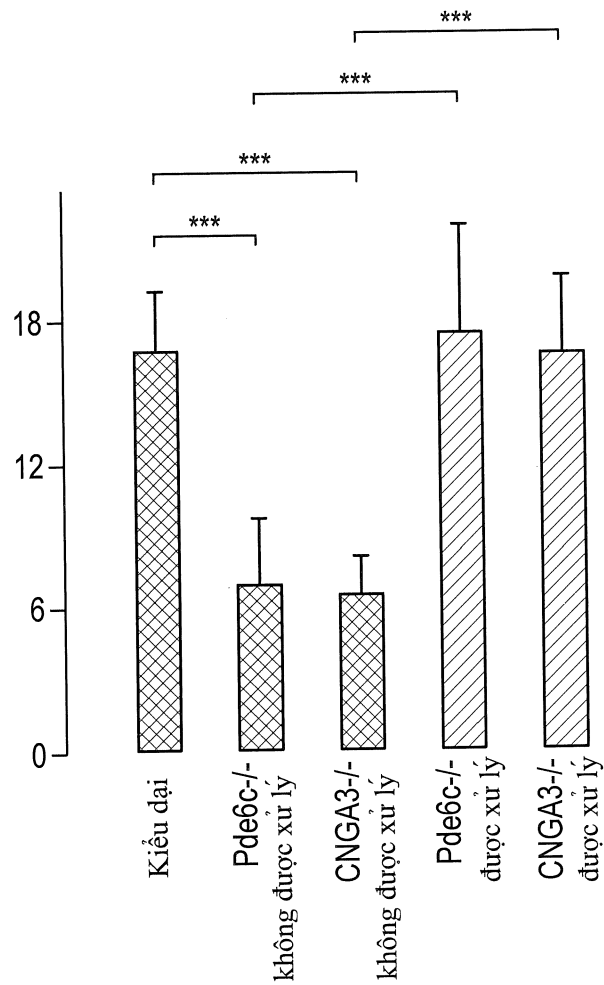
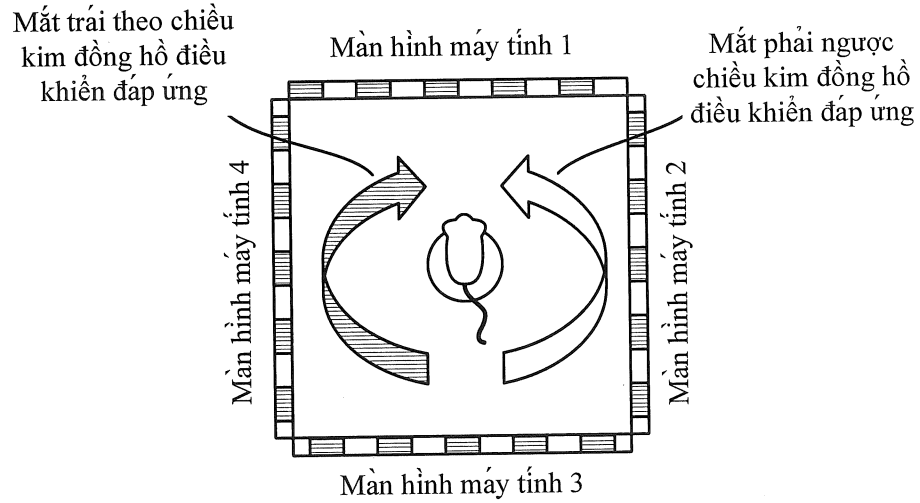


Fig. 4a

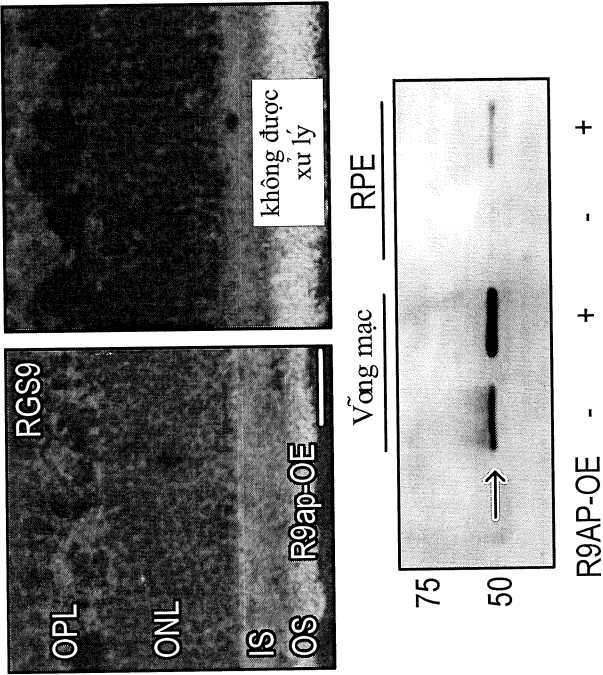
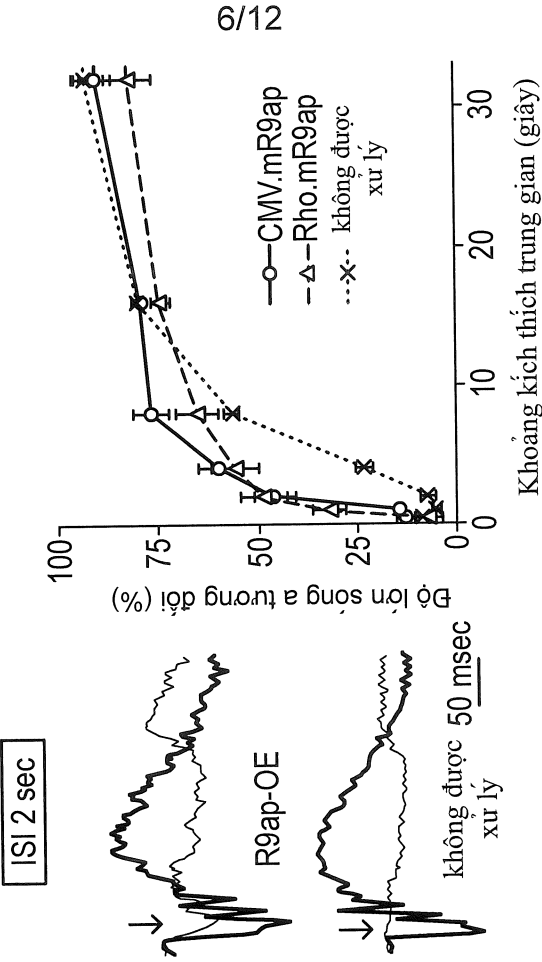


Fig. 4b



7/12

Fig. 5a

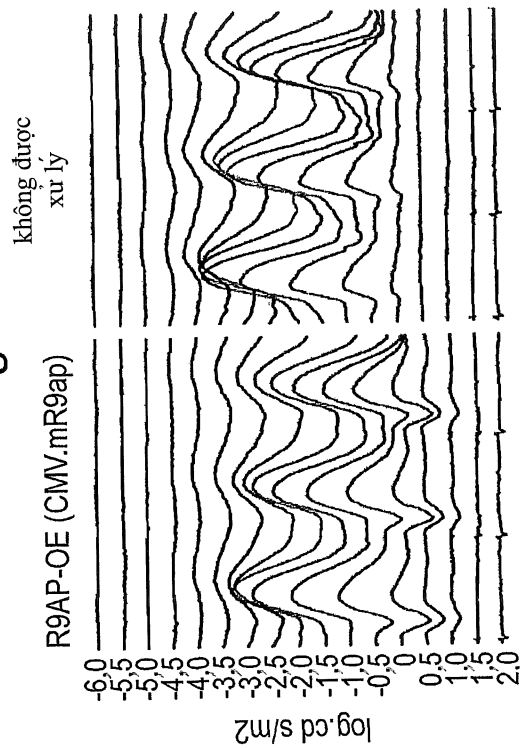


Fig. 5b

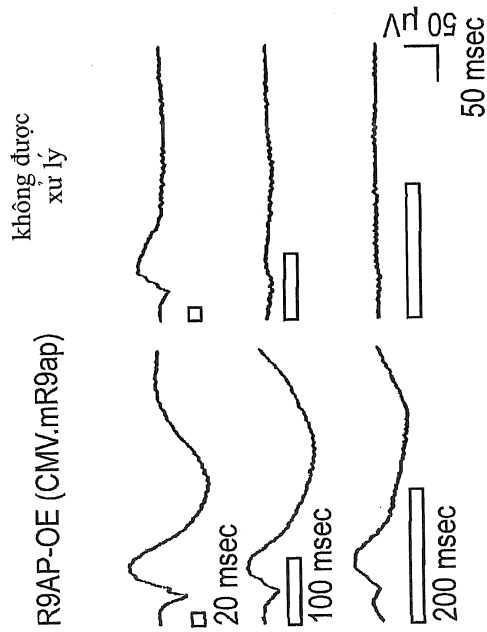
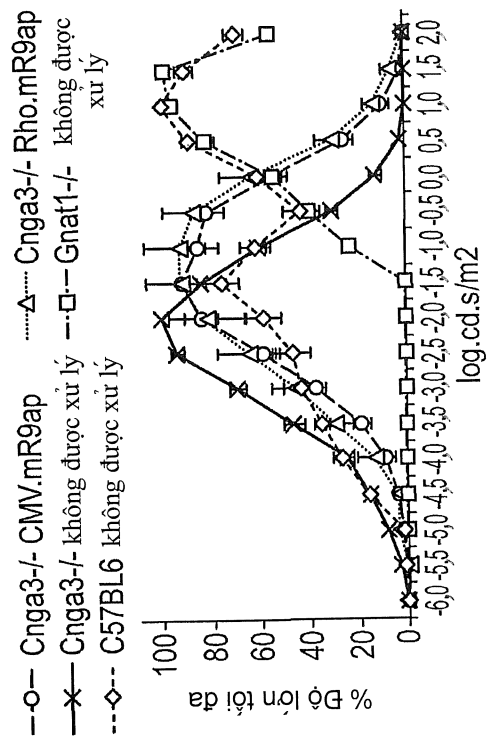
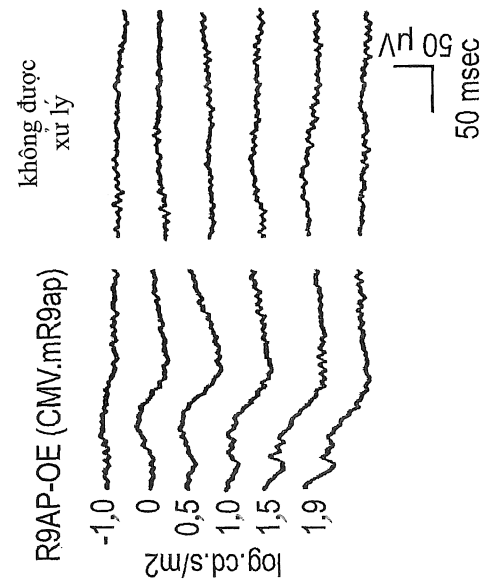


Fig. 5c



8/12

Fig. 6a

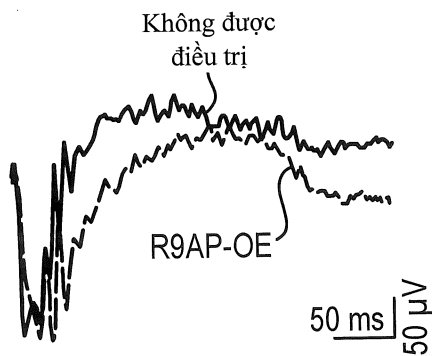


Fig. 6b

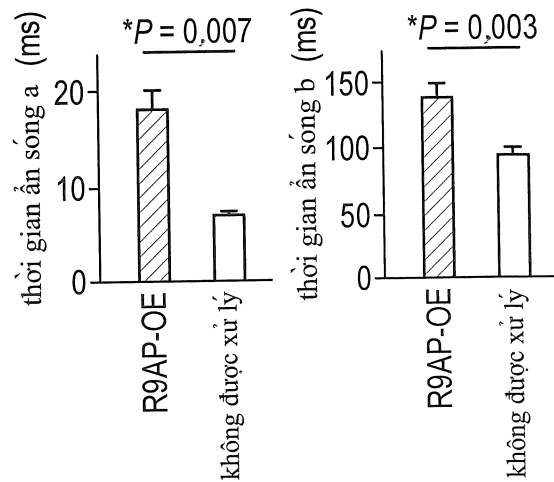
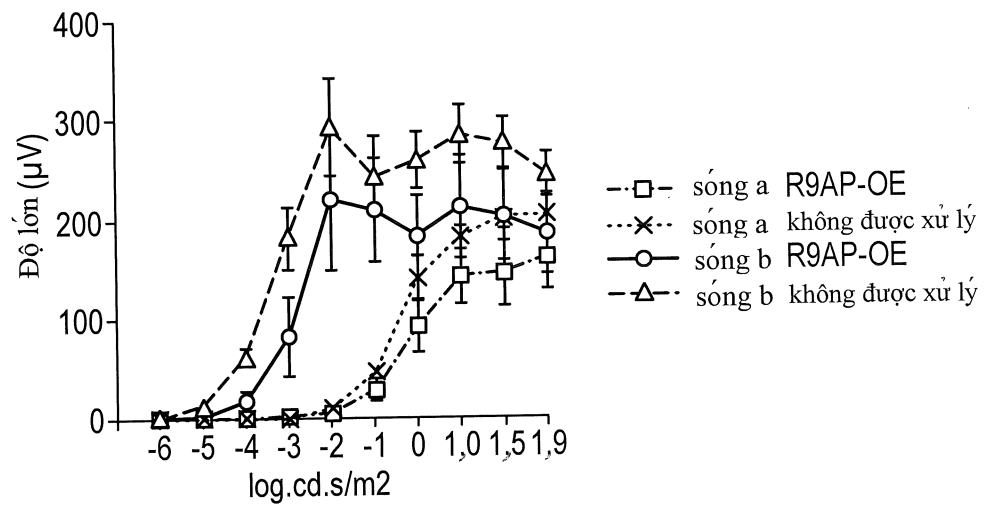


Fig. 6c



9/12

Fig. 7b

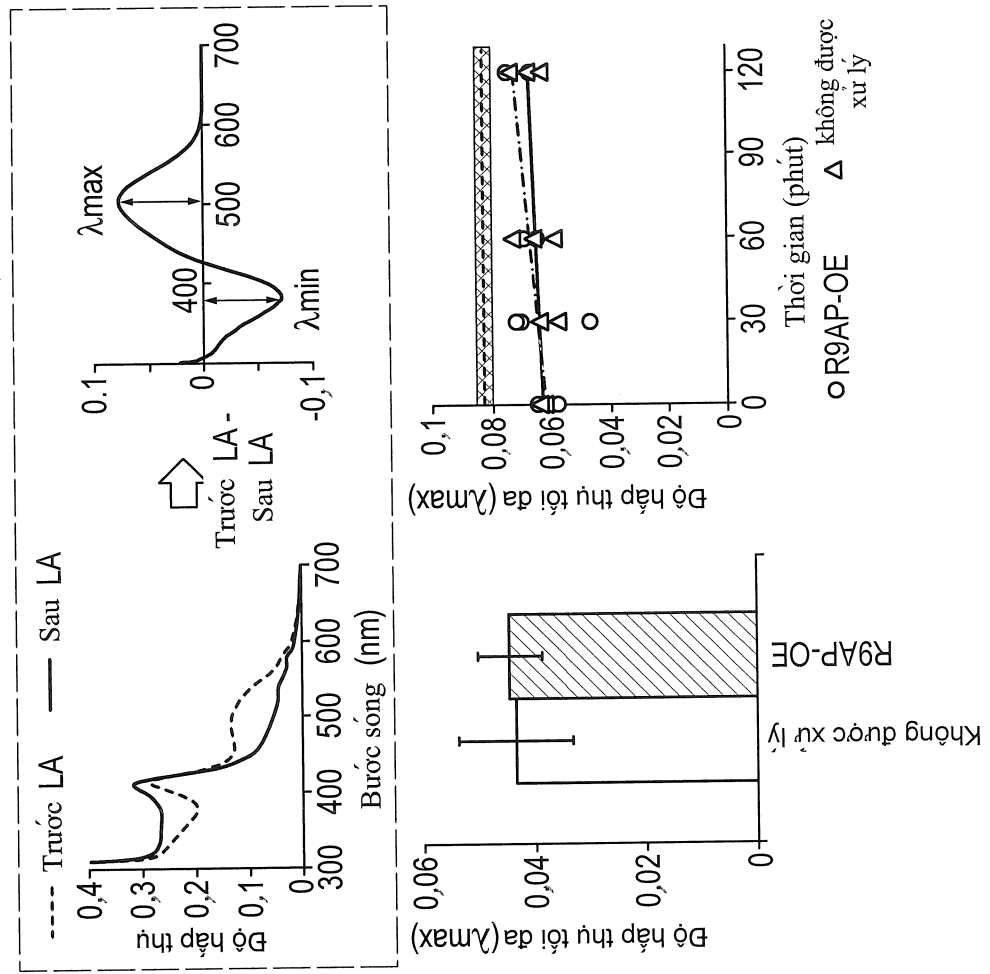
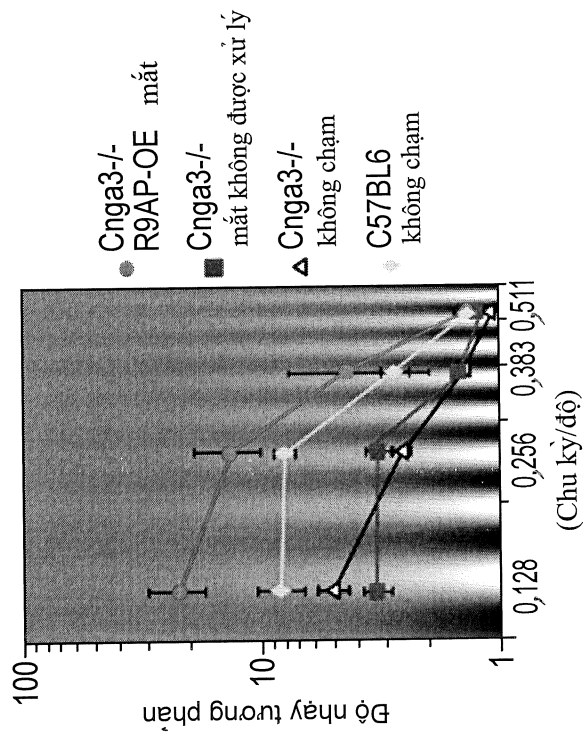
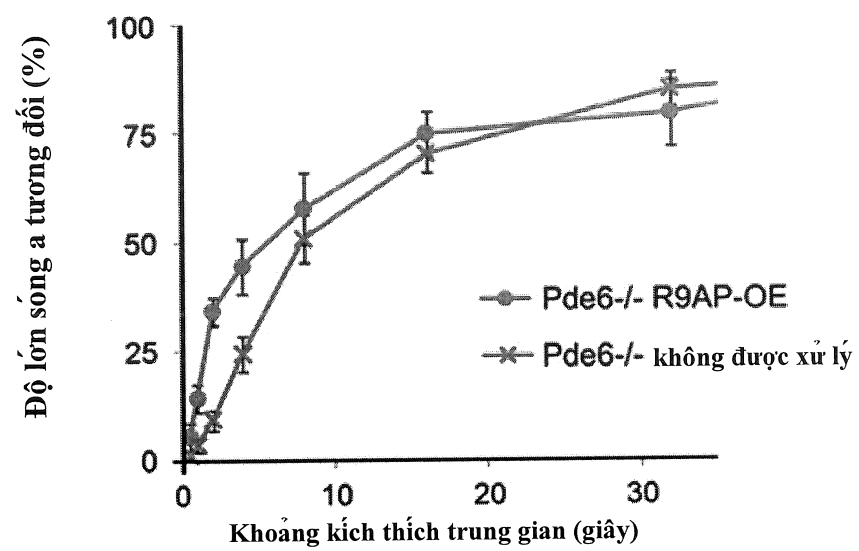


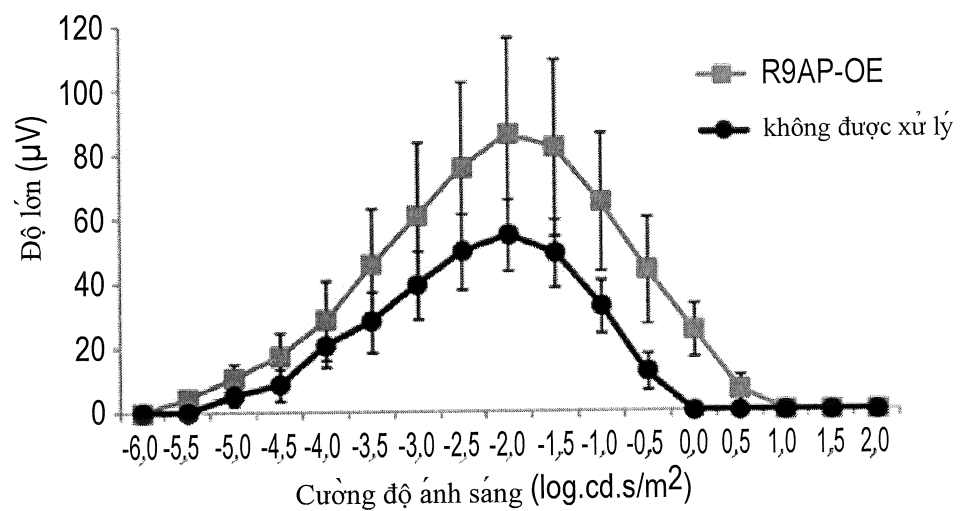
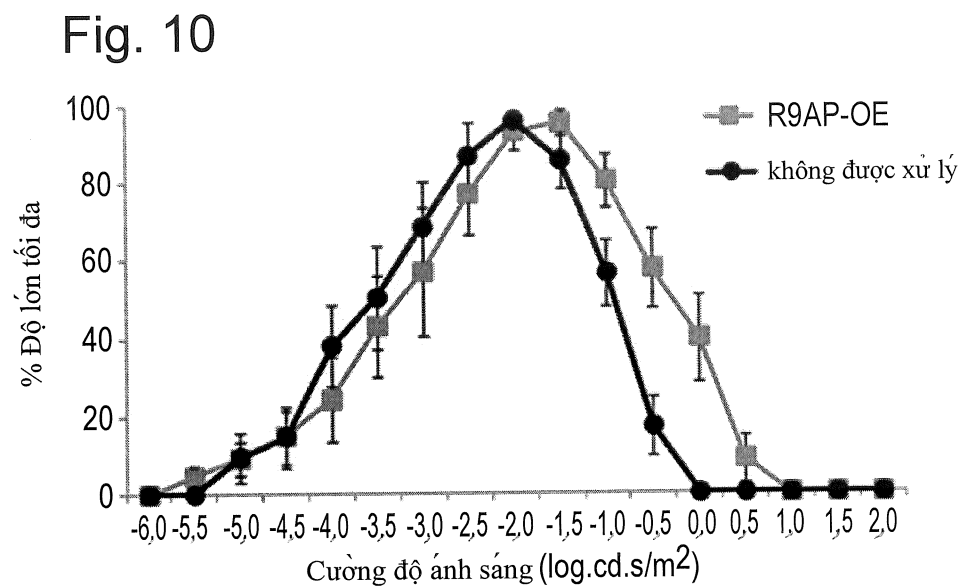
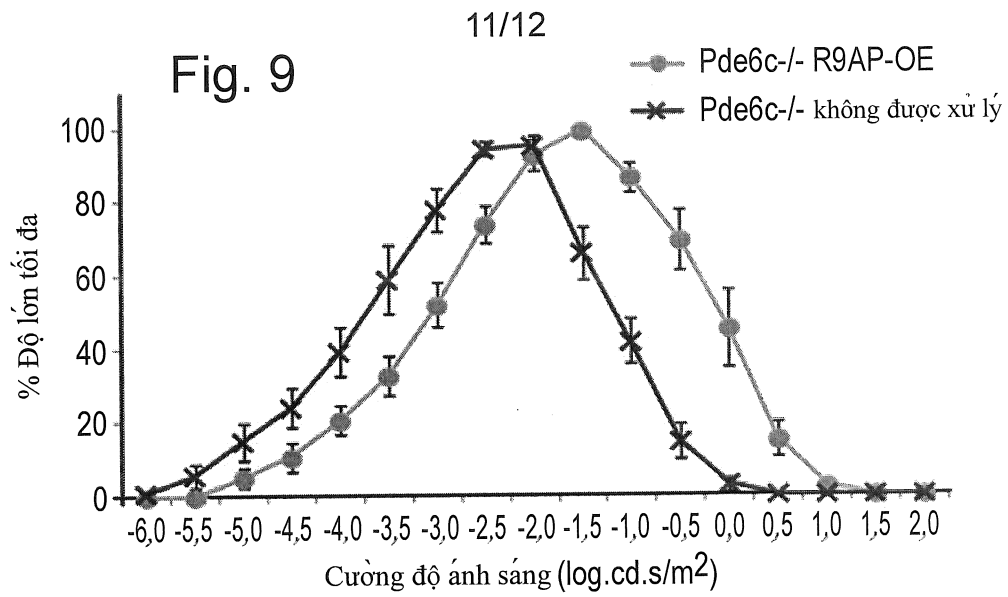
Fig. 7a



10/12

Fig. 8





12/12

Fig. 11

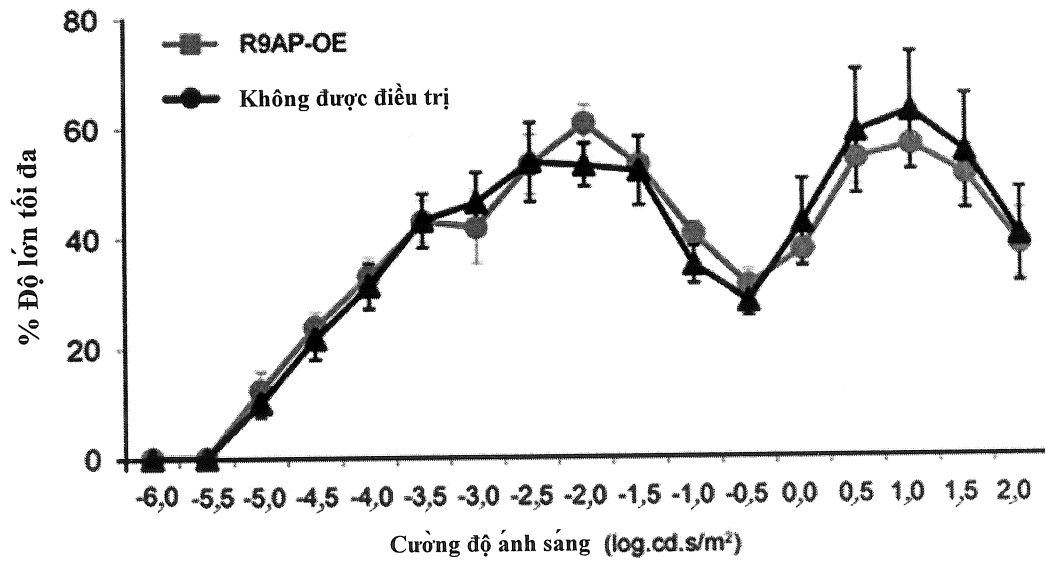


Fig. 12

