



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

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



1-0053113

(51)<sup>2020.01</sup> C12N 15/63; C12N 15/861; A61K 48/00 (13) B

(21) 1-2020-03443

(22) 15/11/2018

(86) PCT/US2018/061319 15/11/2018

(87) WO 2019/099696 23/05/2019

(30) 62/586,624 15/11/2017 US

(45) 25/11/2025 452

(43) 26/04/2021 397A

(73) 1. THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (US)

Office of Technology Transfer, 1600 Huron Parkway, 2nd Floor, Ann Arbor, MI  
48109-2590, United States of America

2. UCL BUSINESS LTD (GB)

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

(72) THOMPSON, Debra A. (US); ALI, Robin R. (GB); SMITH, Alexander J. (NL).

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

(54) VECTƠ VIRUT KẾT HỢP AĐENO VÀ TẾ BÀO CHỦ ĐƯỢC PHÂN LẬP CÓ  
CHỨA VECTƠ VIRUT KẾT HỢP AĐENO NÀY

(57) Sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa cho ADN RDH12 người. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất vectơ virus kết hợp adeno có chứa axit nucleic này để điều trị tình trạng nhãn khoa chẳng hạn như Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber, bao gồm virus kết hợp adeno AAV2, kiểu huyết thanh 5 (AAV 2/5) hoặc AAV-5 có chứa vùng mã hóa có thể biểu hiện đối với RDH12 người.



**Fig. 1**

## THAM KHẢO CHÉO ĐẾN CÁC ĐƠN LIÊN QUAN

Đơn này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên của đơn đăng ký sáng chế tạm thời Mỹ Số 62/586,624, nộp ngày 15 tháng 11 năm 2017, được kết hợp ở đây nhằm mục đích tham khảo.

## KẾT HỢP ĐỀ THAM KHẢO CỦA TÀI LIỆU ĐƯỢC NỘP THEO HÌNH THỨC ĐIỆN TỬ

Đơn này chứa, dưới dạng phân riêng rẽ của bản bộc lộ, Danh Mục Trình Tự ở dạng đọc được trên máy tính (tên tệp: 51914A\_Seqlisting.txt; được tạo ra vào ngày 9 tháng 11 năm 2018; 5.230 byte— tệp văn bản ASCII), mà được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó.

## Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị y học, chẳng hạn như phương pháp để điều trị đối tượng người mắc tình trạng nhãn khoa, *ví dụ*, bệnh mù lòa bẩm sinh Leber, do ít nhất một đột biến mất chức năng ở gen mã hóa protein Retinol Dehydrogenaza 12 (RDH12 - Retinol Dehydrogenase 12), phương pháp này có chứa việc dùng cho đối tượng lượng hữu hiệu của axit nucleic có chứa vector virus kết hợp adeno có chứa ADN bổ sung (cDNA - complementary DNA) *RDH12* người.

## Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh võng mạc di truyền (IRD - Inherited Retinal Disease) là nguyên nhân hàng đầu của bệnh mù theo luật định ở trẻ em. Bệnh mù lòa bẩm sinh Leber (LCA - Leber congenital amaurosis) và chứng loạn dưỡng võng mạc nghiêm trọng khởi phát sớm (EOSRD - early-onset severe retinal dystrophy) dẫn đến suy giảm thị lực nghiêm trọng bắt đầu từ khi sơ sinh cho đến một vài tuổi, và cùng nhau chiếm đến 5% hoặc hơn trong số tất cả IRD (Koenekoop et al. 2004). LCA/EOSRD có liên quan đến phương thức di truyền trội nhiễm sắc thể thường và lặn nhiễm sắc thể thường, bao gồm biểu mô sắc tố võng mạc và tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng hình que và hình nón làm các đích (Weleber et al. 2013). Xấp xỉ 10% LCA/EOSRD bị gây ra bởi đột biến ở gen mã hóa RDH12 (Kumaran et al. 2017). Với vai trò của RDH12 trong chu kỳ thị giác mà cung cấp

chất mang màu cho tế bào nhận kích thích ánh sáng (Haeseleer et al. 2002; Chen et al. 2012), và đóng góp đích trị liệu thiết yếu, *RDH12* là một trong số các gen LCA quan trọng nhất.

Bất chấp sự phổ biến của tình trạng nhãn khoa chẳng hạn như bệnh võng mạc di truyền ở người và động vật có vú không phải người, và hiểu biết về gen mã hóa retinol dehydrogenaza cũng như là ảnh hưởng một số đột biến trong các gen đó có, chưa biết cách điều trị nào đối với LCA gây ra bởi một hoặc nhiều đột biến trong *RDH12*. Theo đó, trong lĩnh vực này vẫn cần có nguyên liệu và phương pháp hữu dụng để điều trị chứng loạn dưỡng võng mạc chẳng hạn như LCA cũng như là nguyên liệu và phương pháp hữu dụng để hiệu chỉnh các bất thường di truyền mà có thể dẫn đến chứng loạn dưỡng này.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất vector virus kết hợp adeno (AAV - Adeno-Associated Virus) có chứa vùng mã hóa cho sản phẩm gen của gen *RDH12*, gen mã hóa enzym retinol dehydrogenaza. Vector AAV có chứa *RDH12* hữu dụng trong việc điều trị rối loạn chứng loạn dưỡng võng mạc chẳng hạn như Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber (LCA) bằng cách cung cấp cấu trúc tái tổ hợp trong đó vùng mã hóa *RDH12* được đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi động điều chỉnh được, hoặc kiểm soát được, chẳng hạn như vùng khởi động khác loại, để cung cấp retinol dehydrogenaza bổ sung cho đối tượng thiếu hụt mức độ kiểu đại của hoạt tính RDH12, chẳng hạn như bắt nguồn từ đột biến trong *RDH12*. Mặc dù có ưu điểm là kích thước hệ gen tương đối nhỏ, khuynh hướng tích hợp vào ADN vật chủ tương đối thấp, và biên dạng gây miễn dịch tương đối thấp, đã bất ngờ phát hiện một số dạng kết hợp kiểu huyết thanh AAV, hoặc kiểu giả, tạo ra mức độ biểu hiện đối với sản phẩm RDH12 được mã hóa mà không hữu hiệu để điều trị và/hoặc thể hiện sự gây độc không mong muốn trong trường hợp dùng cho đối tượng để điều trị chứng loạn dưỡng võng mạc. Trùng hợp với phát hiện đó là việc phát hiện ra các kiểu giả nhất định, chẳng hạn như kiểu giả AAV2/5, chứng minh mức độ biểu hiện hiệu quả bất ngờ và đáng ngạc nhiên và biên dạng sự gây độc tương thích với việc sử dụng trị liệu để điều trị chứng loạn dưỡng võng mạc. Đối tượng mà có thể được điều trị bằng phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm đối tượng mà mất chức năng thị giác (ví dụ, thử nghiệm đáp ứng suy giảm trên điện đồ võng mạc (ERG - Electoretinogram)), chứ không phải đối tượng giữ lại một số tế bào nhận kích thích ánh sáng như được xác định bằng cách chụp cắt lớp quang học

(OCT - Optical Coherence Tomography). Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị đối tượng người mà mắc tình trạng nhãn khoa, chẳng hạn như Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber, hay LCA, hoặc tình trạng nhãn khoa khác đã được xác định về mặt lâm sàng, do một hoặc nhiều đột biến mất chức năng ở gen mã hóa cho protein Retinol Dehydrogenaza 12 (RDH12). Cụ thể hơn là, một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị đối tượng người mà mắc tình trạng nhãn khoa do một hoặc nhiều đột biến mất chức năng ở gen mã hóa cho protein Retinol Dehydrogenaza 12 (RDH12), phương pháp này có chứa việc dùng cho ít nhất một mắt của đối tượng vector virus kết hợp adeno có chứa axit nucleic, trong đó axit nucleic này có chứa ADN *RDH12* người, ví dụ, cADN *RDH12* người, và trong đó ADN *RDH12* (ví dụ, ADN *RDH12* người) mã hóa protein mà tương đồng ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc 99% với chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, tình trạng nhãn khoa là Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber (LCA). Theo một số phương án nêu trên, tình trạng nhãn khoa là Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber (LCA). Theo một số phương án, ADN *RDH12*, ví dụ, cADN *RDH12*, chịu sự kiểm soát biểu hiện của vùng khởi động rhodopsin kinaza 1 người (hGRK1 - Human Rhodopsin Kinase 1), chẳng hạn như trong đó vùng khởi động hGRK1 có chứa hoặc về cơ bản gồm có SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, vector virus kết hợp adeno là AAV-2, kiểu huyết thanh-5 (AAV2/5) hoặc AAV-5. Theo một số phương án, ADN *RDH12*, ví dụ, cADN *RDH12*, có chứa trình tự mà tương đồng ít nhất 60% hoặc 70% với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, axit nucleic được dùng ở độ chuẩn nằm trong khoảng từ khoảng  $2 \times 10^{10}$  hệ gen virus trong mỗi mili lít (vg/ml) đến khoảng  $2 \times 10^{12}$  vg/ml, ví dụ, độ chuẩn nằm trong khoảng từ khoảng  $2 \times 10^{10}$  hệ gen virus trong mỗi mili lít (vg/ml) đến khoảng  $2 \times 10^{12}$  vg/ml, chẳng hạn như khoảng  $2 \times 10^{11}$  vg/ml hoặc khoảng  $2 \times 10^{12}$  vg/ml. Theo một số phương án, axit nucleic được dùng vào không gian dưới võng mạc, ví dụ, trong đó ống tiêm vi tiêm được cài xen vào không gian dưới võng mạc.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa ADN *RDH12* người, ví dụ, cADN *RDH12* người, trong đó ADN *RDH12* người (ví dụ, ADN *RDH12* người chẳng hạn như cADN) mã hóa protein mà tương đồng ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc 99% với chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO:2, trong đó ADN *RDH12* chịu sự kiểm soát của vùng khởi động rhodopsin kinaza 1 người (hGRK1). Theo một số phương án, vùng khởi động hGRK1 có chứa hoặc về cơ bản gồm có SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, ADN *RDH12* người, ví dụ, cADN *RDH12* người, mã hóa protein có chứa SEQ ID NO:2.

Theo một số phương án, ADN *RDH12* người, ví dụ, cADN *RDH12* người, tương đồng ít nhất 60% hoặc 70% với chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 1.

Một khía cạnh khác nữa của sáng chế là axit nucleic như được bộc lộ trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị đối tượng người mà mắc tình trạng nhãn khoa do một hoặc nhiều đột biến mất chức năng ở gen mã hóa cho protein Retinol Dehydrogenaza 12 (*RDH12*). Theo một số phương án, tình trạng nhãn khoa là Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber (*LCA*).

Khía cạnh khác nữa của sáng chế là vector virus có chứa axit nucleic mã hóa *RDH12* như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vector virus là vector virus kết hợp adeno. Theo một số phương án, vector virus kết hợp adeno là AAV-2, kiểu huyết thanh-5 (AAV2/5) hoặc AAV-5.

Khía cạnh khác của sáng chế là vector virus như được bộc lộ trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị ở đối tượng người mắc tình trạng nhãn khoa do một hoặc nhiều đột biến mất chức năng ở gen mã hóa cho protein Retinol Dehydrogenaza 12 (*RDH12*). Theo một số phương án, tình trạng nhãn khoa là Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber (*LCA*).

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến tế bào chủ được phân lập có chứa vector virus như được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc axit nucleic như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào chủ được phân lập biểu hiện protein *RDH12* người.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học dùng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Phương pháp và nguyên liệu được mô tả tại đây để sử dụng trong sáng chế này; theo cách khác, phương pháp và nguyên liệu thích hợp đã biết trong lĩnh vực cũng có thể được sử dụng. Nguyên liệu, phương pháp, và ví dụ chỉ để minh họa và không nhằm làm giới hạn sáng chế. Tất cả các tài liệu công bố, đơn đăng ký sáng chế, bằng độc quyền sáng chế, trình tự, danh mục cơ sở dữ liệu, và các tài liệu tham khảo khác được viện dẫn trong bản mô tả này được kết hợp để tham khảo đến toàn bộ nội dung của chúng. Trong trường hợp có mâu thuẫn, bản mô tả này, bao gồm các định nghĩa, sẽ được áp dụng.

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết và hình vẽ sau đây, và từ các yêu cầu bảo hộ.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1. Hoạt tính RDH trong chu kỳ thị giác và tế bào nhận kích thích ánh sáng. (A) Chu kỳ thị giác chuyển hóa vitamin A thành võng mạc 11-*cis*, chất mang màu của sắc tố thị giác, và tái tuần hoàn võng mạc toàn bộ *trans* được giải phóng sau khi tẩy trắng. (B) Dòng retinoit được thể hiện đối với cặp tế bào nhận kích thích ánh sáng RPE. RDH8 trong đoạn phía ngoài có thể làm giảm võng mạc toàn bộ *trans*. RDH12 trong đoạn phía trong có thể làm giảm võng mạc toàn bộ *trans*, võng mạc 11-*cis*, và aldehyt chuỗi ngắn gây độc khác. Các chữ viết tắt: 11cRAL, võng mạc 11-*cis*; 11cROL, retinol 11-*cis*; AtRAL, võng mạc toàn bộ *trans*; AtROL, retinol toàn bộ *trans*; RCHO, aldehyt chuỗi ngắn; RCHOH, rượu chuỗi ngắn; Rh, rhodopsin; MRh, metarhodopsin.

Fig.2. Sự biểu hiện và sự định vị của RDH12 tái tổ hợp trong chuột được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. (A) Sơ đồ của cấu trúc trị liệu gen *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* trong đó cADN *RDH12* người được tách dòng xuôi dòng của vùng khởi động rhodopsin kinaza ở người, giữa trình tự đoạn lặp cuối đảo ngược có nguồn gốc từ hệ gen AAV2. (B, C) Sự biểu hiện của protein RDH12 người trong võng mạc chuột vào 6 tuần sau khi tiêm dưới võng mạc *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg) hoặc PBS, được đánh giá bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu đối với Rdh12 chuột hoặc RDH12 người. (B) Phân tích Western về dịch tan võng mạc từ chuột C57BL/6J, chuột *Rdh12*<sup>-/-</sup> được tiêm PBS, và vào chuột *Rdh12*<sup>-/-</sup> được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. (C) Phân tích hóa mô miễn dịch thể hiện sự định vị của Rdh12 chuột tự nhiên (màu xám đậm) vào IS, ONL, và OPL của võng mạc ở chuột C57BL/6J nhưng không ở chuột *Rdh12*<sup>-/-</sup>, trong khi RDH12 người tái tổ hợp (màu xám nhạt) bắt nguồn từ việc tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* thể hiện sự định vị tương tự ở cả chuột C57BL/6J và chuột *Rdh12*<sup>-/-</sup>. Hình ảnh tương phản pha (bên trái). Các chữ viết tắt: ITR, đoạn lặp cuối đảo ngược; hGRK1, vùng khởi động rhodopsin kinaza ở người; SD/SA, vị trí cho ghép nối/vị trí nhận ghép nối virus Khi 40; hRDH12, cADN RDH12 người; polyA, tín hiệu polyadenyl hóa virus Khi 40; RPE, sắc tố võng mạc biểu mô; OS, đoạn phía ngoài; IS, đoạn phía trong; ONL, lớp nhân phía ngoài; OPL, lớp rối phía ngoài; INL, lớp nhân phía trong; IPL, lớp rối phía trong; GCL, lớp tế bào hạch.

Fig.3. Liệu pháp thay thế gen *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* khôi phục chức năng RDH12 ở chuột thiếu *Rdh12*. (A) Phân tích HPLC của hoạt tính reductaza võng mạc trong võng mạc từ chuột C57BL/6J và *Rdh12*<sup>-/-</sup> được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg) hoặc PBS, hoặc không được tiêm. 6 tuần sau khi tiêm, sự tạo thành retinol toàn bộ *trans* được định lượng trong thử nghiệm với võng mạc toàn bộ *trans* làm cơ chất. Mỗi

điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn đối với tối thiểu 5 thí nghiệm độc lập mà võng mạc từ 3 đến 5 chuột được gom lại và thử nghiệm trong ba bản sao. ● C57BL/6J;  $\Delta$  *Rdh12*<sup>-/-</sup>;  $\diamond$  *Rdh12*<sup>-/-</sup> được tiêm PBS;  $\boxtimes$  *Rdh12*<sup>-/-</sup> được tiêm AAV. (B) Hóa mô miễn dịch của sự biểu hiện RDH12 tái tổ hợp trong toàn bộ phần võng mạc chuột *Rdh12*<sup>-/-</sup> được đánh giá 16 tuần sau khi tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. RDH12 người (màu xám nhạt) định vị vào IS, ONL, và OPL của vùng được tiêm của võng mạc (phía bên phải của ảnh).

Fig.4. Liệu pháp thay thế gen *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* làm giảm sự hư hỏng do ánh sáng ở chuột thiếu *Rdh12* bạch tạng. Phân tích ERG được tiến hành, một tuần trước khi và một tuần sau khi tiếp xúc với 5.000 luxơ trong thời gian 2 giờ, trên chuột mà được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* vào một mắt và không được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* vào mắt bên kia. Sự đáp ứng nhìn tối (tế bào hình que được phân lập và tế bào hình que-hình nón được kết hợp) được định lượng đối với các nhóm gồm từ 10 đến 13 con chuột, và tỉ lệ phần trăm của đáp ứng ERG ban đầu còn lại sau khi bị hư hỏng do ánh sáng được tính. Kết quả trung bình với sai số chuẩn được thể hiện, cũng như là mức ý nghĩa của sự khác nhau giữa mắt được tiêm và mắt không được tiêm được tính bằng cách sử dụng phân tích kiểm định t bất cặp hai đuôi.

Fig.5. *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* không ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng ở trạng thái ổn định của võng mạc 11-*cis* trong võng mạc. Chuột tiếp nhận *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg) hoặc PBS thông qua việc tiêm dưới võng mạc, hoặc không tiêm. Sau khi thích ứng bóng tối qua đêm, retinoid được chiết dưới ánh sáng màu đỏ mờ, và được định lượng bằng phân tích HPLC. (A) Biểu đồ sắc ký đại diện từ mỗi điều kiện điều trị; các đỉnh đối với oxime võng mạc syn-11-*cis*, oxime võng mạc kháng 11-*cis*, và oxime võng mạc syn toàn bộ *trans* được chỉ ra. Tổng hàm lượng võng mạc của (B) võng mạc 11-*cis* và (C) võng mạc toàn bộ *trans* đối với mỗi điều kiện điều trị  $\pm$  sai số chuẩn (■ C57BL/6J không tiêm; ■ không tiêm *Rdh12*<sup>-/-</sup>;  $\boxtimes$  *Rdh12*<sup>-/-</sup> tiêm AAV; □ *Rdh12*<sup>-/-</sup> tiêm PBS).

Fig.6. Chức năng võng mạc không bị ảnh hưởng bất lợi bởi *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. Các đáp ứng điện đồ võng mạc (ERG) nhìn tối (tế bào hình que được phân lập và tế bào hình que-hình nón được kết hợp) và nhìn sáng (qua trung gian tế bào hình nón) được ghi lại vào 6 tuần sau khi điều trị từ chuột C57BL/6J, không tiêm; *Rdh12*<sup>-/-</sup>, không tiêm; và *Rdh12*<sup>-/-</sup> được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* (lên đến  $2 \times 10^9$  vg).

ERG từ con vật đại diện trong mỗi nhóm điều trị được đo vào 6 tuần sau khi tiêm được thể hiện.

Fig.7. Sự định vị sắc tố thị giác không bị làm nhiễu loạn bởi *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. Sự định vị hóa mô miến dịch của rhodopsin và opsin tế bào hình nón ở chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* không được tiêm và được tiêm ( $1,3 \times 10^9$  vg) được đánh giá vào 16 tuần sau khi điều trị. Sự biểu hiện protein RDH12 người ở IS và ONL (màu xám nhạt). Rhodopsin và opsin màu đỏ/màu xanh lá (màu xám đậm) ở mắt được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. Các chữ viết tắt như được mô tả đối với Fig.2.

Fig.8. Cấu trúc võng mạc không bị hư hỏng bởi sự biểu hiện thời gian dài của *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12*. Phân tích chụp cắt lớp quang học (OCT) của mắt của chuột C57BL/6J và chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được đánh giá vào 54 tuần sau khi tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* (lên đến  $2 \times 10^9$  vg).

Fig.9. Thâm nhiễm đại thực bào CD68+ và sự biểu hiện RDH12 trong võng mạc được tiêm *AAV2/8-hGRK1p.hRDH12*. Chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* và chuột C57BL/6J được đánh giá bằng phân tích hóa mô miễn dịch vào 8 tuần sau khi tiêm dưới võng mạc *AAV2/8-hGRK1p.hRDH12* ( $2 \times 10^9$  vg). Sự biểu hiện RDH12 người trong IS, ONL, và OPL (màu xám nhạt) và việc gắn nhãn CD68 của đại thực bào (màu trắng). Các chữ viết tắt như được mô tả đối với Fig.2.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Thoái hóa võng mạc di truyền là nguyên nhân hiếm gặp của sự mất thị lực sâu sắc mà là trọng tâm của nỗ lực hiện nay để phát triển liệu pháp gen hướng đích. Liệu pháp gen sinh dưỡng qua trung gian vectơ virus đã thể hiện là sự hứa hẹn lớn trong việc điều trị mô hình động vật của bệnh thoái hóa võng mạc ở người. Đến nay, đã có nhiều nghiên cứu thành công trong việc sử dụng sự phân phối gen qua trung gian virus kết hợp adeno (AAV) để cứu chữa sự thoái hóa tế bào nhận kích thích ánh sáng trong mô hình động vật nhỏ (Ali et al. 2000; Pang et al. 2012; Pawlyk et al. 2010; Pawlyk et al. 2005; Tan et al. 2009) và mô hình động vật lớn (Acland et al. 2001; Alexander et al. 2007; Beltran et al. 2012; Komaromy et al. 2010; Lheriteau et al. 2009). Trong các trường hợp này, biểu mô sắc tố võng mạc (RPE - Retinal Pigment Epithelium) hoặc tế bào nhận kích thích ánh sáng là các đích bậc một đối với sự biểu hiện gen chuyển. Ngoài ra, thử nghiệm lâm sàng pha I bao gồm liệu pháp gen đối với bệnh nhân mắc Bệnh Mù Lòa Bẩm Sinh Leber

(LCA) hướng đích RPE (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Maguire et al. 2008) và gần đây hơn là thoái hóa màng mạch (Maclaren et al. 2014), đã đạt được một số thành công. Hiện nay không có thử nghiệm lâm sàng nào sử dụng liệu pháp thay thế gen qua trung gian AAV để điều trị bệnh nhân mắc thoái hóa võng mạc di truyền gây ra bởi đột biến trong *RDH12*.

Với sự quan tâm trong việc phát triển liệu pháp gen qua trung gian AAV để điều trị các cá thể có đột biến trong *RDH12*, chúng tôi đã tạo ra vector virus kết hợp adeno mang cADN *RDH12* người trong đó sự biểu hiện chịu sự kiểm soát của vùng khởi động rhodopsin-kinaza. Trong nghiên cứu đã được bộc lộ về vector với capsit có nguồn gốc từ AAV kiểu huyết thanh 5 hoặc AAV kiểu huyết thanh 8, chúng tôi đã chứng minh rằng sự phân phối dưới võng mạc của *AAV2/5-hGRK1p.RDH12* trong chuột (*Rdh12*<sup>-/-</sup>) thiếu *Rdh12* dẫn đến sự biểu hiện của *RDH12* người tái tổ hợp mà ổn định, được định vị chính xác, khôi phục hoạt tính reductaza võng mạc, làm giảm tính mất cảm hu hổng do ánh sáng, và không gây ra sự gây độc võng mạc được thấy với *AAV2/8-hGRK1p.hRDH12*. Cấu trúc *AAV2/5-hGRK1p.RDH12* này cung cấp sản phẩm cho liệu pháp thay thế gen *RDH12*.

### *RDH12*

Đột biến ở gen mã hóa cho retinol dehydrogenaza 12 (*RDH12*) gây ra sự thoái hóa võng mạc khởi phát sớm nghiêm trọng thường được chẩn đoán nhiều nhất dưới dạng bệnh mù lòa bẩm sinh Leber (LCA) hoặc chứng loạn dưỡng võng mạc nghiêm trọng khởi phát sớm (EOSRD). Thành viên của họ dehydrogenaza/reductaza chuỗi ngắn, *RDH12* thiết yếu để làm giảm aldehyt võng mạc mà được tạo ra bởi hoạt tính của chu kỳ thị giác vitamin A mà tích hợp vào sự đáp ứng ánh sáng của tế bào nhận kích thích ánh sáng. Khi sắc tố thị giác chứa chất mang màu võng mạc 11-*cis* hấp thụ photon của ánh sáng, võng mạc 11-*cis* được đồng phân hóa thành võng mạc toàn bộ *trans*, do đó khởi đầu luồng truyền tín hiệu mà điều hòa sự truyền tín hiệu xy-náp. Sự bất hoạt sắc tố thị giác bao gồm sự giải phóng võng mạc toàn bộ *trans*, sự khử nó thành retinol toàn bộ *trans* và trở lại thành biểu mô sắc tố võng mạc (RPE) để tái tạo chất mang màu võng mạc 11-*cis* (Fig.1A). Khi các phản ứng tái tuần hoàn không hiệu quả hoặc bị phá vỡ, ví dụ, do sự lão hóa hoặc do bệnh di truyền, sản phẩm aldehyt võng mạc và sản phẩm ngưng tụ aldehyt võng mạc tích lũy trong tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng và biểu mô sắc tố võng mạc,

dẫn đến sự hư hỏng sâu sắc đối với võng mạc phía ngoài (Ben-Shabat et al. 2001; Thompson et al. 2003; Sparrow, 2010; Chen et al. 2012).

Để bảo vệ chống lại sự gây độc, một số lượng protein và enzym liên kết retinoit được biểu hiện trong võng mạc. RDH12 là thành viên của họ dehydrogenaza/reductaza chuỗi ngắn mà sử dụng NADPH để khử phạm vi rộng của cơ chất, bao gồm aldehyt võng mạc *cis* và *trans* (Haeseleer et al. 2002), aldehyt C9 được tạo ra dưới dạng kết quả của sự quang oxy hóa lipid (Belyaeva et al. 2005; Lee et al. 2008; Marchette et al. 2010), và cơ chất steroid (Keller et al. 2007). Các cá thể có đột biến mất chức năng trong gen *RDH12* thể hiện kiểu hình thoái hóa võng mạc nghiêm trọng thường được chẩn đoán là bệnh mù lòa bẩm sinh Leber (LCA) (Janecke et al. 2004; Thompson et al. 2005; Perrault et al. 2004; den Hollander et al. 2008; Mackay et al. 2011), đối với trường hợp này hiện nay không có biện pháp điều trị hoặc chữa trị. RDH12 định vị vào đoạn phía trong của tế bào nhận kích thích ánh sáng hình que và hình nón (Haeseleer et al. 2002; Maeda et al. 2006) tại đó nó bảo vệ chống lại sự hư hỏng gây ra do ánh sáng gây ra, ít nhất là một phần, bằng aldehyt võng mạc phản ứng (Maeda et al. 2006). Võng mạc toàn bộ *trans* được tạo ra sau khi phơi sáng đã được chứng minh là rò rỉ từ đoạn phía ngoài vào đoạn phía trong của tế bào nhận kích thích ánh sáng, và sự làm sạch hiệu quả của nó khỏi tế bào nhận kích thích ánh sáng cần hoạt tính của cả RDH8 có mặt trong đoạn phía ngoài, và RDH12 có mặt trong đoạn phía trong (Chen et al. 2012) (Fig.1B). Do đó, RDH12 cũng có tiềm năng đóng vai trò quan trọng trong việc làm giảm võng mạc 11-*cis* có mặt trong lượng dư của nó cần cho sự sinh tổng hợp opsin, mà có thể đi vào đoạn phía trong từ không gian dưới võng mạc (Chen et al. 2012).

Để nghiên cứu tiềm năng của liệu pháp thay thế gen đối với LCA/EOSRD do đột biến *RDH12*, chúng tôi đã tạo ra vector virus kết hợp adeno mang cADN *RDH12* người, trong đó sự biểu hiện chịu sự kiểm soát của vùng khởi động rhodopsin kinaza mà định hướng sự biểu hiện đặc hiệu tế bào nhận kích thích ánh sáng (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010; Young et al. 2003). Cấu trúc ADN được bao gói bằng capsit có nguồn gốc từ AAV kiểu huyết thanh 8 mà làm trung gian cho hiệu quả và sự tải nạp mạnh mẽ của tế bào nhận kích thích ánh sáng (Allocca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008; Vandenberghe et al. 2011; Vandenberghe et al. 2013), hoặc bằng capsit AAV kiểu huyết thanh 5 mà làm trung gian cho sự tải nạp tế bào nhận kích thích ánh sáng, nhưng với động học chậm hơn và sự

biểu hiện ít mạnh mẽ hơn so với capsit AAV kiểu huyết thanh 8 (Yang et al. 2002; Lotery et al. 2003; Allocca et al. 2007; Leberherz et al. 2008).

Trong các nghiên cứu so sánh được tiến hành trong mô hình chuột thiếu hụt *Rdh12* (*Rdh12<sup>-/-</sup>*) (Kurth et al. 2007), công trình của chúng tôi đã chứng minh rằng hai vector này có biên dạng an toàn khác nhau đáng kể, với *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* chứng tỏ mức độ biểu hiện hiệu quả bất ngờ và đáng ngạc nhiên và biên dạng sự gây độc tương thích với việc sử dụng trị liệu để điều trị chứng loạn dưỡng võng mạc.

#### Trình tự RDH12 người

Trình tự của cADN RDH12 người ví dụ, gồm có các nucleotit từ -10 đến +980 tương quan với vị trí bắt đầu dịch mã, mã hóa cho tất cả bảy exon RDH12 được dịch mã (GenBank # NM\_152443) được nêu trong SEQ ID NO:1.

Trình tự protein RDH12 người chiều dài đầy đủ được nêu trong SEQ ID NO:2.

#### Vùng khởi động rhodopsin kinaza (*hGRK1p*)

Theo một số phương án của phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, sự thay thế cấu trúc gen được sử dụng trong đó cADN RDH12 người như được mô tả trong bản mô tả này được đặt dưới sự kiểm soát của vùng khởi động rhodopsin kinaza người (*hGRK1*). Theo một số phương án, vùng khởi động *hGRK1* có chiều dài xấp xỉ 200 cặp bazơ (bp) chứa vùng khởi động ngắn có nguồn gốc từ gen rhodopsin kinaza (RK) *hGRK1*, mà được chứng minh là gây ra sự biểu hiện đặc hiệu ở tế bào hình que và hình nón (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010; Young et al. 2003). Trình tự vùng khởi động *hGRK1* ví dụ chứa các nucleotit từ -112 đến +87 của SEQ ID NO:3 (Khani et al. 2007).

#### Vector Phân Phối Virut

cADN *RDH12* người rút gọn, như được mô tả ở trên, được bao gói vào vector phân phối, ví dụ, vector AAV5 hoặc AAV2/5.

Các gen thay thế (cADN) có thể được dùng trong chất mang hiệu quả bất kỳ, ví dụ, chế phẩm hoặc hợp phần bất kỳ có khả năng phân phối hiệu quả gen thành phần đến tế bào *in vivo*. Phương pháp bao gồm sự cài xen gen vào vector virut không gây bệnh, không sao chép, bao gồm retrovirut tái tổ hợp, adenovirus, virut kết hợp adeno, lentivirut, và virut herpes simplex 1, hoặc plasmit vi khuẩn hoặc sinh vật nhân chuẩn tái tổ hợp. Vector virut chuyển nạp trực tiếp vào tế bào; ADN plasmit có thể được phân phối trần hoặc với sự trợ giúp của, ví dụ, liposom cation (lipofectamine) hoặc được tạo dẫn xuất (ví dụ, được liên hợp kháng thể), thể liên hợp poly lysin, gramicidin S, vỏ virut nhân tạo hoặc chất

mang nội bào khác, cũng như là tiêm trực tiếp cấu trúc gen hoặc sự kết tủa  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  được thực hiện *in vivo*.

Phương án ưu tiên đối với việc đưa axit nucleic vào tế bào *in vivo* là bằng cách sử dụng vector virus chứa axit nucleic, ví dụ, cADN. Sự lây nhiễm của tế bào với vector virus có ưu điểm là tỉ lệ lớn của tế bào được nhắm đích có thể nhận axit nucleic. Ngoài ra, phân tử được mã hóa trong vector virus, ví dụ, bằng cADN chứa trong vector virus, được biểu hiện hiệu quả trong tế bào mà đã hấp thụ axit nucleic vector virus. Vector retrovirus và vector có nguồn gốc từ adenovirus có thể được sử dụng làm hệ thống phân phối gen tái tổ hợp để chuyển gen ngoại sinh *in vivo*, cụ thể là vào người, ở nhiều loại tế bào. Tuy nhiên, chúng không tải nạp tế bào nhận kích thích ánh sáng với hiệu quả đủ để làm cho chúng hữu dụng cho ứng dụng này.

Hệ thống vector virus khác nữa hữu dụng để phân phối axit nucleic là virus kết hợp adeno (AAV). Virus kết hợp adeno là virus khiếm khuyết có trong tự nhiên mà đòi hỏi virus khác, chẳng hạn như adenovirus hoặc virus herpes, làm virus trợ giúp cho sự sao chép hiệu quả và chu kỳ sống sinh sản (Muzyczka et al. 1992). Nó cũng là một trong một số ít virus mà có thể tích hợp ADN của nó vào tế bào không phân chia, và thể hiện tần suất tích hợp ổn định cao (xem, ví dụ như, Flotte et al. 1992; Samulski et al. 1989; và McLaughlin et al. 1988). Vector chứa ít khoảng 300 cặp bazơ của AAV có thể được bao gói và có thể tích hợp. Không gian cho ADN ngoại sinh giới hạn trong khoảng 4,5 kb. Vector AAV chẳng hạn như vector được mô tả trong Tratschin et al., 1985 có thể được dùng để đưa ADN vào tế bào. Nhiều axit nucleic được đưa vào các loại tế bào khác nhau bằng cách sử dụng vector AAV (xem, ví dụ, Hermonat et al. 1984; Tratschin et al. 1984a; Tratschin et al. 1984b; Wondisford et al. 1988; và Flotte et al. 1993).

Theo phương án ưu tiên, vector phân phối virus là virus AAV2/5 tái tổ hợp. Trước khi dùng, sản phẩm cuối cùng có thể trải qua một loạt các bước siêu lọc để đáp ứng các tiêu chuẩn cấp độ lâm sàng.

#### Sự chọn lọc đối tượng

Đối tượng là ứng viên cho phương pháp điều trị này bao gồm các đối tượng mà có chẩn đoán LCA gây ra bởi đột biến ở gen mã hóa cho RDH12. Đối tượng mắc tình trạng nhãn khoa đã được xác định về mặt lâm sàng khác gây ra bởi đột biến ở gen mã hóa cho RDH12, ví dụ, viêm võng mạc sắc tố khởi phát sớm, cũng có thể được điều trị bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Chẩn đoán LCA hoặc tình trạng

nhãn khoa khác gây ra bởi đột biến ở gen mã hóa cho RDH12 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm việc nhận diện đối tượng, *ví dụ*, đối tượng trẻ em, thanh thiếu niên, hoặc người trưởng thành trẻ tuổi, mà có LCA hoặc tình trạng nhãn khoa khác gây ra bởi một hoặc nhiều đột biến ở gen mã hóa cho RDH12, hoặc người mà nghi ngờ mắc LCA hoặc tình trạng nhãn khoa khác gây ra bởi một hoặc nhiều đột biến ở gen mã hóa cho RDH12 (*ví dụ*, dựa trên sự có mặt của triệu chứng của tình trạng bệnh này và không có nguyên nhân rõ ràng khác), và thu lấy mẫu có chứa ADN hệ gen từ đối tượng, phát hiện sự có mặt của đột biến trong *RDH12* bằng cách sử dụng phương pháp sinh học phân tử đã biết, và chọn lọc bệnh nhân mà có đột biến trong cả hai alen *RDH12* mà gây ra LCA hoặc tình trạng bệnh khác. Triệu chứng của tình trạng bệnh này bao gồm teo điểm vàng, mỏng hố thị giác và vỡ kiến trúc lớp, dẫn đến mất tầm nhìn trung tâm sớm và sự tiến triển thành tầm nhìn LP. Trường nhìn bị co lại ở độ tuổi sớm nhất được đo, và đáp ứng ERG trở nên không thể ghi nhận được bởi tuổi trưởng thành sớm. Việc phát hiện đột biến trong *RDH12* có thể bao gồm việc xác định trình tự tất cả hoặc một phần của gen *RDH12* trong đối tượng, và so sánh trình tự này với trình tự tham chiếu (*ví dụ*, Mã số truy cập GenBank NG\_008321.1) để phát hiện đột biến. Đột biến dịch khung, đột biến cắt cụt, đột biến mà làm thay đổi axit amin được bảo toàn, đột biến mà ảnh hưởng đến việc ghép nối phiên mã, hoặc đột biến mà ảnh hưởng đến vùng điều hòa (*ví dụ*, vùng khởi động) được coi là đột biến mà có thể gây ra LCA hoặc tình trạng nhãn khoa khác như được mô tả trong bản mô tả này; sự thay đổi trong chức năng có thể được xác nhận bằng cách biểu hiện thể đột biến *in vitro* (*ví dụ*, trong tế bào được nuôi cấy), và thử nghiệm, *ví dụ*, chức năng enzym. Ví dụ về đột biến trong trạng thái đồng hợp tử bao gồm: Glu127X, Gln189X, Tyr226Cys, Ala269GlyfsX1, và Leu274Pro (tất cả sự quy chiếu vị trí dùng để chỉ trình tự protein RDH12 của SEQ ID NO:2). Các đột biến ví dụ trong trạng thái dị hợp tử hợp chất bao gồm: Thr49Met/Arg62X; Arg65X/Ala269GlyfsX1; His151D/Thr155Ile; His151D/Arg269GlyfsX1 (Janecke et al. 2004; Schuster et al. 2007). (Các vị trí dùng để chỉ trình tự protein của SEQ ID NO:2.)

Bệnh nhân mắc LCA hoặc tình trạng nhãn khoa khác do ít nhất một đột biến *RDH12* mà có thể được điều trị bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này tốt hơn là giữ lại một số tế bào tiếp nhận kích thích ánh sáng và chức năng thị giác, *ví dụ*, như được đo bằng các thử nghiệm chức năng thị giác hoặc trường nhìn tiêu chuẩn và/hoặc

Chụp Cắt Lớp Quang Học (OCT, ví dụ, OCT Miền Phổ (SD-OCT: Spectral Domain-OCT)). Phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm việc nhận diện đối tượng mà được chẩn đoán với LCA hoặc tình trạng nhãn khoa khác do ít nhất một đột biến *RDH12*, có ít nhất một đột biến đã được xác nhận trong *RDH12* mà gây ra tình trạng này của họ, và thử nghiệm khả năng thị giác của họ và phát hiện sự có mặt của tế bào nhận kích thích ánh sáng trung tâm dư.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Đối tượng được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ được mô tả thêm trong các ví dụ sau đây, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế mà được mô tả trong yêu cầu bảo hộ.

### **Nguyên liệu và phương pháp**

Các nguyên liệu và phương pháp sau đây được dùng trong các thí nghiệm được bộc lộ trong các Ví dụ được nêu dưới đây.

### **Động vật**

Việc tạo ra và phân tích chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* đã được mô tả trước đây (Kurth et al. 2007). Chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được sử dụng trong nghiên cứu này được gây giống từ việc giao phối anh chị em trong số con đực và con cái nullizygous được nuôi trong phương tiện nhốt động vật ở cơ quan chúng tôi. Chuột WT dùng trong nghiên cứu này là chuột C57BL/6 từ The Jackson Laboratory (Wilmington, MA).

Chuột chuyển gen có các kiểu gen dưới đây được sử dụng cho nghiên cứu được bộc lộ trong bản mô tả này: Chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* trên nền tảng C57BL/6J đồng hợp tử đối với biến thể Rpe65-Met450 (M/M) (Kurth, 2007), và chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* bạch tạng trên nền tảng BALB/c đồng hợp tử đối với biến thể Rpe65-Leu450 (L/L) (Chrispell, 2009), mà thu được bằng cách gây giống. Chuột được nuôi theo chu kỳ 12 giờ (sáng)/12 giờ (tối) và bị giết êm ái bằng cách xông CO<sub>2</sub> sau đó là tràn khí phổi hai bên.

### **Tạo cấu trúc và sản xuất plasmit của AAV2/5 và AAV2/8 tái tổ hợp**

cADN *RDH12* người được khuếch đại từ cADN vỗng mặc người bằng PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế để bao hàm toàn bộ vùng mã hóa RDH12, được tách dòng, và được xác định trình tự để xác minh độ tin cậy, như được mô tả trước đây (Janecke et al. 2004). Đối với cấu trúc vector AAV, cADN *RDH12* được cài xen vào vị trí đã tách dòng của vector *pAAV-hGRK1-hrGFP* bố mẹ. Vector *pAAV-hGRK1-Rdh12* thu được được bao gói vào AAV. Vector kiểu giả AAV2/5 và AAV2/8 được tạo ra bằng cách chuyển nạp hai phía: (1) plasmit vector AAV mã hóa gen quan tâm, (2) plasmit trợ giúp

AAV mã hóa protein AAV Rep từ kiểu huyết thanh 2 và protein Cap từ kiểu huyết thanh 5 hoặc kiểu huyết thanh 8, và chức năng trợ giúp adenovirus vào tế bào 293T. Sự chuyển nạp và tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình như đã công bố (Nishiguchi et al 2015). Hai ngày sau khi chuyển nạp, tế bào được dung giải bằng chu kỳ kết đông và rã đông lặp đi lặp lại. Sau khi làm sạch mảnh vỡ tế bào ban đầu, thành phần axit nucleic của tế bào sản xuất virus được loại bỏ bằng cách xử lý Benzonase. Hạt vector AAV tái tổ hợp được tinh chế bằng sắc ký ái lực sử dụng chất nền AVB, rửa trong 1x PBS và cô đến thể tích 100–150 ml bằng cách sử dụng máy cô Vivaspın 4 (10 kDa). Vector được chuẩn độ bằng sự khuếch đại qPCR.

#### Tiêm dưới võng mạc

Đàn hệ của chuột ở xấp xỉ 4 tuần tuổi được gây mê toàn thân bằng cách tiêm trong màng bụng ketamin (90 mg/kg)/xylazin (9 mg/kg). Dung dịch proparacain 0,5% được dùng cho giác mạc làm thuốc gây tê tại chỗ. Đồng tử được làm giãn bằng cách dùng tại chỗ tropicamid (0,5%). Dưới kính hiển vi phẫu thuật mắt, tạo ra vết rạch nhỏ qua giác mạc liền kề với vùng rìa bằng cách sử dụng kim khổ 30. Kim đầu tù khổ 34 khớp với ống tiêm Hamilton được cài xen qua vết rạch đằng sau thấu kính và được đẩy qua võng mạc. Toàn bộ việc tiêm được tiến hành dưới võng mạc ở vị trí trong góc phần tư mũi của võng mạc. Mỗi mắt tiếp nhận lên đến  $2 \times 10^9$  vg AAV2/5-(hGRK1)-hRDH12 trong thể tích lên đến 2  $\mu$ l. Vector mã hóa RDH12 được dùng riêng rẽ cho một mắt của mỗi con chuột tiếp nhận điều trị, và mắt bên kia không được tiêm. Kiểm tra đáy sau khi tiêm phát hiện hơn 30% võng mạc bị bong trong hầu hết các trường hợp, xác nhận sự phân phối dưới võng mạc thành công.

#### Kháng thể

Các kháng thể sơ cấp được sử dụng là: kháng thể đa dòng kháng Rdh12 thỏ (CSP) đặc hiệu đối với protein chuột (chống lại 252SPFFKSTSQGAQ263, SEQ ID NO:4), và kháng thể đơn dòng kháng RDH12 chuột (2C9) đặc hiệu đối với protein người (chống lại C-284DCKRTWVSPRARNNKT299; SEQ ID NO:5) (Kurth et al. 2007); kháng thể đơn dòng kháng RHO chuột (1D4) (MacKenzie et al. 1984); kháng thể đa dòng kháng RHO thỏ được tạo ra chống lại protein được làm biến tính; và kháng thể đa dòng kháng opsin tế bào hình nón màu đỏ/màu xanh lá thỏ (Millipore cat# AB5405).

### Phân tích thẩm tách miễn dịch

Protein trong dịch đồng nhất võng mạc được phân tách bằng SDS-PAGE, được chuyển lên màng nitrocellulose mà sau đó được phong bế, ủ với kháng thể sơ cấp qua đêm, rửa, ủ với kháng thể thứ cấp được liên hợp với phosphatase kiềm, và được phát triển bằng cách sử dụng 5-brom-4-clo-3'-indolylphosphat p-toluidin và tetrazolium chloride màu xanh nitro.

### Mô học và huỳnh quang miễn dịch

Chuột bị giết chết êm ái, mắt được rạch để định hướng, sau đó được cắt bỏ nhãn cầu. Đối với phần cắt đông lạnh, thấu kính và đoạn phía trước được loại bỏ, mắt được cố định nhanh với paraformaldehyde 4%, được rửa bằng PBS, được chuyển vào sucroza/OCT, được kết đông nhanh, và được chia phần với độ dày 10  $\mu\text{m}$ . Đối với chế phẩm thay thế kết đông, toàn bộ mắt được đông lạnh nhanh trong isopentan được làm lạnh bằng nước đá khô trong thời gian 30 giây, và sau đó được chuyển vào metanol được làm lạnh bằng nước đá khô chứa axit axetic đóng băng 3%. Mắt được ủ ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 48 giờ, sau đó ủ qua đêm ở nhiệt độ -20°C, nhúng trong parafin, và chia phần với độ dày 6  $\mu\text{m}$ . Phần parafin được khử parafin và kháng nguyên được lấy ra bằng cách ủ trong EDTA 1mM, 0,05% Tween 20, pH 8,0, ở nhiệt độ 90°C trong thời gian 30 phút trước khi gắn nhãn miễn dịch như dưới đây. Một cách vắn tắt, mắt cắt ngang võng mạc được rửa bằng PBS và được làm cho thấm bằng PBS-T (Triton X-100 0,3%); được phong bế bằng albumin huyết thanh bò 1%, huyết thanh dê bình thường 10%, và Triton X-100 0,3%; và ủ với kháng thể sơ cấp qua đêm ở nhiệt độ 4°C, rửa, sau đó ủ với kháng thể thứ cấp được liên hợp với chất huỳnh quang trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các phần được đặt kính bằng cách sử dụng bộ gel ProLong Gold chứa 4',6-điamidino-2-phenylindol (DAPI; Invitrogen), và được chụp ảnh bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang Leica DM6000.

### Ghi lại ERG

ERG được tiến hành như được mô tả trước đó (Thompson, 2012) bằng cách sử dụng hệ thống ghi lại Espion e2 (Diagnosys, Lowell, MA). Một cách vắn tắt, chuột được để cho thích ứng bóng tối qua đêm và được gây mê bằng cách tiêm trong màng bụng Ketamin (93 mg/kg) và Xylazin (8 mg/kg). Đồng tử được làm giãn bằng tropicamide tại chỗ (0,5%). Nhiệt độ cơ thể được duy trì ở 37°C bằng tấm sưởi. ERG giác mạc được ghi lại từ cả hai mắt bằng cách sử dụng vòng dây vàng với thuốc gây mê tại chỗ tetracain 0,5% và giọt

metylxenluloza 2% để giữ ẩm giác mạc. Vòng dây vàng được đặt trong miệng được sử dụng để tham chiếu, và điện cực tiếp đất ở trên đuôi. Quy trình ERG gồm có việc ghi lại đáp ứng thích nghi bóng tối (thích ứng nhìn tối) đối với ánh sáng lóe màu trắng nhanh ( $-2,31 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  đối với sóng B được tách ra từ tế bào hình que;  $1,09 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  đối với sóng A và sóng B được kết hợp từ tế bào hình nón-hình que). ERG thích ứng ánh sáng (thích ứng nhìn sáng) được ghi lại sau thời gian 10 phút của sự thích ứng đối với nền tăng kìm hãm tế bào hình que  $32 \text{cd.m}^{-2}$  màu trắng khi đáp ứng với ánh sáng lóe cường độ  $1,09 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  (đối với sóng B được tách từ tế bào hình nón). Đáp ứng được khuếch đại ở độ khuếch đại 1.000 ở từ 1,25 đến 1000 Hz, và được số hóa ở tốc độ 2000 Hz. Bộ lọc khóa được sử dụng để loại bỏ nhiễu đường truyền 60 Hz. Đáp ứng được tính trung bình trên máy tính và được ghi lại ở các khoảng thời gian từ 3 đến 60 giây tùy thuộc vào cường độ kích thích. Để phân tích thống kê, kiểm định t bất cặp được sử dụng để xác định liệu biên độ ERG trong mắt được điều trị có khác biệt đáng kể với mắt không được điều trị hay không.

#### Phân tích sự hư hỏng do ánh sáng gây ra

Chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* bạch tạng được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg) vào một mắt, hoặc được tiêm thể tích PBS tương đương, và mắt bên kia không được tiêm. Vào 6 tuần sau khi tiêm, phân tích ERG được tiến hành và đáp ứng nhìn tối được định lượng như được mô tả ở trên. Một tuần sau đó, chuột được cho thích ứng bóng tối qua đêm, đồng tử của chúng được làm giãn bằng tropicamit (0,5%), và sau đó được đặt trong hộp ánh sáng trong các khay trong riêng lẻ. Chuột được cho phơi nhiễm với 5.000 luxơ trong thời gian 2 giờ, và sau đó được đưa trở lại chuồng nuôi nhốt mô phỏng sinh thái (12 giờ tối/12 giờ sáng ( $<20 \text{luxơ}$ )) trong thời gian 7 ngày, sau đó phân tích ERG được lặp lại. Phần trăm của đáp ứng ERG ban đầu còn lại sau khi bị hư hỏng do ánh sáng được tính đối với mỗi mắt, và giá trị trung bình được dựng đồ thị với sai số chuẩn được thể hiện. Kiểm định t bất cặp hai đuôi được sử dụng để xác định liệu biên độ ERG trong mắt được điều trị có khác biệt đáng kể so với mắt không được điều trị hay không.

#### Chụp cắt lớp quang học

Chuột được gây mê và đồng tử được làm giãn bằng tropicamit 0,5%. Hệ thống chụp cắt lớp quang học (OCT) miền phổ (hệ thống Biopogen Envisu R2200 SD-OCT (Durham, NC, USA)), với kích thước phân tích thể tích  $1,4 \times 1,4 \text{ mm}$ , được tập trung trên đầu dây

thần kinh thị giác. Giọt làm trơn Systane (Alcon) được sử dụng trong suốt quy trình chụp ảnh.

#### Phân tích hàm lượng retinoit

Võng mạc toàn bộ *trans* và võng mạc 11-*cis* trong mắt của chuột được chiết bằng cách sử dụng sự cải biến của phương pháp được mô tả trước đó (Bligh and Dyer, 1959). Chuột sau khi tiêm sáu tuần được thích ứng bóng tối qua đêm, sau đó dưới ánh sáng màu đỏ mờ, bị giết êm ái thông qua sự quá liều CO<sub>2</sub>, và mắt được cắt bỏ nhãn cầu và đông lạnh trong N<sub>2</sub> lỏng. Dưới ánh sáng màu đỏ mờ và trên nước đá, mỗi mắt được đồng nhất hóa trong 1 ml cloroform: metanol: hydroxylamin (2 M) (3:6:1) và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 2 phút. Tiếp theo, 200 µl cloroform và 240 µl nước được bổ sung, và mỗi mẫu được tạo xoáy và được ly tâm ở 14.000 vòng/phút trong thời gian 5 phút. Pha phía dưới được thu gom, dung môi được làm bay hơi dưới nitơ, và mẫu được hòa tan trong hexan. Retinoit trong phần chiết được nhận diện và được định lượng bằng phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), sử dụng mô đun tách Waters Alliance và bộ phát hiện mảng quang điện với cột LC-31 Supelcosil (25 cm x 4,6 mm x 3 µm) được phát triển với 1,4-dioxan 5% trong hexan. Sự nhận diện đỉnh được tiến hành bằng cách so sánh với thời gian lưu của hợp chất tiêu chuẩn và sự đánh giá cực đại chiều dài bước sóng. Tiến hành phân tích định lượng bằng cách so sánh diện tích đỉnh ở 347 và 351 nm lần lượt đối với oxime võng mạc syn- và kháng-11-*cis*, và lần lượt ở 357 và 361 nm đối với oxime võng mạc syn- và kháng-toàn bộ *trans*, (Kurth et al. 2007).

#### Thử nghiệm hoạt tính reductaza võng mạc

Dịch đồng nhất võng mạc ở chuột được thử nghiệm đối với hoạt tính reductaza võng mạc vào 6 tuần sau khi tiêm. Chuột đã thích ứng ánh sáng bị giết êm ái, và mỗi võng mạc được đồng nhất hóa riêng lẻ trong 125 µl của sucroza 0,25 M, Tris-axetat 25 mM, pH 7, dithiothreitol 1 mM. Dịch đồng nhất được ly tâm ở 1000 × g trong thời gian 5 phút để loại bỏ tế bào không bị phá vỡ, và sau đó dịch nổi bề mặt được nghiền siêu âm bằng đầu dò mũi micro (30 lần mỗi lần 1 giây) trên nước đá. Nồng độ protein được xác định bằng sự cải biến của quy trình Lowry (Peterson et al. 1977), và hàm lượng RDH12 được đánh giá bằng thẩm tách western. Mẫu tương tự được gom và thử nghiệm 20 µg của mỗi dịch tan được gom (trong ba bản sao) trong chất đệm chứa 200 µM võng mạc toàn bộ *trans* và 200 µM NADPH trong chất đệm HEPES (pH 8); phản ứng được ủ trong thời gian từ 0 đến 45

phút trong bể nước 37°C (nhiệt độ phản ứng mà làm giảm thiểu sự đồng phân hóa nhiệt của cơ chất retinoit, cũng như là sự bất hoạt enzym). Sự tạo thành retinol toàn bộ *trans* được định lượng bằng cách sử dụng phân tích HPLC pha bình thường khi so sánh với tiêu chuẩn đã biết (Chrispell et al. 2009).

### Ví dụ 1

#### Sự biểu hiện qua trung gian AAV của RDH12 người

Nhiều vector đối với liệu pháp thay thế RDH12 đã được phát triển và thử nghiệm. Cấu trúc vector RDH12 tối ưu được thể hiện trong Fig.2A. Nó có chứa cADN *RDH12* người dưới sự kiểm soát của mảnh vùng khởi động Rhodopsin Kinaza (GRK1) người. Cấu trúc này được bao gói trong kiểu huyết thanh AAV2/5. Capsit kiểu AAV huyết thanh 5 đã được chứng minh là làm trung gian cho sự tải nạp tế bào nhận kích thích ánh sáng, nhưng với động lực chậm hơn và sự biểu hiện ít mạnh mẽ hơn so với capsit AAV8 (Yang et al. 2002; Lotery et al. 2003; Allocca et al. 2007; Lebherz et al. 2008). Sự biểu hiện protein RDH12 người trong võng mạc chuột vào 6 tuần sau khi tiêm dưới võng mạc *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg) được đánh giá bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu đối với Rdh12 chuột hoặc protein RDH12 người. Mức độ phân phối vector của RDH12 người dường như có thể so sánh được với lượng Rdh12 chuột (Fig.2B). Ảnh huỳnh quang miễn dịch gián tiếp trên các phần võng mạc được sử dụng để đánh giá Rdh12 chuột tự nhiên và RDH12 người tái tổ hợp, bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu loài. Sự định vị của RDH12 nội sinh và tái tổ hợp dường như là giống nhau, chỉ ra rằng protein đang được xử lý một cách bình thường (Fig.2C).

Khả năng của võng mạc của chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* để làm giảm aldehyt võng mạc ngoại sinh được làm giảm đáng kể so với chuột kiểu dại (Chrispell et al. 2009). Sáu tuần sau khi tiêm dưới võng mạc  $1,3 \times 10^9$  vg *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* vào chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>*, dịch đồng nhất võng mạc được thử nghiệm đối với hoạt tính reductaza võng mạc *in vitro*. Sự tạo thành retinol toàn bộ *trans* được định lượng bằng cách sử dụng phân tích HPLC pha bình thường. Mỗi điểm dữ liệu thể hiện giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn đối với tối thiểu 5 thí nghiệm độc lập mà võng mạc từ 3 đến 5 chuột được gom lại và thử nghiệm trong ba bản sao. Tỷ lệ ban đầu của sự tạo thành retinol toàn bộ *trans* trong võng mạc từ chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* và chuột C57BL/6J không được tiêm lần lượt là  $0,013 \text{ pmol phút}^{-1} \mu\text{g protein}^{-1}$ , và  $0,071 \text{ pmol phút}^{-1} \mu\text{g protein}^{-1}$  (Fig.3A). Hoạt tính dư có mặt trong chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* phản ánh sự có mặt của các đồng phân RDH khác mà có khả năng làm giảm võng mạc toàn bộ

*trans* (Rattner et al. 2000; Haeseleer et al. 2002). Trong chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được tiêm AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, tỉ lệ của sự tạo thành retinol toàn bộ *trans* của 0,046 pmol phút<sup>-1</sup> µg protein<sup>-1</sup> lớn hơn đáng kể so với chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được tiêm PBS (0,016 pmol phút<sup>-1</sup> µg protein<sup>-1</sup>). Sự phục hồi của hoạt tính reductaza võng mạc (khoảng 50%) là thống nhất với sự tải nạp một phần của võng mạc (khoảng 30%) và chỉ ra rằng vector đã khôi phục mức độ hoạt tính bình thường trong tế bào nhận kích thích ánh sáng được tải nạp. Gen chuyển được biểu hiện trong 12 tháng (thời điểm dài nhất được kiểm tra). Việc gắn nhãn huỳnh quang miễn dịch thể hiện mức độ tải nạp võng mạc và sự biểu hiện RDH12 tái tổ hợp trong chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được đánh giá vào 16 tuần sau khi tiêm che phủ xấp xỉ một phần ba bề mặt võng mạc (Fig.3B).

Tác dụng của AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 lên sự miễn cảm với sự hư hỏng do ánh sáng gây ra được đánh giá trong chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* bạch tạng được tiêm vào một mắt với  $1,3 \times 10^9$  vg hoặc thể tích tương đương của PBS, và không tiếp nhận điều trị ở mắt bên kia. Phân tích ERG của hoạt tính võng mạc thích ứng nhìn tối (được tách từ tế bào hình que và tế bào hình que-hình nón kết hợp) được thực hiện vào 1 tuần trước đó, và 1 tuần sau đó, đưa chuột vào mức độ ánh sáng mà gây ra sự hư hỏng võng mạc đáng kể ở các con bạch tạng (5.000 lux trong thời gian 2 giờ). Phần trăm hoạt tính võng mạc còn lại trong mắt được điều trị bằng vector lớn hơn đáng kể so với hoạt tính võng mạc còn lại ở mắt không được điều trị ( $p \leq 0,0168$ ) (Fig.4). Ngược lại, trong con vật đối chứng được tiêm PBS, phần trăm hoạt tính võng mạc thích ứng nhìn tối còn lại trong mắt không được tiêm không lớn hơn đáng kể so với trong mắt không được điều trị ( $p \geq 0,2255$ ). Các phát hiện này thống nhất với sự bảo vệ qua trung gian AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 chống lại tính miễn cảm đối với sự hư hỏng do ánh sáng gây ra có liên quan đến sự thiếu hụt RDH12.

Sự gây độc của vector được đánh giá thông qua tác dụng trực tiếp của hoạt tính RDH12 người lên sự chuyển hóa retinoit, và đối với tác dụng gián tiếp trên cấu trúc võng mạc và chức năng võng mạc, như được mô tả trong phần sau đây.

Độ đặc hiệu cơ chất rộng của RDH12 mà cho phép sự giảm đi của cả võng mạc 11-*cis* và võng mạc toàn bộ *trans* tạo ra khả năng dễ biểu hiện quá mức hoặc định vị sai của protein tái tổ hợp để ảnh hưởng tiêu cực đến chức năng chu kỳ thị giác. Phân tích HPLC của hàm lượng retinoit được sử dụng để đánh giá hoạt tính chu kỳ thị giác trong mắt từ chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được tiêm AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, hoặc được tiêm PBS, hoặc từ đối chứng C57BL/6J không được tiêm. Phân tích retinoit vào 6 tuần sau khi tiêm dưới võng

mạc *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg) vào chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* cho thấy rằng sự biểu hiện hRDH12 không ảnh hưởng đáng kể đến mức độ võng mạc 11-cis ở trạng thái ổn định trong võng mạc (Fig.5A). Biểu đồ sắc ký đại diện thể hiện các đối chứng khác nhau với thời gian rửa giải đối với các retinoit khác nhau được chỉ ra. Tổng hàm lượng võng mạc 11-cis và võng mạc toàn bộ *trans* thể hiện giá trị trung bình  $\pm$  sai số chuẩn với tối thiểu 5 thí nghiệm độc lập (Fig.5B, Fig.5C). Đáp ứng ERG của hoạt tính võng mạc được đo ở chuột C57BL/6J và chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* mà tiếp nhận  $1,3 \times 10^9$  vg *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* và được nuôi trong chuồng nuôi nhốt mô phỏng sinh thái (12 giờ tối/12 giờ sáng ( $<20$  lux)). ERG thích ứng nhìn tối (kích thích  $-2,3 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  được tách từ tế bào hình que), tế bào hình que-hình nón kết hợp (kích thích  $1,09 \log \text{cd.s.m}^{-2}$ ), và thích ứng nhìn sáng (đáp ứng qua trung gian tế bào hình nón, kích thích  $1,09 \log \text{cd.s.m}^{-2}$ ) từ con vật đại diện trong mỗi nhóm điều trị được đo vào 6 tuần sau khi tiêm thể hiện không có tác dụng đáng kể của sự biểu hiện RDH12 người lên chức năng võng mạc (Fig.6).

Sự định vị sai của rhodopsin và opsin tế bào hình nón là chỉ dẫn đặc trưng rõ ràng của khả năng sống sót tế bào nhận kích thích ánh sáng giảm đi (Adamian et al. 2006; Turney et al. 2007; Brunner et al. 2010; Lopes et al. 2010). Sự định vị hóa mô miễn dịch của rhodopsin và opsin màu đỏ/màu xanh lá được đánh giá ở chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* mà không được tiêm hoặc được tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $1,3 \times 10^9$  vg). Ở chuột thể hiện sự biểu hiện gen chuyển mạnh mẽ, không quan sát thấy sự giảm đi của mức độ biểu hiện opsin hoặc bằng chứng của sự định vị sai opsin tế bào hình que và tế bào hình nón vào 16 tuần sau khi điều trị; cấu trúc võng mạc vẫn nguyên vẹn vào 54 tuần sau khi tiêm (Fig.7).

Phân tích chụp cắt lớp quang học (OCT) của chuột C57BL/6J và chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được đánh giá vào 54 tuần sau khi tiêm *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* ( $2 \times 10^9$  vg) thể hiện không có sự thay đổi lớn trong sự phân lớp võng mạc qua khu vực rộng bao gồm cả hai phía của dây thần kinh thị giác. Cấu trúc võng mạc ổn định trong ít nhất một năm sau khi tiêm khi so sánh với mắt bên kia không được tiêm (Fig.8).

## **Ví dụ 2. Sự hư hỏng võng mạc gây ra bởi AAV2/8**

### **Sự hư hỏng võng mạc ở chuột được tiêm *AAV2/8-hGRK1p.hRDH12*.**

Capsit có nguồn gốc từ AAV kiểu huyết thanh 8 đã được chứng minh là làm trung gian cho hiệu quả và sự tải nạp mạnh mẽ của tế bào nhận kích thích ánh sáng (Allocca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008; Vandenberghe et al. 2011; Vandenberghe et al. 2013). Các nghiên cứu ban đầu được thực hiện với kiểu huyết thanh AAV2/8 mang cấu trúc

vector như được mô tả ở trên. Chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* được điều trị bằng cách tiêm dưới võng mạc *AAV2/8-hGRK1p.hRDH12* ở liều lượng bằng khoảng  $10^8$ - $10^9$  hệ gen virus (vg) dẫn đến sự biểu hiện mạnh mẽ của protein RDH12 người tái tổ hợp. Tuy nhiên, mắt được tiêm đã phát triển sự hư hỏng võng mạc đáng kể bắt đầu ngay từ 3 tuần sau khi tiêm, và trong hầu hết các trường hợp vào 6 tuần sau khi tiêm. Sự thâm nhiễm đại thực bào được quan sát thấy ở đa số trường hợp bởi sự có mặt của tế bào CD68<sup>+</sup> (Fig.9). Sự hư hỏng võng mạc không được giảm thiểu bằng cách dùng cyclosporin toàn thân (Borel et al. 1976) cho chuột *Rdh12<sup>-/-</sup>* liên tục từ thời gian đang cai sữa đến thời gian bị giết chết, chỉ ra rằng đáp ứng miễn dịch chống lại vector hoặc gen chuyển không phải là nguyên nhân của sự hư hỏng. Quan sát này thống nhất với kết quả thu được ở chuột C57BL/6J kiểu đại được tiêm với cấu trúc mã hóa RDH12 người (*AAV2/8-hGRK1p.hRDH12*) hoặc *Rdh12* chuột (*AAV2/8-hGRK1p.mRdh12*), trong đó sự làm mỏng võng mạc đáng kể và sự thâm nhiễm đại thực bào cũng xảy ra vào 6 tuần sau khi tiêm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- ADAMIAN M, PAWLYK BS, HONG DH, BERSON EL. (2006). Rod and cone opsin mislocalization in an autopsy eye from a carrier of X-linked retinitis pigmentosa with a Gly436Asp mutation in the RPGR gene. *Am J Ophthalmol* 142, 515-8.
- ACLAND GM, AGUIRRE GD, RAY J, ZHANG Q, et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28, 92-5.
- ALEXANDER JJ, UMINO Y, EVERHART D, CHANG B, et al. (2007). Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med* 13, 685-7.
- ALI RR, SARRA GM, STEPHENS C, ALWIS MD, et al. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25, 306-10.
- ALLOCCA M, MUSSOLINO C, GARCIA-HOYOS M, SANGES D, et al. (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* 81, 11372-80.
- BAINB RIDGE JW, SMITH AJ, BARKER SS, ROBBIE S, et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2231-9.

BELTRAN WA, CIDECIYAN AV, LEWIN AS, IWABE S, et al. (2012). Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2132-7.

BEN-SHABAT S, PARISH CA, HASHIMOTO M, LIU J, et al. (2001). Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 1533-40.

BELYAEVA OV, KORKINA OV, STETSENKO AV, KIM T, et al. (2005). Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids. *Biochemistry* 44, 7035-47.

BLIGH EG, DYER WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-7.

BOREL JF, FEURER C, GUBLER HU, STÄHELIN H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-75.

BRUNNER S, SKOSYRSKI S, KIRSCHNER-SCHWABE R, KNOBELOCH KP, et al. (2010). Cone versus rod disease in a mutant Rprg mouse caused by different genetic backgrounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 1106-15.

CARLSON NB, KURTZ D, HEATH DA, HINES C. in: *Clinical Procedures for Ocular Examination*. 3rd Ed. Appleton & Lange, Norwalk, CT; 1990:63-77.

CHEN C, THOMPSON DA, KOUTALOS Y. (2012). Reduction of all-trans-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12. *J Biol Chem*, 287, 24662-70.

CHEN Y, OKANO K, MAEDA T, CHAUHAN V, et al. (2012). Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 287, 5059-69.

CHRISPELL JD, FEATHERS KL, KANE MA, KIM, CY, et al. (2009). Rdh12 activity and effects on retinoid processing in the murine retina. *J Biol Chem* 284, 21468-77.

CIDECIYAN AV, ALEMAN TS, BOYE SL, SCHWARTZ SB, et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15112-7.

DEN HOLLANDER AI, ROEPMAN R, KOENENKOOP RK, CREMERS FP. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419.

FLOTTE TR, SOLOW R, OWENS RA, AFIONE S, et al. (1992). Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 349-56.

FLOTTE TR, AFIONE SA, SOLOW R, DRUMM ML, et al. (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268, 3781-90.

HAESELEER F, JANG GF, IMANISHI Y, DRIESSEN CA, et al. (2002). Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem* 277, 45537-46.

HERMONAT PL, MUZYCZKA N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6466-70.

JANECKE AR, THOMPSON DA, UTERMANN G, BECKER C, et al. (2004). Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 36, 850-854.

JOHNSON DD. Deafness and Vision Disorders: Anatomy and Physiology, Assessment Procedures, Ocular Anomalies, and Educational Implications, Charles C. Thomas Publisher; 1999.

KELLER B, ADAMSKI J. (2007). RDH12, a retinol dehydrogenase causing Leber's congenital amaurosis, is also involved in steroid metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 190-4.

KHANI SC, PAWLYK BS, BULGAKOV OV, KASPEREK E, et al. (2007). AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3954-61.

KOENENKOOP RK. (2004). An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol* 49, 379-98.

KOMAROMY AM, ALEXANDER JJ, ROWLAN JS, GARCIA MM, et al. (2010). Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet* 19, 2581-93.

KUMARAN N, MOORE AT, WELEBER RG, MICHAELIDES M. (2017). Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br J Ophthalmol* 101, 1147-1154.

KURTH I, THOMPSON DA, RÜTHER K, FEATHERS KL, et al. (2007). Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh12* does not limit visual cycle function. *Mol Cell Biol* 27, 1370-9.

LEBHERZ C, MAGUIRE A, TANG W, BENNETT J, et al. (2008). Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J gen Med* 10, 375-82.

LEE SA, BELYAEVA OV, KEDISHVILI NY. (2008). Effect of lipid peroxidation products on the activity of human retinol dehydrogenase 12 (RDH12) and retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1782, 421-5.

LHERITEAU E, LIBEAU L, STIEGER K, DESCHAMPS JY, et al. (2009). The RPGRIP 1 -deficient dog, a promising canine model for gene therapy. *Mol Vis* 15, 349-61.

LOPES VS, JIMENO D, KHANOBDEE K, SONG X, et al. (2010). Dysfunction of heterotrimeric kinesin-2 in rod photoreceptor cells and the role of opsin mislocalization in rapid cell death. *Mol Biol Cell* 21, 4076-88.

LOTERY AJ, YANG GS, MULLINS RF, RUSSELL SR, et al. (2003). Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 14, 1663-71.

MACKAY DS, DEV BORMAN A, MORADI P, HENDERSON RH, et al. (2011). RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Mol Vis* 17, 2706-16.

MAEDA A, MAEDA T, IMANISHI Y, SUN W, et al. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *J Biol Chem* 281, 37697-704.

MAGUIRE AM, SIMONELLI F, PIERCE EA, PUGH EN, JR., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240-8.

MARCHETTE LD, THOMPSON DA, KRAVTSOVA M, NGANSOP TN, et al. (2010). Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-hydroxynonenal in photoreceptor cells. *Free Radic Biol Med* 48, 16-25.

MCLAUGHLIN SK, COLLIS P, HERMONAT PL, MUZYCZKA N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62, 1963-73.

MACKENZIE D, ARENDT A, HARGRAVE P, MCDOWELL JH, et al. (1984). Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides. *Biochemistry* 23, 6544-9.

MACLAREN RE, GROPE M, BARNARD AR, COTTRILL CL, et al. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 383, 1129-37.

MUZYCZKA N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129.

NATKUNARAJAH M, TRITTIBACH P, MCINTOSH J, DURAN Y, et al. (2008). Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Ther* 15, 463-7.

NISHIGUCHI KM, CARVALHO LS, RIZZI M, POWELL K, et al. (2015). Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179. *Nat Commun* 6, 6006. PANG JJ, LEI L, DAI X, SHI W, et al. (2012). AAV-mediated gene therapy in mouse models of recessive retinal degeneration. *Curr Mol Med* 12, 316-30.

PAWLYK BS, SMITH AJ, BUCH PK, ADAMIAN M, et al. (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3039-45.

PAWLYK BS, BULGAKOV OV, LIU X, XU X, et al. (2010). Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* 21, 993-1004.

PERRAULT I, HANEIN S, GERBER S, BARBET F, et al. (2004). Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 75, 639-46.

PETERSON GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-56.

RATTNER A, SMALLWOOD PM, NATHANS J. (2000). Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the

visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem* 275, 11034-43.

SAMULSKI RJ, CHANG LS, SHENK T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63, 3822-8.

SCHUSTER A, JANECKE AR, WILKE R, SCHMID E, et al. (2007). The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1824-31.

SPARROW JR. (2010). Bisretinoids of RPE lipofuscin: trigger for complement activation in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 703, 63-74.

SUN X, PAWLYK B, XU X, LIU X, et al. (2010). Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Ther* 17, 117-31.

TAN MH, SMITH AJ, PAWLYK B, XU X, et al. (2009). Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet*.

THOMPSON DA, GAL A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22, 683-703.

THOMPSON DA, JANECKE AR, LANGE J, FEATHERS KL, et al. (2005). Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-*cis* retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet* 14, 3865-75.

THOMPSON DA, KHAN NW, OTHMAN MI, CHANG B, et al. (2012). Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15. *PLoS One* 7, e35865.

TRATSCHIN JD, WEST MH, SANDBANK T, CARTER BJ. (1984a). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol* 4, 2072-81.

TRATSCHIN JD, MILLER IL, CARTER BJ. (1984b). Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 51, 611-9.

TRATSCHIN JD, MILLER IL, SMITH MG, CARTER BJ. (1985). Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5, 3251-60.

TURNEY C, CHONG NH, ALEXANDER RA, HOGG CR, et al. (2007). Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4240-9.

VANDENBERGHE LH, BELL P, MAGUIRE AM, CEARLEY CN, et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Sci Transl Med* 3, 88ra54.

VANDENBERGHE LH, BELL P, MAGUIRE AM, XIAO R, et al. (2013). AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina. *PLoS One* 8, e53463.

XIAO X, LI J, SAMULSKI RJ. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72, 2224-32.

YANG GS, SCHMIDT M, YAN Z, LINDBLOOM JD, et al. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 76, 7651-60.

YOUNG JE, VOGT T, GROSS KW, KHANI SC. (2003). A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4076-85.

WELEBER RG, FRANCIS PJ, TRZUPEK KM, BEATTIE C. (2004). Leber Congenital Amaurosis. In: PAGON RA, ADAM MP, ARDINGER HH, WALLACE SE, et al. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. [updated 2013 May 2].

WONDISFORD FE, USALA SJ, DECHERNEY GS, CASTREN M, et al. (1988). Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Mol Endocrinol* 2, 32-9.

Mỗi tài liệu tham khảo được viện dẫn ở đây được kết hợp để tham khảo đến toàn bộ nội dung của nó hoặc phần liên quan, như thấy rõ ràng từ nội dung của sự viện dẫn.

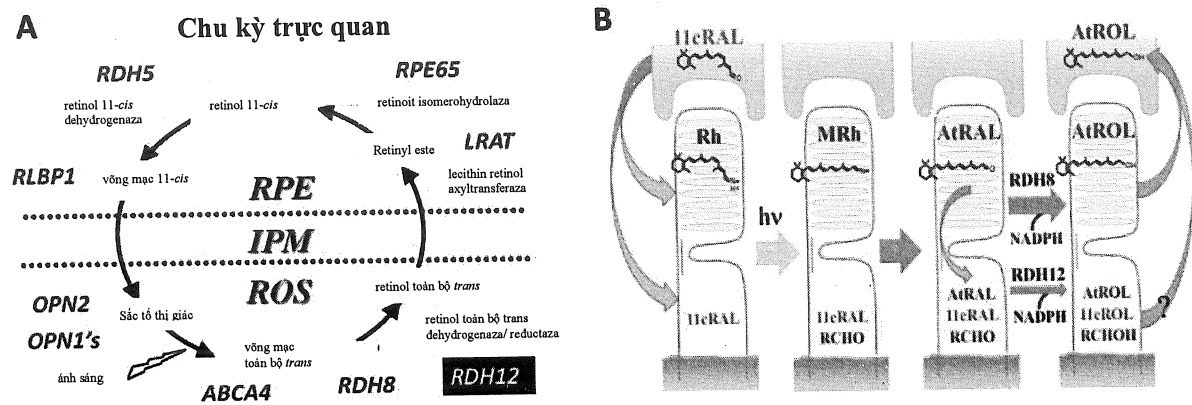
Cần hiểu rằng mặc dù đối tượng được yêu cầu bảo hộ đã được mô tả kết hợp với phần mô tả chi tiết của chúng, phần mô tả trên đây được dự định để minh họa và không làm giới hạn phạm vi của đối tượng được yêu cầu bảo hộ, mà được xác định bởi phạm vi

của các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Các khía cạnh, ưu điểm, và cải biến khác nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ dưới đây.

### YÊU CẦU BẢO HỘ

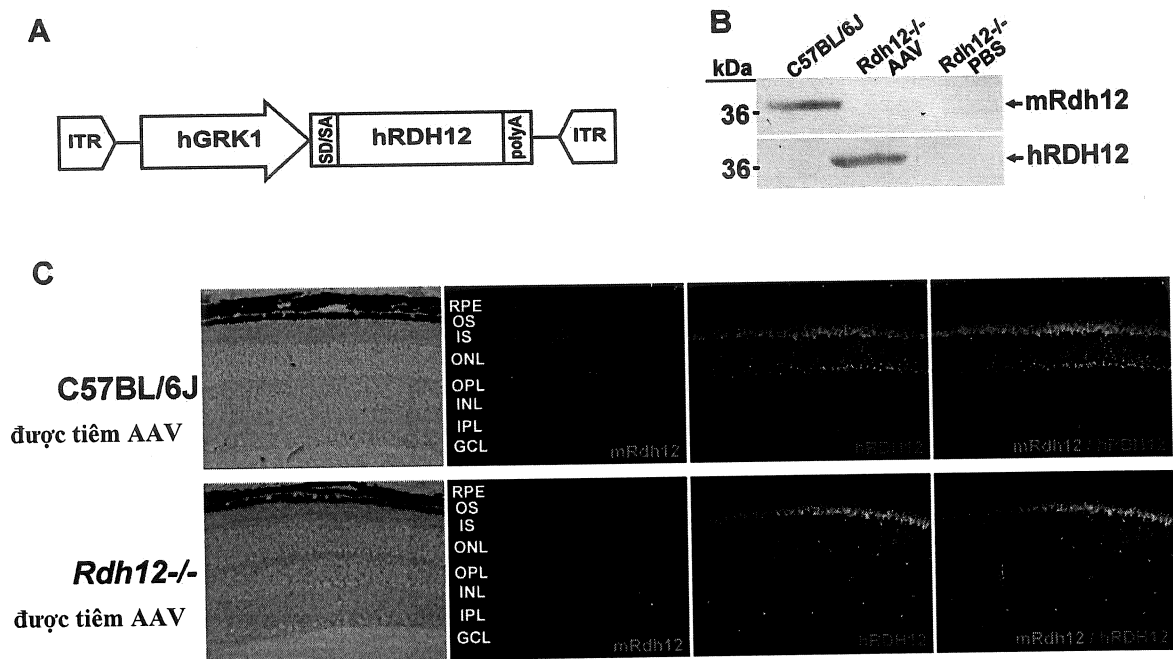
1. Vector virus kết hợp adeno có chứa axit nucleic mã hóa cho ADN *RDH12* người, trong đó ADN *RDH12* người mã hóa cho protein mà tương đồng ít nhất 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc 99% với chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO:2, trong đó ADN *RDH12* chịu sự kiểm soát của vùng khởi động rhodopsin kinaza 1 người (hGRK1), và trong đó vector virus kết hợp adeno này là AAV-2, kiểu huyết thanh-5 (AAV2/5).
2. Vector virus kết hợp adeno theo điểm 1, trong đó vùng khởi động hGRK1 có chứa SEQ ID NO:3.
3. Vector virus kết hợp adeno theo điểm 1, trong đó ADN *RDH12* người mã hóa cho protein có chứa SEQ ID NO:2.
4. Vector virus kết hợp adeno theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vùng khởi động hGRK1 về bản chất gồm có SEQ ID NO:3.
5. Vector virus kết hợp adeno theo điểm 1, trong đó ADN *RDH12* người tương đồng ít nhất 60% hoặc 70% với chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 1.
6. Tế bào chủ được phân lập có chứa vector virus kết hợp adeno theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
7. Tế bào chủ được phân lập theo điểm 6, trong đó tế bào này biểu hiện protein RDH12 người.

1/9

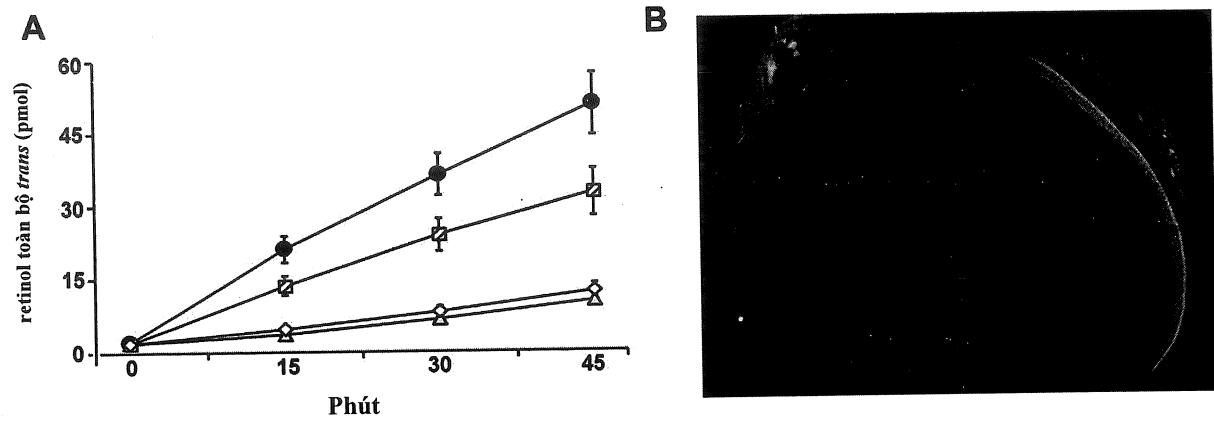


**Fig. 1**

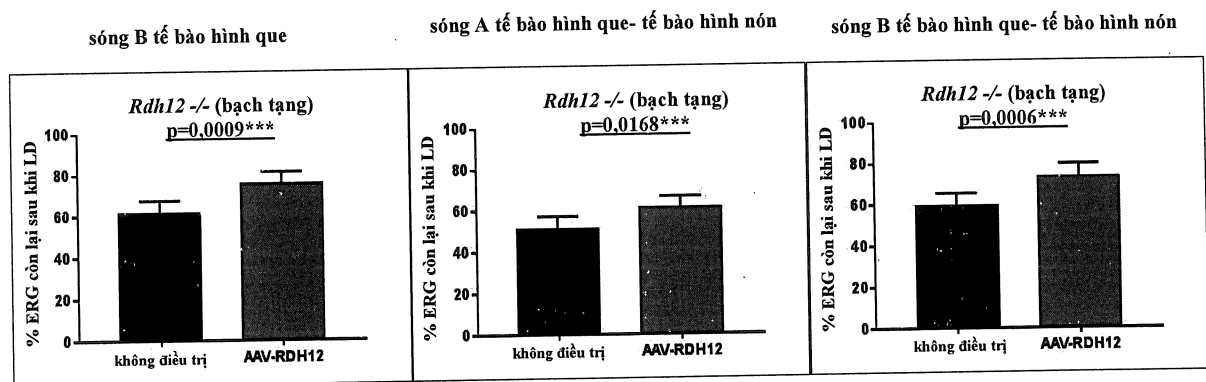
2/9

**Fig. 2**

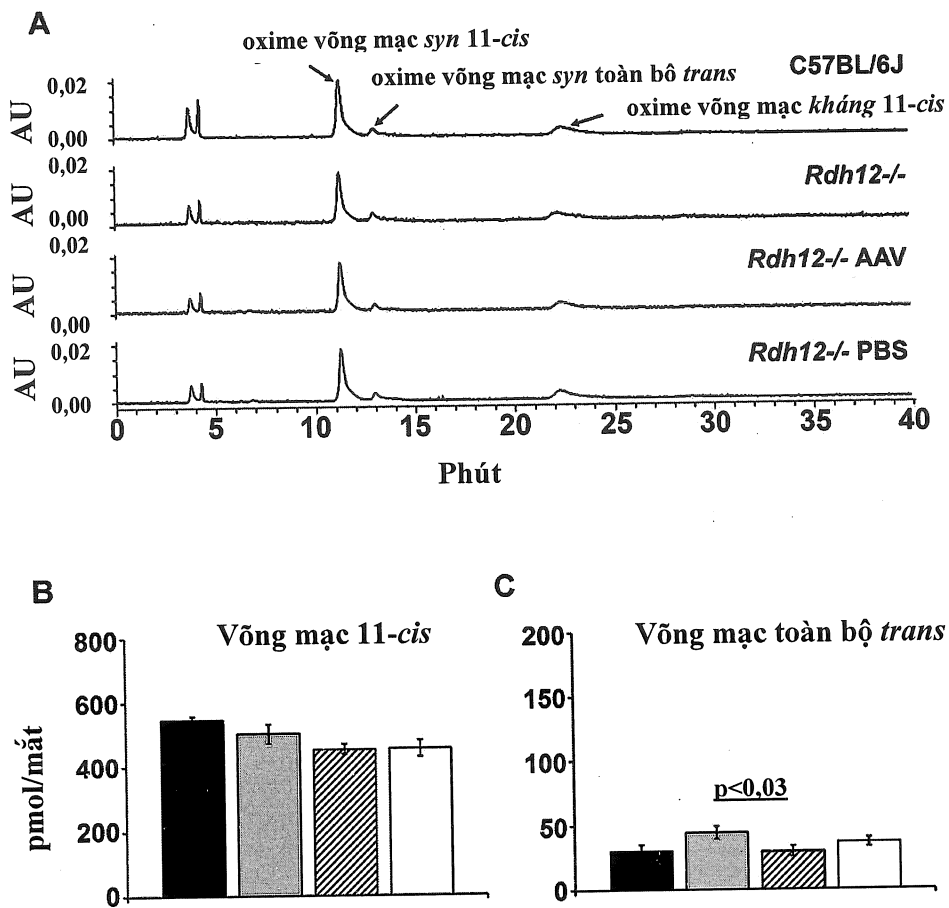
3/9

**Fig. 3**

4/9

**Fig. 4**

5/9

**Fig. 5**

6/9

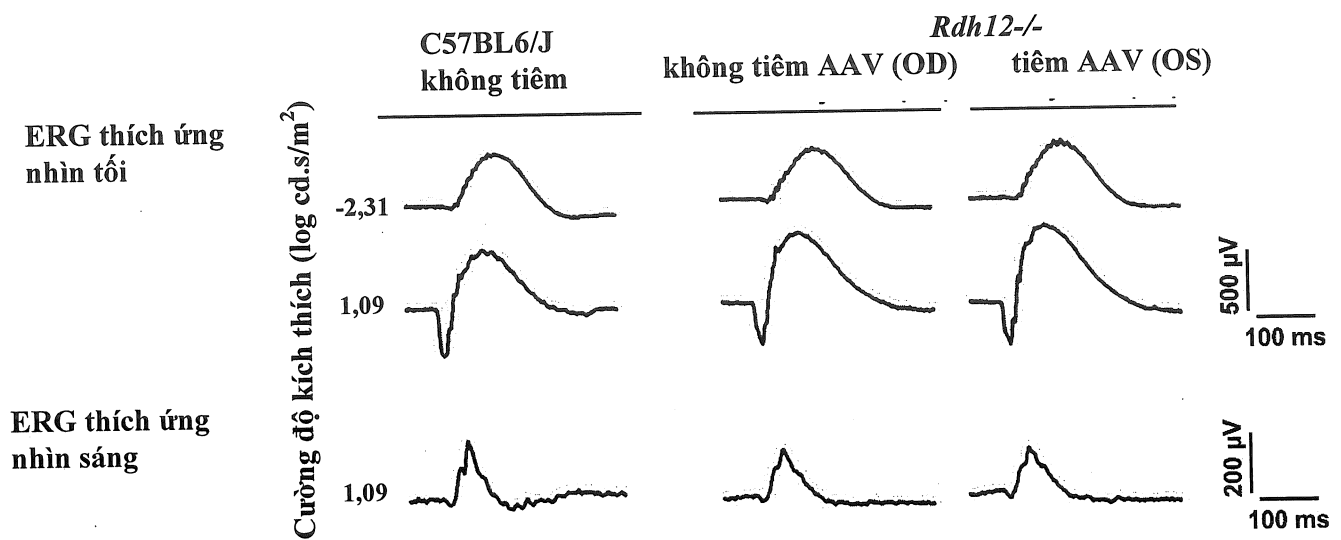


Fig. 6

7/9

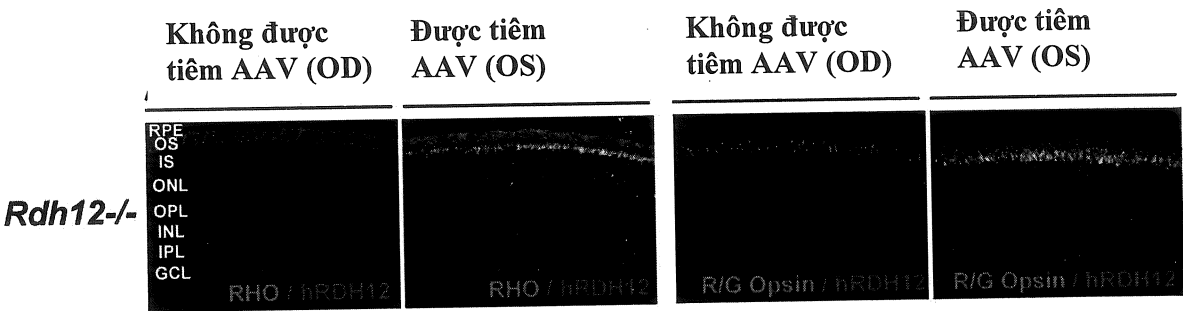
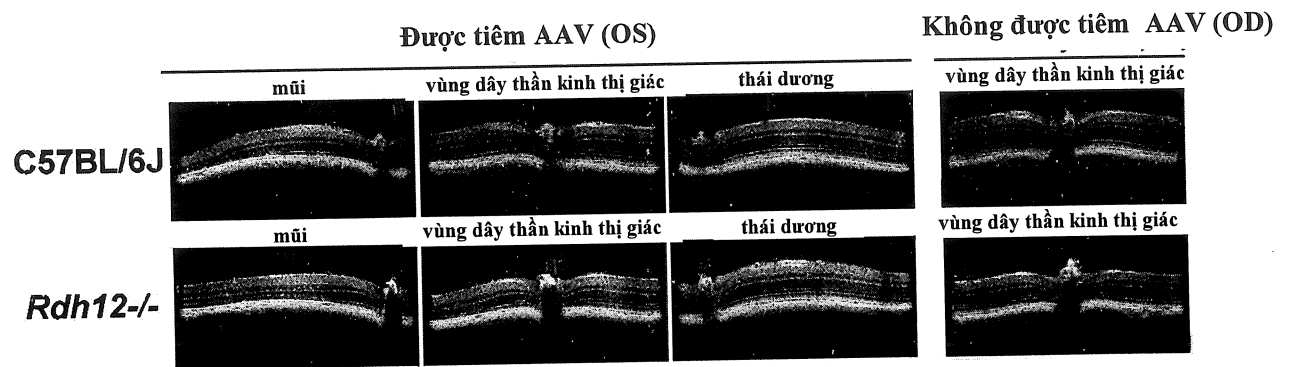
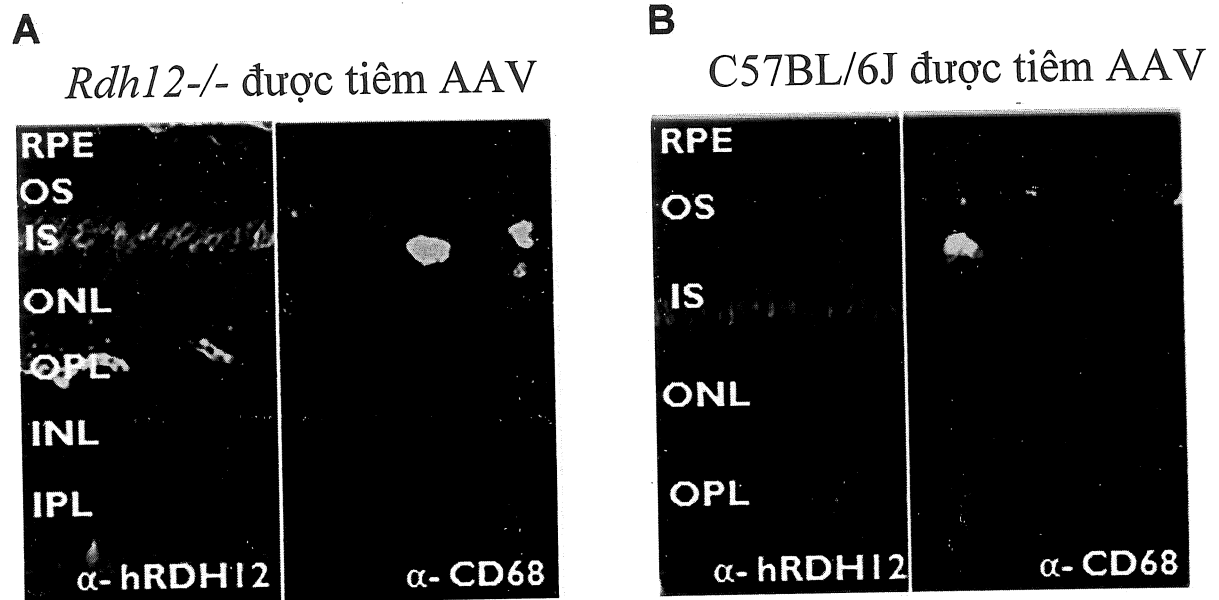


Fig. 7

8/9

**Fig. 8**

9/9

**Fig. 9**

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> The Regents of the University of Michigan

<120> VECTO VIRUT CÓ CHỨA VÙNG MÃ HÓA RDH12 VÀ PHƯƠNG PHÁP  
ĐIỀU TRỊ CHỨNG LOẠN DUỖNG VỖNG MẠC

<130> 30275/51914A

<150> US 62/586,624

<151> 2017-11-15

<160> 5

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1  
agttggaacg atgctgggtca ccttgggact gctcacctcc ttcttctcgt tcctgtatat  
60  
  
ggtagctcca tccatcagga agttctttgc tgggtggagtg tgtagaaca atgtgcagct  
120  
  
tcctggcaag gtagtggtga tcaactggcgc caacacgggc attggcaagg agacggccag  
180  
  
agagctcgt agccgaggag cccgagtcta tattgcctgc agagatgtac tgaaggggga  
240  
  
gtctgctgcc agtgaaatcc gagtggatac aaagaactcc caggtgctgg tgcggaaatt  
300  
  
ggacctatcc gacaccaa atctatccgagc ctttgctgag ggctttctgg cagaggaaaa  
360  
  
gcagctccat attctgatca acaatgcggg agtaatgatg tgtccatatt ccaagacagc  
420  
  
tgatggcttt gaaaccaccc tgggagtcaa ccacctgggc cacttctctc tcacctacct  
480  
  
gctcctggag cggctaaagg tgtctgcccc tgcacgggtg gttaatgtgt cctcgggtggc  
540  
  
tcaccacatt ggcaagattc ccttccacga cctccagagc gagaagcgct acagcagggg  
600  
  
ttttgcctat tgccacagca agctggccaa tgtgcttttt actcgtgagc tggccaagag  
660

gctccaaggc accgggggtca ccacctacgc agtgcaccca ggcgtcgtcc gctctgagct  
720

ggtcgggcac tcttcctgc tctgctgct ctggcggctc ttctccccct ttgtcaagac  
780

ggcacgggag ggggcgcaga ccagcctgca ctgcgccctg gctgagggcc tggagcccct  
840

gagtggcaag tacttcagtg actgcaagag gacctgggtg tctccaaggg cccgaaataa  
900

caaaacagct gagcgccat ggaatgtcag ctgtgagctt ctaggaatcc ggtgggagta  
960

gctggtggaa gagctgcagc tttatcaggc  
990

<210> 2  
<211> 316  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Val Thr Leu Gly Leu Leu Thr Ser Phe Phe Ser Phe Leu Tyr  
1 5 10 15

Met Val Ala Pro Ser Ile Arg Lys Phe Phe Ala Gly Gly Val Cys Arg  
20 25 30

Thr Asn Val Gln Leu Pro Gly Lys Val Val Val Ile Thr Gly Ala Asn  
35 40 45

Thr Gly Ile Gly Lys Glu Thr Ala Arg Glu Leu Ala Ser Arg Gly Ala  
50 55 60

Arg Val Tyr Ile Ala Cys Arg Asp Val Leu Lys Gly Glu Ser Ala Ala  
65 70 75 80

Ser Glu Ile Arg Val Asp Thr Lys Asn Ser Gln Val Leu Val Arg Lys  
85 90 95

Leu Asp Leu Ser Asp Thr Lys Ser Ile Arg Ala Phe Ala Glu Gly Phe  
100 105 110

Leu Ala Glu Glu Lys Gln Leu His Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Val  
 115 120 125

Met Met Cys Pro Tyr Ser Lys Thr Ala Asp Gly Phe Glu Thr His Leu  
 130 135 140

Gly Val Asn His Leu Gly His Phe Leu Leu Thr Tyr Leu Leu Leu Glu  
 145 150 155 160

Arg Leu Lys Val Ser Ala Pro Ala Arg Val Val Asn Val Ser Ser Val  
 165 170 175

Ala His His Ile Gly Lys Ile Pro Phe His Asp Leu Gln Ser Glu Lys  
 180 185 190

Arg Tyr Ser Arg Gly Phe Ala Tyr Cys His Ser Lys Leu Ala Asn Val  
 195 200 205

Leu Phe Thr Arg Glu Leu Ala Lys Arg Leu Gln Gly Thr Gly Val Thr  
 210 215 220

Thr Tyr Ala Val His Pro Gly Val Val Arg Ser Glu Leu Val Arg His  
 225 230 235 240

Ser Ser Leu Leu Cys Leu Leu Trp Arg Leu Phe Ser Pro Phe Val Lys  
 245 250 255

Thr Ala Arg Glu Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Cys Ala Leu Ala Glu  
 260 265 270

Gly Leu Glu Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Phe Ser Asp Cys Lys Arg Thr  
 275 280 285

Trp Val Ser Pro Arg Ala Arg Asn Asn Lys Thr Ala Glu Arg Leu Trp  
 290 295 300

Asn Val Ser Cys Glu Leu Leu Gly Ile Arg Trp Glu  
 305 310 315

<210> 3

<211> 199  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
gggccccaga agcctggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggcccccttg  
60  
  
gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaata ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt  
120  
  
ttctagcacc ttcttgccac tctaagcgt cctccgtgac cccggctggg atttagcctg  
180  
  
gtgctgtgtc agccccggt  
199

<210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 4  
  
Ser Pro Phe Phe Lys Ser Thr Ser Gln Gly Ala Gln  
1 5 10

<210> 5  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
  
Asp Cys Lys Arg Thr Trp Val Ser Pro Arg Ala Arg Asn Asn Lys Thr  
1 5 10 15