(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) **1-0020969**

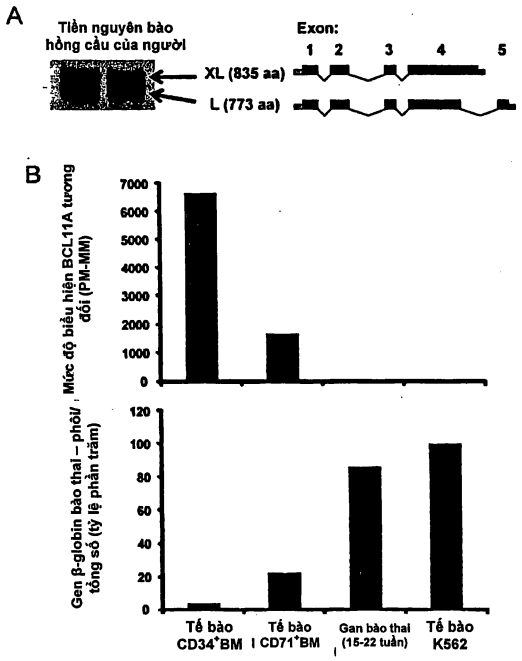
(51)[7] **C12N 15/11**, 5/071, C07H 21/02, C07K 14/00

(13) **B**

(21) 1-2011-01001
(22) 14.09.2009
(86) PCT/US2009/056770 14.09.2009
(87) WO2010/030963A9 18.03.2010
(30) 61/097,017 15.09.2008 US
61/222,571 02.07.2009 US
(45) 27.05.2019 374
(43) 27.02.2012 287
(73) 1. CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (US)
55 Shattuck Street, Boston, MA 02115, U.S.A.
2. PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (US)
17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138, U.S.A.
(72) ORKIN, Stuart, H. (US), SANKARAN, Vijay, G. (US)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP TĂNG NỒNG ĐỘ HEMOGLOBIN BÀO THAI TRONG TẾ BÀO

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai (HbF) trong nguyên bào tạo máu nhờ chất ức chế quá trình biểu hiện hoặc hoạt tính của BCL11A như ARN gây nhiễu và kháng thể. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa chất ức chế quá trình biểu hiện hoặc ức chế hoạt tính của BCL11A. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định chất điều biến hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai (HbF) trong nguyên bào tạo máu nhờ chất ức chế quá trình biểu hiện hoặc hoạt tính của BCL11A như ARN gây nhiễu và kháng thể. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa chất ức chế quá trình biểu hiện hoặc ức chế hoạt tính của BCL11A. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định chất điều biến hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hemoglobin ở người trưởng thành bao gồm 4 globin protein, trong đó có hai alpha (α) protein và hai beta (β) protein. Trong quá trình phát triển bào thai của động vật có vú, đặc biệt là ở người, thai sẽ tạo ra hemoglobin bào thai, bao gồm hai gamma (γ)-globin protein thay cho là hai β-globin protein. Tại một số thời điểm trong quá trình phát triển phôi hoặc trong giai đoạn sơ sinh, phụ thuộc vào từng loài cụ thể và từng cá thể, sự thay đổi globin sẽ diễn ra, được gọi là "quá trình chuyển đổi trong bào thai", tại thời điểm này, tế bào hồng cầu trong thai nhi sẽ chuyển từ việc tạo ra γ-globin sang chủ yếu tạo ra β-globin. Việc chuyển đổi trong quá trình phát triển từ việc tạo ra hemoglobin bào thai hay HbF ($\alpha_2\gamma_2$) chủ yếu là tạo ra hemoglobin trưởng thành hay HbA ($\alpha_2\beta_2$) bắt đầu vào khoảng từ 28 đến 34 tuần tính từ lúc mang thai và kéo dài đến sau khi sinh cho đến khi HbA chiếm ưu thế. Quá trình chuyển đổi này chủ yếu là do sự giảm phiên mã gen gamma-globin và gia tăng phiên mã gen beta-globin. Tính trung bình, máu của người lớn bình thường chỉ chứa khoảng 2% HbF, mặc dù nồng độ HbF có phương sai trên 20 lần ở người lớn khỏe mạnh (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)).

Các bệnh hemoglobin bao gồm một số dạng thiếu máu có nguồn gốc di truyền, trong đó có sự giảm tổng hợp và/hoặc tăng phá hủy (tan huyết) tế bào hồng cầu (RBC). Cũng có các khiếm khuyết di truyền dẫn đến việc tạo ra các hemoglobin bất thường kéo theo khả năng duy trì nồng độ oxy bị tổn thương. Một số rối loạn trên là do không có khả năng tạo ra đủ lượng β-globin bình thường, trong khi một số rối loạn khác là do

hoàn toàn không có khả năng tạo ra β-globin bình thường. Các rối loạn có liên quan đến β-globin protein thường được gọi là bệnh β-hemoglobin. Chẳng hạn, bệnh thiếu máu β là do khiếm khuyết một phần hoặc toàn bộ quá trình biểu hiện gen β-globin, dẫn đến thiếu hoặc không có HbA. Thiếu máu hồng cầu liềm là do một đột biến điểm trong gen cấu trúc β-globin, dẫn đến việc tạo ra hemoglobin bất thường (hình liềm) (HbS). Các tế bào hồng cầu hình liềm dễ bị phá vỡ hơn tế bào hồng cầu bình thường và dễ bị tan huyết hơn, cuối cùng sẽ gây chứng thiếu máu (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)).

Mới đây, việc tìm kiếm phương pháp điều trị với mục tiêu là giảm sự mất cân bằng chuỗi globin ở bệnh nhân bị bệnh β-hemoglobin tập trung vào việc biến đổi hemoglobin bào thai bằng thuốc (α2γ2; HbF). Khả năng điều trị của các phương pháp này được chứng minh bởi các phát hiện trên những cá thể mang kiểu hình nhẹ có đồng hợp gen thiếu máu β và tồn tại kéo dài của hemoglobin bào thai do di truyền (HPFH), cũng như bởi các bệnh nhân bị thiếu máu β đồng hợp không thể tổng hợp hemoglobin trưởng thành, nhưng ở những bệnh nhân này còn quan sát được sự giảm nhu cầu truyền máu khi có sự tăng nồng độ hemoglobin bào thai. Hơn nữa, còn quan sát được trong một số nhóm bệnh nhân bị bất thường chuỗi β có nồng độ hemoglobin bào thai (HbF) cao hơn bình thường, và có đặc điểm lâm sàng nhẹ hơn so với những bệnh nhân có nồng độ HbF trưởng thành bình thường. Chẳng hạn, một nhóm bệnh nhân thiếu máu hồng cầu liềm Arập Xê-ut biểu hiện 20 đến 30% HbF chỉ có biểu hiện lâm sàng nhẹ của bệnh này (Pembrey, et al., Br. J. Haematol. 40: 415-429 (1978)). Hiện nay, đã được công nhận rằng các rối loạn hemoglobin, như thiếu máu hồng cầu liềm và thiếu máu β sẽ giảm đi khi tăng tổng hợp HbF (Tổng kết trong tài liệu "Jane and Cunningham Br. J. Haematol. 102: 415-422 (1998)" và "Bunn, N. Engl. J. Med. 328: 129-131 (1993)").

Như đã nêu, quá trình chuyển đổi từ hemoglobin bào thai sang hemoglobin trưởng thành (α2γ2; HbA) thường diễn ra trong khoảng 6 tháng sau khi sinh. Tuy nhiên, ở phần lớn bệnh nhân bị bệnh β-hemoglobin, gen γ globin ngược dòng là nguyên vẹn và còn đầy đủ chức năng, do đó nếu các gen này được tái hoạt hóa, quá trình tổng hợp hemoglobin chức năng có thể được duy trì khi trưởng thành, và do đó

giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)). Đáng tiếc là, các cơ chế phân tử *in vivo* trong quá trình chuyển đổi globin chưa được hiểu rõ.

Bằng chứng ủng hộ khả năng tái hoạt hóa quá trình sinh tổng hợp hemoglobin bào thai là các thử nghiệm trong đó đã chỉ ra được rằng máu ngoại vi, chứa các tế bào tạo dòng, khi được bổ sung một hỗn hợp thích hợp các yếu tố sinh trưởng, sẽ tạo ra các dòng tế bào hồng cầu và phát triển mạnh trong môi trường nuôi cấy bán lỏng. Từng tế bào riêng biệt trong các dòng tế bào này có thể tích lũy hemoglobin bào thai (HbF), hemoglobin trưởng thành (HbA) hoặc hỗn hợp của cả hai loại này. Trong môi trường nuôi cấy từ máu người trưởng thành, các tế bào hồng cầu có nhân chỉ tích lũy HbA (F-A+), hoặc hỗn hợp của HbF và HbA (F+A+) (Papayannopoulou, et al., Science 199: 1349-1350 (1978); Migliaccio, et al., Blood 76: 1150-1157 (1990)). Quan trọng là, từng dòng tế bào riêng biệt vẫn chứa cả tế bào F+ và tế bào F-, chỉ ra rằng cả hai loại đều có nguồn gốc từ cùng một dòng tế bào gốc tuần hoàn. Do đó, trong những giai đoạn sớm của quá trình phát triển trong môi trường nuôi cấy, các tế bào sẽ quyết định, qua các cơ chế hiện nay còn chưa rõ, liệu có biểu hiện HbF hay không. Tỷ lệ tế bào F+ trưởng thành phát triển trong môi trường nuôi cấy cho thấy không có biểu hiện là đã được lập trình trước *in vivo*, nhưng có biểu hiện phụ thuộc vào điều kiện môi trường nuôi cấy: sự chuyển sang con đường biểu hiện HbF và HbA kết hợp, chẳng hạn, có thể đạt được *in vitro* nhờ nồng độ huyết thanh cao, do hoạt tính của một hợp chất chưa xác định được có thể được hấp thu trên than hoạt tính (Bohmer, et al., Prenatal Diagnosis 19: 628-636 (1999); Migliaccio, et al., Blood 76: 1150 (1990); Rosenblum, et al., in: Experimental Approaches for the Study of Hemoglobin 397 (1985)).

Tóm lại, việc xác định phân tử có vai trò trong quá trình chuyển đổi globin là quan trọng để phát triển các phương án điều trị mới tác động đến hemoglobin trưởng thành và kích thích quá trình tổng hợp hemoglobin bào thai. Các phân tử này sẽ tạo ra các đích mới để phát triển các phương pháp điều trị can thiệp cho nhiều bệnh hemoglobin trong đó quá trình tái hoạt hóa tổng hợp hemoglobin bào thai sẽ giảm đáng kể mức độ nghiêm trọng của bệnh và tỷ lệ tử vong của bệnh nhân.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều biến quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai (HbF) thông qua BCL11A.

Sáng chế dựa một phần vào việc xác định chức năng của protein BCL11A, cụ thể là protein BCL11A có thể hoạt động như một yếu tố điều hoà đặc hiệu theo giai đoạn quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai trong tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với một lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A, nhờ đó quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai được tăng lên trong nguyên bào tạo máu hoặc tăng trong tế bào thế hệ sau của nó, so với trước khi tiếp xúc với chế phẩm.

Nguyên bào tạo máu sẽ được cho tiếp xúc *ex vivo*, *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án khác, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc với chế phẩm là dòng tế bào tạo hồng cầu.

Theo một phương án, chế phẩm nêu trên sẽ ức chế quá trình biểu hiện BCL11A. Theo một phương án, chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A sẽ được chọn từ một phân tử nhỏ và axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên, chất ức chế là axit nucleic bao gồm tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A hoặc vectơ mã hoá tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A. Theo phương án được ưu tiên, tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit từ trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đến trình tự nêu trong SEQ ID NO:6.

Theo một phương án, chế phẩm nêu trên sẽ ức chế hoạt tính BCL11A. Theo một phương án, chất ức chế hoạt tính BCL11A được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng BCL11A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử nhỏ và axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên khác, axit nucleic là tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A, vectơ mã hóa tác nhân gây nhiễu ARN, hoặc một aptamer gắn kết với BCL11A. Theo một phương án được ưu tiên, tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 6.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu của động vật có vú tiếp xúc với một lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A, nhờ đó mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai được tăng lên ở động vật có vú so với mức độ biểu hiện trước khi cho tiếp xúc.

Theo một phương án, động vật có vú đã được chẩn đoán bị bệnh hemoglobin. Theo một phương án khác, bệnh hemoglobin là bệnh β-hemoglobin. Theo một phương án khác, bệnh hemoglobin là bệnh hồng cầu liềm. Bệnh hồng cầu liềm có thể là thiếu máu hồng cầu liềm, bệnh hồng cầu liềm hemoglobin C (HbSC), thiếu máu hồng cầu liềm beta + (HbS/β+) và thiếu máu hồng cầu liềm beta-không (HbS/β0). Theo một phương án khác, bệnh hemoglobin là thiếu máu β.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc với chế phẩm *ex vivo* hoặc *in vitro*, và tế bào hoặc tiền tế bào của nó sẽ được sử dụng cho động vật có vú . Theo một phương án khác, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc với chế phẩm là tế bào tạo hồng cầu.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc với chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng. Theo một phương án khác, chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A được sử dụng bằng cách tiêm, truyền, nhỏ giọt hoặc uống.

Theo một phương án, chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A sẽ ức chế quá trình biểu hiện BCL11A. Theo một phương án khác, chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A được chọn từ phân tử nhỏ và axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên, axit nucleic là tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A hoặc vectơ mã hóa tác nhân gây nhiễu ARN, hoặc aptamer gắn với BCL11A. Theo một phương án được ưu tiên, tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit từ trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đến trình tự nêu trong SEQ ID NO:6.

Theo một phương án, chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A sẽ ức chế hoạt tính của BCL11A. Theo một phương án khác, chất ức chế hoạt tính BCL11A được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng BCL11A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử nhỏ và axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên, chất ức chế hoạt tính

BCL11A có nguồn gốc axit nucleic là ARN gây nhiễu đặc hiệu với BCL11A, vectơ mã hóa tác nhân gây nhiễu ARN hoặc aptame gắn với BCL11A. Theo một phương án khác, tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit từ trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 đến trình tự nêu trong SEQ ID NO:6.

Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định chất điều biến hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm, và đo nồng đồ hemoglobin bào thai hoặc ARN thông tin hemoglobin bào thai trong nguyên bào tạo máu hoặc tiền tế bào của nó, trong đó sự tăng nồng độ hemoglobin bào thai sẽ chỉ ra rằng hợp chất thử nghiệm là một chất ức chế hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc *in vivo*, *ex vivo*, hoặc *in vitro*. Theo một phương án, tế bào này có nguồn gốc từ người, linh trưởng không phải người hoặc động vật có vú. Theo một phương án, hợp chất thử nghiệm là phân tử nhỏ, kháng thể hoặc axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm sẽ tạo ra sự tăng quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A-1B thể hiện quá trình biểu hiện BCL11A ở tế bào tạo hồng cầu của người.

Fig.1A thể hiện các dạng đồng phân chính của BCL11A có trong dịch chiết nhân của tế bào hồng cầu người.

Fig.1B so sánh quá trình biểu hiện BCL11A và nồng độ hemoglobin bào thai trong tế bào hồng cầu ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh cá thể.

Fig.2A thể hiện biến thể rs4671393 có liên quan đến quá trình biểu hiện BCL11A trong dòng tế bào nguyên bào lympho của quần thể người HapMap châu Âu (CEU) và châu Phi (YRI).

Fig.2B là kết quả thấm tách Western dịch thủy phân nguyên bào hồng cầu nguyên phát trong tủy xương (BM) của người, nguyên bào hồng cầu lấy từ gan bào thai (FL) trong giai đoạn ba tháng thứ hai, nguyên bào hồng cầu nguyên phát tuần

hoàn trong giai đoạn ba tháng thứ nhất, và tế bào K562. Nguyên bào hồng cầu nguyên phát theo từng giai đoạn phát triển của người được phân lập bằng cách chọn lọc dương tính kép đối với cả CD235 và CD71. Các băng XL và L nhập vào với nhau ở đây là do khả năng tách bị giảm trên thử nghiệm thấm tách này.

Fig.3A-3D thể hiện phương pháp sàng lọc ái lực protein được sử dụng để xác định protein gắn với BCL11A trong tế bào hồng cầu.

Fig.3A là giản đồ được sử dụng để tinh chế ái lực ở tế bào tăng sinh nguyên tủy bào hồng cầu của chuột (mouse erythroleukemia – MEL).

Fig.3B thể hiện kết quả của quá trình sàng lọc loại trừ.

Fig.3C thể hiện kết quả của các phân tích trên vi mạch Affymetrix.

Fig.3D nhấn mạnh các cấu trúc lặp lại tìm thấy trong BCL11A và một số protein khác được cho là tương tác với phức hệ ức chế NuRD.

Fig.4A-4E khẳng định các liên kết của BCL11A với GATA-1, FOG-1, và phức hệ NuRD trong tế bào hồng cầu.

Fig.4A thể hiện kết quả của thử nghiệm kết tủa miễn dịch khẳng định tương tác của BCL11A với GATA-1, FOG-1, MTA2 và RBBP7 trong tế bào hồng cầu (MEL).

Fig.4B thể hiện minh họa liên kết của BCL11A với MTA2, GATA-1 và FOG-1 sử dụng phương pháp lọc trên gel cho các phân đoạn từ dịch chiết nhân tế bào hồng cầu.

Fig.4C và 4D thể hiện kết quả của thử nghiệm kết tủa miễn dịch khẳng định tương tác của BCL11A với GATA-1và FOG-1 bằng quá trình biểu hiện ngoại sinh trong tế bào Cos7.

Fig.4E thể hiện kết quả của thử nghiệm kết tủa miễn dịch để thiết lập bản đồ liên kết của BCL11A trên phân tử GATA-1.

Fig.5A-5E thể hiện BCL11A hoạt động như một chất kìm hãm gen γ-globin.

Fig.5A thể hiện sự giảm BCL11A qua trung gian siARN dẫn đến các sự tăng nồng độ mARN của γ-globin trong tế bào tạo hồng cầu của người.

Fig.5B thể hiện quá trình biểu hiện gen toàn phần không được điều biến nhiều trong các tế bào được hướng đích bởi siARN BCL11A.

Fig.5C thể hiện việc đưa shARN qua trung gian lentivirut vào tế bào tạo hồng cầu người dẫn đến sự giảm từ 60% đến 97%.

Fig.5D thể hiện các tế bào được hướng đích shARN là không khác biệt với các tế bào đối chứng về mặt hình thái.

Fig.5E thể hiện quá trình kích thích mARN γ-globin trong các tế bào đáp ứng với sự giảm BCL11A.

Fig.5F thể hiện dịch máu tan từ các tế bào vào ngày thứ 12 của quá trình biệt hóa cho thấy sự có mặt của HbF trưởng thành.

Fig.6A-H thể hiện γ-globin của người được biểu hiện trong tế bào hồng cầu nguyên phát của chuột có locut β.

Fig.6A thể hiện biểu đồ FACS thể hiện FSC (tỷ lệ tuyến tính) so với với SSC (tỷ lệ cấp số nhân) đối với máu lấy từ dòng tế bào phôi E13.5. Tỷ lệ cho thấy mức độ làm giàu của dòng tế bào nguyên phát và dòng tế bào trưởng thành.

Fig.6B là biểu đồ mô học thể hiện quá trình biểu hiện tương đối của gen εγ globin, gen ε trong phôi người và gen γ-globin của người trong nhóm tế bào nguyên phát (P), so với nhóm tế bào trưởng thành (D). Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n>3 trong một nhóm). P=0,98 đối với kiểm định hai phía t-test so sánh mức độ làm giàu tương đối của εγ với γ-globin.

Fig.6C-H thể hiện thử nghiệm nhuộm hóa mô miễn dịch bằng kháng thể kháng HbF từ tế bào gan bào thai của người và chuột E13.5. Ảnh được chụp bằng vật kính 60X.

Fig.6C thể hiện tế bào gan bào thai của người chứa rất nhiều nguyên bào hồng cầu, đều nhuộm dương tính đối với quá trình biểu hiện γ-globin.

Fig.6D và 6E thể hiện nguyên bào hồng cầu trưởng thành trong gan không thể hiện đặc tính nhuộm γ-globin và chỉ một số tế bào có hình thái sơ cấp của nguyên hồng cầu khổng lồ dương tính với thử nghiệm nhuộm (mũi tên).

Fig.6E và 6F thể hiện nhiều tế bào nguyên phát nguyên hồng cầu khổng lồ trong hệ tuần hoàn có đặc tính nhuộm dương tính cao (đầu mũi tên trên Fig.6E; mũi tên trên Fig.6F), trong khi đó các tế bào hồng cầu trưởng thành nhỏ hơn lại âm tính (trên Fig.6F là các vòng tròn màu xám nhỏ hơn).

Fig.6G và 6H thể hiện thử nghiệm nhuộm được thực hiện các dòng YAC một bản sao A20 và A858 cho các mẫu nhuộm tương tự. Nhuộm dương tính được xác định so với nhuộm chất nền từ nhóm chứng âm tính là chuột cùng lứa chuyển gen.

Fig.7A-D thể hiện phân tích PT-FISH cho thấy rằng mức độ biểu hiện γ -globin tương đương với các globin bào thai của tế bào hồng cầu nguyên phát. Hai dòng chuột YAC chuyển gen độc lập, A85 (Fig.7A và 7C) và A20 (Fig.7B và 7D) được phân tích sử dụng phương pháp lai *in situ* phát huỳnh quang bốn màu cho ARN phiên mã sơ cấp (PT-FISH). Đối với tập hợp thử nghiệm thứ nhất, đầu dò được tạo ra để hướng đến α-globin của chuột (mα), β-globin của người (hβ), và γ-globin của người (hγ). Thêm vào đó, DAPI được sử dụng để xác định nhân của các tế bào.

Fig.7A và B thể hiện mức độ biểu hiện γ-globin chiếm ưu thế trong hai dòng tế bào trong nhóm tế bào máu nguyên phát (PBC) từ các phôi E1 1.5 và E13.5. Mức độ biểu hiện thấp được thấy trong nhóm tế bào trưởng thành trong gan (FL) ở phôi E13.5. Nhiều tế bào trong số này có thể là các tế bào nguyên phát được tìm thấy trong nhu mô gan.

Fig.7C và 7D thể hiện quá trình biểu hiện tương đương của mεy và hγ đối với lần lượt PBC trong E13.5 và FL trong E13.5. Đồ thị thể hiện tỷ lệ phần trăm số locut hoạt động và được xác định đối với ≥100 nhân trên một tập hợp đầu dò tại mỗi thời điểm.

Fig.8A-8B thể hiện quá trình biểu hiện BCL11A là khác nhau giữa người và chuột, đưa ra một mẫu hình về sự thay đổi tác động ngoại phân tử đến quá trình biểu hiện gen β-globin.

Fig.8A thể hiện các tế bào người, các protein nguyên vẹn của BCL11A (đồng phân XL/L) bị giảm đi trong nhóm tế bào biểu hiện γ-globin nồng độ cao, bao gồm các tế bào nguyên phát và tế bào gan trong thai.

Fig.8B là mẫu giản đồ thể hiện sự phát triển của quá trình điều hoà gen globin giống β ở người, chuột và chuột chứa locut β. Sự phát triển của quá trình tạo hồng cầu ở động vật có vú và nguyên bào được thể hiện ở phần trên. Các nguyên bào, bao gồm nguyên bào hồng cầu nguyên phát (EryP-CFC), tế bào gốc tạo máu trưởng thành (HSC), và các tế bào tạo đám hồng cầu trưởng thành (BFU-E) được thể hiện. Động mạch chủ trung thân-sinh dục (AGM) và bào thai là các vị trí của quá trình tạo máu trưởng thành. Mẫu của globin giống β và BCL11A quan sát được ở hai loài được thể hiện ở phía dưới.

Fig.9A đến 9F thể hiện chuột BCL11A -/- không thể ức chế quá trình biểu hiện gen globin giống β và gen β-globin của người trong phôi.

Fig.9A thể hiện kiểu biểu hiện CD71/Ter119 đối với các tế bào gan bào thai từ các phôi E14.5, thể hiện quá trình tạo hồng cầu rất bình thường với các chỉ thị kiểu hình nói trên. Tỷ lệ phần trăm trung bình đối với các nhóm trong mỗi góc phần tư được thể hiện bằng màu đỏ (n=6 đối với với đối chứng fl/+ và n=4 đối với thể đột biến -/-). P > 0,1 theo kiểm định t-test hai phía đối với tất cả các nhóm được chọn để phân tích.

Fig.9B thể hiện quá trình biểu hiện của globin phôi dưới dạng tỷ lệ phần trăm globin giống β tổng số của chuột đối với chuột đối chứng (fl/+), chuột mang kiểu gen dị hợp BCL11A (+/-), và chuột mang kiểu gen lặn (-/-) trong E14.5 (n lần lượt bằng 10, 14, 11).

Fig.9C thể hiện quá trình biểu hiện globin trong phôi ở dạng tỷ lệ phần trăm globin giống β tổng số trong E18.5 (n lần lượt bằng 9, 9, 7).

Fig.9D thể hiện thử nghiệm hóa mô miễn dịch được thực hiện trên tế bào gan bào thai của E14.5 từ các động vật mang kiểu gen BCL11A fl/+ và -/- đối với globin εγ trong phôi. Các tiêu bản đại diện có độ phóng đại 40X với vật kính 10X.

Fig.9E thể hiện thử nghiệm nhuộm IHC tương tự được thực hiện đối với globin βh1. Trong cả hai trường hợp đều quan sát được quá trình biểu hiện mạnh trong nguyên bào hồng cầu nhấp nháy của tế bào gan bào thai ở chuột mang kiểu gen -/-, nhưng không quan sát được ở chuột đối chứng.

Fig.9F thể hiện quá trình biểu hiện gen β-globin của người ở động vật mang các kiểu gen BCL11A khác nhau khi có gen chuyển YAC locut β (YAC+) ở E14.5 (n=4, 6, 4 lần lượt đối với fl/+, +/-, và -/-) và E18.5 (n=4, 7, 4). Tất cả nồng độ γ- và β-globin đối với các kiểu gen khác nhau đều khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 1X10^{-5}$ theo kiểm định t-test hai phía). Tất cả dữ liệu được vẽ biểu đồ dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của giá trị đo được.

Fig.10 thể hiện sự không đáp ứng được với các kích thích lặp lại ở chuột β-YAC trưởng thành. Chuột mang locut β trưởng thành có đáp ứng khác nhau với kích thích γ-globin.

Fig.11 thể hiện ARN BCL11A được biểu hiện trong các tế bào trưởng thành của chuột, chứ không phải các tế bào nguyên phát.

Fig.12 thể hiện chuột BCL11A -/- bình thường về mặt hình thái và hoàn toàn thiếu quá trình biểu hiện BCL11A trong tế bào gan.

Fig.12A là các ví dụ về chuột đối chứng (fl/+) và chuột đột biến (-/-) từ cùng một lứa ở giai đoạn E18.5. Chuột đạt được tỷ lệ Menden kỳ vọng ở giai đoạn E18.5 và chuột đột biến và chuột đối chứng không có khác biệt về mặt hình thái.

Fig.12B là quá trình biểu hiện protein BCL11A được đánh giá trong các tế bào gan E18.5 và cho thấy quá trình biểu hiện giảm ở động vật mang kiểu gen dị hợp, và không có quá trình biểu hiện ở động vật mang kiểu gen lặn. GAPDH được sử dụng làm đối chứng.

Fig.13 thể hiện chuột BCL11A -/- có quá trình tạo hồng cầu bình thường về mặt kiểu hình ở E18.5. Quá trình biệt hóa hồng cầu được đánh giá sử dụng chỉ thị CD71 và Ter-1 19 trong tế bào gan của chuột E18.5 (Sankaran, V.G., et al., 2008, Genes Dev 22, 463-475). Giá trị trung bình được ghi ở mỗi góc phần tư (n=9 đối với đối chứng và 7 đối với động vật mang kiểu hình lặn).

Fig.14 thể hiện chuột BCL11A -/- có hình thái hồng cầu bình thường. Các mẫu ly tâm tế bào từ hỗn dịch tế bào gan nhuộm May-Grünwald-Giemsa được lấy từ E14.5 và E18.5. Tất cả ảnh đều được chụp bằng vật kính 10X và ghi rõ có độ phóng đại.

Fig.15A và B là phân tích mô học của tế bào gan của chuột BCL11A -/- cho thấy quá trình sinh tổng hợp hồng cầu bình thường về mặt hình thái và mô học.

Fig.15A thể hiện tiêu bản cắt dọc với độ phân giải thấp và không có bất thường về mặt mô học ở những con chuột mang kiểu gen này (độ phóng đại 5X).

Fig.15B thể hiện tiêu bản mô học được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E) ở hai độ phóng đại (vật kính 10X và thị kính 40X) của tế bào gan E14.5 và E18.5. Các tiêu bản này cho thấy các đám nguyên bào hồng cầu trong gan có vẻ như bình thường về số lượng và hình thái.

Fig.16A và 16B thể hiện chuột BCL11A -/- có quá trình điều hoà ngược globin bào thai trong gan.

Fig.16A thể hiện quá trình biểu hiện ARN tương đối của gen globin giống β được chỉ ra ở nhóm chứng (BCL11A fl/+), chuột mang kiểu gen dị hợp (BCL11A -/+), và chuột mang kiểu gen lặn (BCL11A -/-) của E14.5 (n=10, 14, 11 lần lượt đối với các nhóm nêu trên). Ngoài ra, quá trình biểu hiện ARN BCL11A tương đối cũng được thể hiện. Quá trình biểu hiện tương đối được chuẩn hóa bằng GAPDH (với GAPDH được đặt giá trị là 1). Tất cả số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Fig.16B thể hiện quá trình biểu hiện ARN tương đối (được chuẩn hóa đến GAPDH) của gen globin giống β đối với nhóm chứng, chuột mang kiểu gen dị hợp và chuột mang kiểu gen lặn của E18.5 (n=9, 9, 7 lần lượt đối với các nhóm trên). Tất cả số liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Fig.17 thể hiện thử nghiệm hóa mô miễn dịch của chuột BCL11A -/- cho thấy quá trình điều hòa ngược globin bào thai trong gan. Thử nghiệm hóa mô miễn dịch được thực hiện trên gan của E18.5 của chuột BCL11A fl/+ và -/- đối với globin βh1 bào thai. Các tiêu bản đại diện với độ phóng đại 40X và vật kính 10X được thể hiện. Thử nghiệm nhuộm IHC tương tự được thực hiện đối với εγglobin được đánh dấu trên Fig.

Fig.18A thể hiện tỷ lệ phần trăm cho tất cả các gen globin giống β ± độ lệch chuẩn trong E14.5 ở chuột mang locut β so với chuột mang gen BCL11A đột biến.

Fig.18B thể hiện tỷ lệ phần trăm cho tất cả các gen globin giống β ± độ lệch chuẩn trong E18.5 ở chuột mang locut β so với chuột mang gen BCL11A đột biến. Tất cả nồng độ γ- và β-globin đối với các kiểu gen khác nhau đều khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 1x10^{-5}$ bằng kiểm định t-test hai phía).

Fig.19 thể hiện BCL11A chiếm giữ các vùng riêng biệt trong locut β-globin của người trong các tế bào tạo hồng cầu ở người trưởng thành. Locut β-globin của người được thể hiện ở trên với các vùng có khả năng liên kết đáng kể bắt màu xám trong biểu đồ mô học bên dưới. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (n=3/nhóm).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phương pháp điều hòa quá trình tổng hợp hemoglobin bào thai (HbF- fetal hemoglobin) để điều trị bệnh hemoglobin β và đề cập đến các phương pháp sàng lọc trong đó.

Sáng chế dựa trên việc phát hiện ra chức năng mới của protein BCL11A, cụ thể là, protein BCL11A hoạt động như một yếu tố điều hòa đặc hiệu giai đoạn quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai và quá trình biểu hiện BCL11A sẽ ức chế quá trình tạo γ-globin. Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp điều hoà quá trình biểu hiện γ-globin trong tế bào hồng cầu. Cụ thể hơn, những hoạt tính này có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh β-hemoglobin bằng cách kích thích tạo γ-globin thông qua việc ức chế sản phẩm gen BCL11A.

Hemoglobin bào thai (HbF) là một tứ phân gồm hai polypeptit α-globin trưởng thành và hai polypeptit γ-globin giống β bào thai. Trong quá trình phát triển thai, các gen γ-globin được sao chép cấu thành các gen chủ yếu được phiên mã từ locut β-globin. Sau khi sinh, γ-globin sẽ dần bị thay thế bằng β-globin trưởng thành, một quá trình được gọi là "quá trình chuyển đổi trong bào thai" (3). Cơ chế phân tử của quá trình này vẫn chưa được biết nhiều và hiện trở thành đối tượng của nhiều nghiên cứu sâu. Việc chuyển đổi trong quá trình phát triển từ chỗ chủ yếu tạo ra hemoglobin bào thai hay HbF ($\alpha_2\gamma_2$) sang chủ yếu tạo ra hemoglobin trưởng thành hay HbA ($\alpha_2\beta_2$) bắt đầu từ khoảng từ tuần 28 đến tuần 34 của thời kỳ mang thai và tiếp diễn đến sau khi

sinh cho đến khi HbA chiếm ưu thế. Quá trình chuyển đổi này, trước tiên, là do quá trình phiên mã gen gamma-globin giảm và quá trình phiên mã gen beta-globin tăng. Trung bình, máu của người lớn khỏe mạnh sẽ chỉ chứa khoảng 2% HbF, mặc dù nồng độ HbF dư có sai số cao hơn 20 lần ở người lớn khỏe mạnh (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)).

Bệnh hemoglobin bao gồm một số dạng bệnh thiếu máu do nguyên nhân di truyền trong đó có sự giảm sản xuất ra và/hoặc tăng phá hủy (huyết tán) tế bào hồng cầu (RBC). Các rối loạn này cũng bao gồm một số khiếm khuyết di truyền dẫn đến việc tạo ra các hemoglobin bất thường với khả năng duy trì nồng độ oxy bị suy giảm đi kèm. Một số rối loạn như vậy liên quan đến việc không sản xuất đủ lượng β-globin bình thường, trong khi một số rối loạn khác liên quan đến việc tạo β-globin tổng thể bình thường. Các rối loạn đi kèm đặc hiệu với β-globin protein thường được gọi chung là bệnh β-hemoglobin. Chẳng hạn, thiếu máu β do suy giảm một phần hoặc hoàn toàn quá trình biểu hiện gen β-globin, dẫn đến suy giảm hoặc không có HbA. Thiếu máu hồng cầu liềm do một đột biến điểm trong gen cấu trúc β-globin, dẫn đến việc tạo ra hemoglobin bất thường (hình liềm) (HbS). Tế bào hồng cầu HbS dễ bị tổn thương hơn so với RBC bình thường và dễ bị huyết tán hơn, cuối cùng sẽ gây thiếu máu (Atweh, Semin. Hematol. 38(4):367-73 (2001)). Hơn nữa, sự có mặt của biến thể di truyền *BCL11A*, thể đột biến HBS1L-MYB, sẽ làm giảm mức độ nghiêm trọng về mặt lâm sàng của tình trạng thiếu máu beta. Biến thể này đã được chỉ ra là đi kèm với nồng độ HbF. Ở đây, thấy có một tỉ lệ khác biệt bằng 5 của dạng thiếu máu beta ít nghiêm trọng hơn của biến thể có nồng độ HbF cao (Galanello S. et al., 2009, Blood, in press).

Mới đây, việc tìm kiếm phương pháp điều trị có mục tiêu làm giảm sự mất cân bằng chuỗi globin ở bệnh nhân bị bệnh β-hemoglobin tập trung vào việc gây tác động dược lý đến hemoglobin bào thai ($\alpha 2\gamma 2$; HbF). Tiềm năng điều trị của các phương pháp này được thể hiện ở các phát hiện về kiểu hình nhẹ của các cá thể bị cả thiếu máu β đồng hợp mà vẫn duy trì hemoglobin bào thai do di truyền (HPFH), cũng như các bệnh nhân bị thiếu máu β° đồng hợp, là những bệnh nhân không tổng hợp hemoglobin trưởng thành, nhưng ở những bệnh nhân này có nhu cầu truyền máu giảm khi gia tăng nồng độ hemoglobin bào thai. Hơn nữa, thấy rằng một số nhóm bệnh nhân trưởng

thành bị bất thường chuỗi β có nồng độ hemoglobin bào thai (HbF) cao hơn bình thường, và các bệnh nhân này đã được coi là có mức độ lâm sàng nhẹ hơn so với các bệnh nhân có nồng độ HbF khi trưởng thành bình thường. Chẳng hạn, một nhóm bệnh nhân thiếu máu hồng cầu liềm A-rập Xê-ut biểu hiện từ 20 đến 30% HbF chỉ biểu hiện dạng nhẹ của bệnh (Pembrey, et al., Br. J. Haematol. 40: 415-429 (1978)). Hiện nay, đã được công nhận là bệnh β-hemoglobin, như thiếu máu hồng cầu liềm và thiếu máu β sẽ được cải thiện bằng cách tăng quá trình sinh tổng hợp HbF gia tăng. (Reviewed in Jane and Cunningham Br. J. Haematol. 102: 415-422 (1998) và Bunn, N. Engl. J. Med. 328: 129-131 (1993)).

Hiện nay, trong khi các cơ chế phân tử kiểm soát quá trình chuyển đổi *in vivo* từ biểu hiện gen γ-globin sang biểu hiện gen β-globin chưa được biết, nhưng ngày càng có nhiều bằng chứng về các yếu tố ngoại sinh có thể ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện gen γ-globin. Nhóm hợp chất đầu tiên được phát hiện có hoạt tính tái hoạt hóa HbF là các chất gây độc tế bào. Khả năng gây ra quá trình sinh tổng hợp *de novo* HbF bằng cách can thiệp dược lý lần đầu tiên được thực hiện bằng cách sử dụng 5-azaxytidin ở động vật thử nghiệm (DeSimone, Proc Natl Acad Sci U S A. 79(14):4428-31 (1982)). Các nghiên cứu tiếp theo đã khẳng định khả năng tăng nồng độ HbF ở bệnh nhân bị thiếu máu β và bệnh hồng cầu liềm của 5-azaxytidin (Ley, et al., N. Engl. J. Medicine, 307: 1469-1475 (1982), và Ley, et al., Blood 62: 370-380 (1983)). Các thử nghiệm khác đã chứng minh rằng khỉ đầu chó được điều trị bằng liều arabinosylxytosin (ara-C) đủ gây độc tế bào, có đáp ứng bằng sự gia tăng nhanh tế bào hồng cầu lưới F (Papayannopoulou et al., Science. 224(4649):617-9 (1984)), và quá trình điều trị bằng hydroxyure sẽ kích thích quá trình sinh tổng hợp γ-globin ở khỉ đột hoặc khỉ đầu chó (Letvin et. al., N Engl J Med. 310(14):869-73 (1984)).

Nhóm hợp chất thứ hai được nghiên cứu về khả năng gây tái hoạt hóa HbF là các axit béo mạch ngắn. Quan sát đầu tiên trong tế bào tạo máu nhau thai đã dẫn đến phát hiện rằng axit γ-aminobutyric có thể hoạt động như một chất kích thích hemoglobin bào thai (Perrine et al., Biochem Biophys Res Commun.148(2):694-700 (1987)). Các nghiên cứu tiếp theo đã chỉ ra rằng quá trình sinh tổng hợp globin có thể được kích thích bằng butyrat ở khỉ đầu chó trưởng thành (Constantoulakis et al., Blood. Dec; 72(6):1961-7 (1988)), và hoạt chất này cũng kích thích γ-globin trong tế

bào tạo hồng cầu ở động vật hoặc bệnh nhân trưởng thành bị thiếu máu hồng cầu liềm (Perrine et al., Blood. 74(1):454-9 (1989)). Dẫn xuất của axit béo mạch ngắn như phenylbutyrat (Dover et al., Br J Haematol. 88(3):555-61 (1994)) và axit valproic (Liakopoulou et al., 1: Blood. 186(8):3227-35 (1995)) cũng đã được chứng minh là kích thích HbF *in vivo*. Do trong họ hợp chất này có số lượng lớn các đồng phân axit béo mạch ngắn hoặc dẫn xuất nên trong họ còn có nhiều hợp chất tiềm năng có hoạt lực mạnh hơn butyrat. Phenylaxetic và axit phenylalkyl (Torkelson et al., Blood Cells Mol Dis. 22(2):150-8. (1996)), được phát hiện trong quá trình nghiên cứu, được coi là các chất kích thích HbF tiềm năng vì chúng thuốc nằm trong nhóm hợp chất này. Tuy nhiên, hiện nay việc sử dụng butyrat hoặc đồng phân của nó trong thiếu máu hồng cầu liềm và thiếu máu β vẫn còn đang được thử nghiệm và chưa thể đề xuất cho quá trình điều trị bên ngoài thử nghiệm lâm sàng.

Thử nghiệm lâm sàng có mục tiêu tái hoạt hóa quá trình sinh tổng hợp hemoglobin bào thai ở bệnh thiếu máu hồng cầu liềm và thiếu máu β bao gồm việc sử dụng ngắn hạn và dài hạn các hợp chất như 5-azaxytidin, hydroxyure, erythropoietin người tái tổ hợp và các đồng phân axit butyric, cũng như hỗn hợp của các chất này. Sau các nghiên cứu này, hydroxyure đã được sử dụng để kích thích quá trình sinh tổng hợp HbF ở người và sau đó trở thành dược chất đầu tiên và duy nhất được phê duyệt bởi Cục quản lý dược và thực phẩm Hoa Kỳ để điều trị bệnh hemoglobin. Tuy nhiên, có nhiều nhược điểm khác nhau đã chống chỉ định việc sử dụng lâu dài các chất và liệu pháp như vậy, bao gồm các tác dụng phụ không mong muốn và sự khác nhau trong đáp ứng của bệnh nhân. Chẳng hạn, mặc dù hydroxyure kích thích quá trình sinh tổng hợp HbF và đã được chỉ ra là giảm tình trạng bệnh trên lâm sàng nhưng lại bị hạn chế bởi tác dụng phụ gây hoại tử xương và nguy cơ gây ung thư. Khả năng gây ung thư lâu dài tiềm tàng cũng có khi điều trị bằng 5-azaxytidin. Các phương pháp điều trị dựa trên erythropoietin không có sự ổn định giữa các nhóm bệnh nhân. Thời gian bán hủy ngắn của axit butyric *in vivo* được coi là một trở ngại lớn trong việc sử dụng thuốc này trong các điều trị can thiệp. Hơn nữa, liều axit butyric rất cao là cần thiết để kích thích quá trình biểu hiện gen γ-globin, cần gây mê để truyền thuốc liên tục. Hơn nữa, liều axit butyric cao như vậy có thể đi kèm với tác dụng gây độc thần kinh và gây tổn thương đa phủ tạng (Blau, et al., Blood 81: 529-537 (1993)). Trong khi chỉ cần sự gia

tăng tối thiểu nồng độ HbF cũng là có tác dụng đối với bệnh hồng cầu liềm thì đối với bệnh thiếu máu β cần sự gia tăng cao hơn nhiều, nhưng sự gia tăng này không thể đạt được một cách tin cậy và an toàn bằng bất kỳ một thuốc nào hiện đang được sử dụng (Olivieri, Seminars in Hematology 33: 24-42 (1996)).

Bằng cách xác định các yếu tố điều hòa tự nhiên của quá trình kích thích và sinh tổng hợp HbF, có thể tạo ra phương pháp điều trị can thiệp khắc phục các nhược điểm khác nhau của các hợp chất nêu trên. Các nghiên cứu trên diện rộng về sự liên kết hệ gen mới đây đã đem lại hiểu biết về cơ sở di truyền của rất nhiều bệnh và tính trạng phức tạp (McCarthy et al., Nat Rev Genet 9, 356 (2008) và Manolio et. al. J Clin Invest 118, 1590 (2008)). Tuy nhiên, trong rất nhiều trường hợp, mối liên kết chức năng giữa sự liên kết trong hệ gen di truyền và sinh lý bệnh tiềm ẩn vẫn chưa được làm sáng tỏ. Nồng độ hemoglobin bào thai (HbF) được di truyền như một tính trạng số lượng và rất quan trọng về mặt lâm sàng, dựa vào vai trò đã biết rõ của nó trong việc cải thiện mức độ nặng của bệnh β-hemoglobin cơ bản, bệnh hồng cầu liềm và bệnh thiếu máu β (Nathan et. al., Nathan và Oski's hematology of infancy và childhood ed. 6th, pp. 2 v. (xiv, 1864, xli p.) 2003)). Hai nghiên cứu về liên kết trong hệ gen đã xác định ba locut chính chứa tập hợp gồm 5 đa hình nucleotit đơn (single nucleotit polymorphism - SNP) chiếm khoảng 20% biến dị nồng độ HbF (Lettre et al., Proc Natl Acad Sci U S A (2008); Uda et al., Proc Natl Acad Sci U S A 105, 1620 (2008); Menzel et al., Nat Genet 39, 1197 (2007)). Hơn nữa, một vài biến thể có vẻ như là yếu tố tiên lượng cho mức độ nặng lâm sàng của bệnh hồng cầu liềm (Lettre et al., Proc Natl Acad Sci U S A (2008)) và ít nhất một trong các SNP nói trên có thể ảnh hưởng đến kết quả lâm sàng của thiếu máu β (Uda et al., Proc Natl Acad Sci U S A 105, 1620 (2008)). SNP có mức độ ảnh hưởng lớn nhất, chiếm trên 10% biến dị trong nồng độ HbF, nằm trong intron thứ hai của gen trên nhiễm sắc thể số 2, BCL11A. Trong khi đó BCL11A, một yếu tố phiên mã có cấu trúc "zinc finger" (tức là cấu trúc hình ngón tay kết hợp một hoặc nhiều ion kẽm) loại C2H2, đã được nghiên cứu về vai trò của nó trong quá trình phát triển tế bào lympho (Liu et al., Nat Immunol 4, 525 (2003) và Liu et al., Mol Cancer 5, 18 (2006)), nhưng vai trò của nó trong quá trình tổng hợp tế bào hồng cầu hoặc điều hòa gen globin chưa được đánh giá.

Trong thời đại bùng nổ của kỹ thuật ADN tái tổ hợp, các nghiên cứu về cấu trúc gen globin đã cung cấp một cơ sở phân tử mạnh để nghiên cứu quá trình chuyển đổi globin bào thai. Các nỗ lực đáng kể tập trung vào việc mô tả các yếu tố cis trong locut β-globin cần thiết cho quá trình điều hoà chính xác các gen trong nhóm gen globin giống β. Các nghiên cứu này dựa trên các đột biến tự nhiên và đột biến mất đoạn ảnh hưởng rất mạnh đến nồng độ HbF ở người lớn, và các nghiên cứu này đã được hỗ trợ bằng việc tạo ra chuột chuyển gen mang một phần của nhóm gen này (Nathan et. al., Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood ed. 6th, pp. 2 v. (xiv, 1864, xli p.) 2003) and G. Stamatoyannopoulos, Exp Hematol 33, 259 (2005)). Mặc dù các yếu tố cis chính xác cần thiết cho quá trình chuyển đổi globin vẫn còn chưa được biết rõ, nhưng phát hiện trong chuột chuyển gen đã chỉ ra rằng các gen γ-globin bị bất hoạt tự động trong giai đoạn trưởng thành, phát hiện này phù hợp nhất khi vắng mặt các yếu tố hoạt hóa đặc hiệu với giai đoạn thai nghén hoặc sự có mặt của yếu tố ức chế đặc hiệu với từng giai đoạn. Kết quả của các nghiên cứu di truyền mới đây đã đưa ra các gen có khả năng kiểm soát các gen γ-globin, như BCL11A.

Tác giả sáng chế đã xác định được chất ức chế đặc hiệu giai đoạn của gen γ-globin mới, là BCL11A, trong đó quá trình biểu hiện protein BCL11A hoạt động như một yếu tố điều hòa âm quá trình biểu hiện gen γ-globin.

Phương pháp tăng hemoglobin bào thai trong tế bào

Sáng chế đề cập đến các phương pháp được cải thiện để làm tăng sự tạo ra hemoglobin bào thai trong tế bào, bằng cách sử dụng các chế phẩm chứa các chất ức chế BCL11A. Dữ liệu chứng tỏ rằng quá trình ức chế BCL11A dẫn đến sự biểu hiện được làm tăng lên từ các gen γ-globin, và đề cập đến các hoạt chất trong chế phẩm để đạt được quá trình ức chế nói trên.

Như được mô tả ở đây, sáng chế đề cập đến phương pháp làmtăng các mức hemoglobin bào thai trong tế bào.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng nồng độ hemoglobin bào thai được biểu hiện trong tế bào, bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với một lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A, nhờ đó

quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai được tăng lên trong tế bào, hoặc thế hệ sau của tế bào đó, so với tế bào trước khi tiếp xúc.

Cùng với việc cho tế bào tiếp xúc với chất ức chế BCL11A, "tăng các mức hemoglobin bào thai" trong tế bào còn có nghĩa là nồng độ hemoglobin bào thai trong các quần thể được xử lý bằng chất ức chế BCL11A cao hơn ít nhất là 5% so với nồng độ hemoglobin bào thai trong tế bào đối chứng không có chất ức chế BCL11A. Được ưu tiên là tỷ lệ phần trăm quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai trong tế bào được xử lý chất ức chế BCL11A cao hơn ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 1 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần, ít nhất 1000 lần, hoặc cao hơn nữa so với tế bào được xử lý bằng chất đối chứng có kích thước và điều kiện nuôi cấy tương đương. Thuật ngữ "quần thể được xử lý bằng chất đối chứng" được sử dụng ở đây để chỉ quần thể tế bào được xử lý trong môi trường tương tự, mức độ kích thích virut, trình tự axit nucleic, nhiệt độ, có mức độ hợp dòng, kích thước bình nón, pH, v.v, tương tự như khi xử lý chất thử nghiệm, trừ việc bổ sung chất ức chế BCL11A.

"Chất ức chế" BCL11A, như được sử dụng ở đây, có thể hoạt động theo kiểu cạnh tranh hoặc không cạnh tranh, và theo một phương án, có thể hoạt động bằng cách tương tác với sự biểu hiện của protein BCL11A. Có thể thực hiện một phương pháp bất kỳ trong rất nhiều phương pháp khác nhau để ức chế quá trình biểu hiện hoặc hoạt tính của BCL11A. Chất ức chế BCL11A là chất có nguồn gốc hóa học hoặc sinh học mà sau khi xử lý tế bào bằng chất này, sẽ gây ra ức chế hoạt tính sinh học được gây ra bởi quá trình hoạt hóa BCL11A khi đáp ứng với các tín hiệu tế bào. Các chất ức chế BCL11A, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử nhỏ, các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể liên với với kháng nguyên, các kháng thể nội bào, aptame, các cấu trúc đối nghĩa, các tác nhân gây nhiễu ARN, và ribozym.

Kháng thể là chất ức chế BCL11A

Kháng thể liên kết đặc hiệu với BCL11A có thể được sử dụng để ức chế protein này *in vivo*. Kháng thể gắn với BCL11A được bán sẵn trên thị trường và có thể được tạo ra bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng các phương pháp đã biết. Hoạt tính ức chế BCL11A của một kháng thể nhất định, hoặc, của chất

ức chế BCL11A bất kỳ có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được mô tả ở đây – để khẳng định là, kháng thể ức chế BCL11A sẽ làm tăng quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai. Kháng thể ức chế BCL11A có thể là kháng thể đa dòng và đơn dòng và dẫn xuất hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó. Mảnh liên kết với kháng nguyên đã biết bao gồm, chẳng hạn, kháng thể có một vùng chức năng (dAb; bao gồm chủ yếu là một vùng chức năng VL hoặc VH), mảnh Fv, gồm có mảnh Fv một chuỗi (scFv), mảnh Fab, và mảnh F(ab')2. Phương pháp để thiết kế các phân tử kháng thể nói trên đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chất ức chế axit nucleic của quá trình biểu hiện BCL11A

Một phương pháp có hiệu quả để ức chế quá trình biểu hiện của các polypeptit đích đã được chọn là thông qua sự sử dụng các tác nhân gây nhiễu ARN. Sự gây nhiễu ARN (ARNi - RNA interference) sử dụng các cặp đôi ARN gây nhiễu nhỏ (siARN) mà hướng đích ARN thông tin mã hoá polypeptit đích để gây thoái hóa chọn lọc. Việc bất hoạt sau phiên mã phụ thuộc siARN đối với quá trình biểu hiện của gen gồm có cắt phân tử ARN thông tin đích tại vị trí được định hướng bởi siARN. "Sự gây nhiễu ARN (ARNi)" là một quá trình được bảo toàn về mặt tiến hóa, nhờ đó quá trình biểu hiện ARN của một trình tự giống hoặc có độ tương đồng cao với một gen đích sẽ gây ra quá trình thoái hóa hoặc bất hoạt gen sau phiên mã đặc hiệu trình tự (PTGS) của ARN thông tin (ARNm) được phiên mã từ gen đích đó (tham khảo Coburn, G. và Cullen, B. (2002) J. of Virology 76(18):9225), do đó sẽ ức chế quá trình biểu hiện của gen đích. Theo một phương án, ARN là ARN sợi kép (dsARN). Quá trình này đã được mô tả ở tế bào thực vật, động vật không xương sống và động vật có vú. Trong tự nhiên, ARNi được tạo ra nhờ enzym Dicer cắt endonucleaza đặc hiệu với dsARN, enzym này sẽ kích thích quá trình cắt liên tục các dsARN dài thành các đoạn sợi kép được gọi là siARN. Các siARN được kết hợp vào trong một phức hệ protein (được gọi là "phức hệ bất hoạt do ARN" hoặc "RISC") sẽ nhận diện và cắt các mARN đích. ARNi cũng có thể được tạo ra bằng cách đưa các phân tử axit nucleic, chẳng hạn, các siARN hoặc các tác nhân gây nhiễu ARN tổng hợp, để ức chế hoặc bất hoạt quá trình biểu hiện của gen đích. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ức chế quá trình biểu hiện của gen đích" dùng để chỉ sự giảm mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính protein hoặc nồng độ của gen

đích hoặc protein được mã hoá bởi gen đích so với khi không có quá trình gây nhiễu ARN. Mức độ giảm sẽ ít nhất là 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 99% hoặc cao hơn nữa so với mức độ biểu hiện của gen đích hoặc hoạt tính hay nồng độ của protein được mã hoá bởi gen đích không bị tác động bởi tác nhân gây nhiễu ARN.

Các thuật ngữ "tác nhân gây nhiễu ARN" và "sự gây nhiễu ARN" như được sử dụng ở đây dùng để chỉ các dạng ARN mạch kép gây bất hoạt gen, bất kể tác nhân gây nhiễu ARN có thể là siARN, miARN, shARN hoặc phân tử ARN sợi kép khác. "ARN gây nhiễu ngắn" (siRNA), còn được gọi ở đây là "ARN gây nhiễu nhỏ" là tác nhân ARN hoạt động để ức chế quá trình biểu hiện của gen đích, chẳng hạn, bằng ARNi. siARN có thể được tổng hợp hóa học, có thể được tổng hợp bằng phương pháp phiên mã *in vitro*, hoặc có thể được tạo ra trong tế bào chủ. Theo một phương án, siARN là phân tử ARN sợi kép (dsARN) có chiều dài khoảng 15 đến khoảng 40 nucleotit, tốt hơn là khoảng 15 đến khoảng 28 nucleotit, tốt hơn nữa là khoảng 19 đến khoảng 25 nucleotit, và tốt hơn nữa là khoảng 19, 20, 21, 22, hoặc 23 nucleotit, và có thể chứa phần nhô ra ở đầu 3' và/hoặc 5' trên mỗi sợi có chiều dài khoảng 0, 1, 2, 3, 4, hoặc 5 nucleotit. Chiều dài của phần nhô ra là độc lập giữa hai sợi, nghĩa là, chiều dài của phần nhô ra trên sợi này không phụ thuộc vào chiều dài của phần nhô ra trên sợi kia. Tốt hơn nếu siARN có khả năng thúc đẩy quá trình gây nhiễu ARN qua quá trình thoái hóa hoặc bất hoạt gen sau phiên mã đặc hiệu (PTGS) ARN thông tin (mARN).

Các siARN cũng bao gồm các ARN có cấu trúc kẹp tóc nhỏ (shRNA) (còn được gọi là ARN có cấu trúc vòng có cuống hay thùy). Theo một phương án, các siARN này được tạo bởi sợi đối nghĩa ngắn (chẳng hạn, từ 19 đến khoảng 25 nucleotit), sau đó là một vòng nucleotit có chiều dài khoảng 5 đến khoảng 9 nucleotit, và sợi có nghĩa tương đồng. Theo một cách khác, sợi có nghĩa có thể ở trước cấu trúc vòng nucleotit và sợi đối nghĩa có thể ở sau. Các shARN này có thể có trong plasmit, retrovirut, và lentivirut và được biểu hiện nhờ, chẳng hạn, đoạn khởi đầu pol III U6, hoặc một đoạn khởi đầu khác (tham khảo, chẳng hạn, Stewart, et al. (2003) RNA Apr; 9(4):493-501). Gen đích hoặc trình tự đích của tác nhân gây nhiễu ARN có thể là một gen trong tế bào hoặc trình tự hệ gen, chẳng hạn trình tự BCL11A. siARN có thể gần như tương đồng với gen đích hoặc trình tự hệ gen, hoặc một đoạn của nó. Như được sử

dụng trong ngữ cảnh này, thuật ngữ "tương đồng" được định nghĩa là gần như giống, bổ trợ vừa đủ, hoặc tương tự với ARN thông tin đích, hoặc một đoạn của nó, để gây ra quá trình gây nhiễu bằng ARN hiệu quả lên đích. Ngoài các phân tử ARN tự nhiên, ARN thích hợp để ức chế hoặc gây nhiễu quá trình biểu hiện trình tự đích gồm có các dẫn xuất hoặc đồng phân của ARN. Tốt hơn là, ARN gây nhiễu nhỏ là giống với trình tự đích. Tốt hơn là, ARN gây nhiễu nhỏ chỉ tác động đến một trình tự đích. Mỗi loại trong số các ARN gây nhiễu, như ARN gây nhiễu nhỏ, có thể được sàng lọc dựa trên tác động không có đích đặc hiệu tiềm năng bằng cách, chẳng hạn, xác định đặc điểm của quá trình biểu hiện. Các phương pháp như vậy đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả, chẳng hạn, trong tài liệu "Jackson et al. Nature Biotechnology 6:635-637, 2003". Ngoài phương pháp xác định đặc điểm quá trình biểu hiện, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng có thể sàng lọc các trình tự đích tiềm năng để tìm ra các trình tự tương đồng trong cơ sở dữ liệu trình tự để xác định các trình tự tiềm năng có tác dụng không đặc hiệu. Chẳng hạn, theo Jackson và các đồng tác giả (Id.), độ tương đồng ở mức 15 nucletotit, hoặc có thể là 11 nucletotit liên tiếp là đủ để gây bất hoạt các phân tử phiên mã không phải đích. Do đó, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đầu tiên có thể sàng lọc các ARN gây nhiễu nhỏ được đề xuất để tránh quá trình bất hoạt không đích đặc hiệu có thể có sử dụng phân tích trình tự sử dụng phương pháp so sánh trình tự đã biết bất kỳ, như BLAST. Trình tự ARN gây nhiễu nhỏ được chọn để tối đa hóa quá trình hấp thu sợi đối nghĩa (sợi hướng dẫn) của ARN gây nhiễu nhỏ vào RISC và nhờ đó tối đa hóa khả năng của RISC hướng đích ARN thông tin GGT của người để gây thoái hóa. Điều này có thể hực hiện được bằng cách tìm các trình tự có năng lượng tự do của quá trình liên kết với đầu 5' của sợi đối nghĩa thấp nhất. Năng lượng tự do thấp hơn sẽ làm tăng khả năng trải ra của đầu 5' của sợi đối nghĩa của ARN gây nhiễu nhỏ, nhờ đó đảm bảo rằng sợi đối nghĩa sẽ được hấp thu bởi RISC và điều khiển quá trình cắt đặc hiệu trình tự ARN thông tin của BCL11A của người. Phân tử ARN gây nhiễu nhỏ không chỉ là những phân tử chỉ chứa ARN, mà còn là, chẳng hạn, các nucleotit và không nucleotit được biến đổi hóa học, và còn cả các phân tử trong đó gốc đường được thay thế bằng một gốc đường khác hoặc một gốc có chức năng tương tự. Hơn nữa, liên kết không tự nhiên giữa các gốc nucleotit có thể được sử dụng, như liên kết

phosphothioat. Sợi ARN có thể được tạo dẫn xuất với một nhóm chức năng hoạt động của một nhóm chỉ thị, như flophore. Các dẫn xuất đặc biệt hữu ích được biến đổi ở một đầu hoặc hai đầu của sợi ARN, thường là đầu 3' của sợi có nghĩa. Chẳng hạn, 2'-hydroxyl ở đầu 3' có thể được tạo dẫn xuất chọn lọc với nhiều nhóm. Các dẫn xuất ARN hữu dụng khác kết hợp nucleotit có gốc carbohydrat được biến đổi, như dẫn xuất 2'O-alkyl hóa hoặc 2'-O-metyl ribosyl và dẫn xuất 2'-O-flo ribosyl. Các bazơ ARN cũng có thể được biến đổi. Có thể sử dụng một bazơ được biến đổi bất kỳ nào mà hữu hiệu để ức chế hoặc gây nhiễu quá trình biểu hiện trình tự đích. Chẳng hạn, bazơ được halogen hóa, như 5-bromuraxil và 5-ioturaxil cũng có thể được đưa vào. Các bazơ này cũng có thể được alkyl hóa, chẳng hạn, 7-metylguanosin được đưa vào vị trí của gốc guanosin. Các bazơ không có trong tự nhiên có thể ức chế thành công cũng có thể được kết hợp. Các biến đổi siARN được ưu tiên nhất là 2'-deoxy-2'-flouridin hoặc phức hệ nucleotit của axit nucleic bị khóa (LAN) và ARN chứa liên kết phosphodieste hoặc một số liên kết phosphorothioat. Các biến đổi này là đã biết với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực và được đề cập, chẳng hạn, trong tài liệu Braasch et al., Biochemistry, 42: 7967-7975, 2003. Hầu hết các biến đổi hữu ích đối với siARN có thể được thực hiện sử dụng các phương pháp hóa học đã biết trong kỹ thuật oligonucleotit đối nghĩa. Tốt hơn là, biến đổi nói trên bao gồm có biến đổi gốc 2'-O-metyl tối thiểu, tốt hơn là không bao gồm biến đổi nói trên. Tốt hơn là, phương pháp biến đổi không bao gồm việc biến đổi các nhóm 5'-hydroxyl tự do của siARN. Phần ví dụ thực hiện sáng chế sẽ cung cấp các ví dụ cụ thể củacác tác nhân gây nhiễu ARN, như các phân tử shARN mà hướng đích hiệu quả đến mARN của BCL11A.

Theo một phương án được ưu tiên, tác nhân gây nhiễu ARN được đưa vào hoặc cung cấp trong chất mang dược dụng. Các chất mang bổ trợ, như liposom, có thể được bổ sung vào chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, tác nhân gây nhiễu ARN được đưa vào tế bào trong cơ quan của cá thể nhờ vectơ mã hoá ARN có cấu trúc kẹp tóc nhỏ (shARN) trong chất mang dược dụng. shARN được chuyển hóa bởi các tế bào sau khi phiên mã thành siARN có khả năng hướng đích, chẳng hạn, BCL11A.

Theo một phương án, vectơ là vectơ có thể điều hoà được, như vectơ có thể kích thích được bằng tetraxyclin. Các phương pháp đã được mô tả, chẳng hạn, trong các tài liệu Wang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 5103-5106, sử dụng vectơ pTet-On

(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Theo một phương án, các tác nhân gây nhiễu ARN được sử dụng trong các phương pháp được mô tả ở đây được hấp thu chủ động bởi tế bào *in vivo* sau khi dùng qua đường tĩnh mạch, chẳng hạn, tiêm thủy động lực, không sử dụng vectơ cũng cho thấy việc đưa các tác nhân gây nhiễu ARN vào tế bào *in vivo* hiệu quả. Một phương pháp đưa các siARN là đưa vào mạch máu cung cấp máu cho cơ quan đích. Các kỹ thuật khác để đưa các siARN vào tế bào, chẳng hạn, siARN hoặc shARN sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, cũng có thể được sử dụng, như, chẳng hạn, đưa bằng vectơ, chẳng hạn, plasmit hoặc vectơ virut, chẳng hạn, vectơ lentivirut. Các vectơ này có thể được sử dụng như mô tả, chẳng hạn, trong tài liệu Xiao-Feng Qin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 183-188. Các phương pháp đưa yếu tố gây nhiễu ARN vào tế bào khác, chẳng hạn, siARN hoặc shARN theo sáng chế là sử dụng peptit bazơ bằng cách liên hợp hoặc trộn các tác nhân gây nhiễu ARN với peptit bazơ, chẳng hạn, một đoạn của TAT peptit, trộn với các lipit cation hoặc tạo thành tiểu phần. Các tác nhân gây nhiễu ARN, chẳng hạn, ARN gây nhiễu nhỏ kiểm soát ARN thông tin của BCL11A, có thể được đưa vào riêng biệt, hoặc cùng với các ARN gây nhiễu khác, chẳng hạn, ARN gây nhiễu nhỏ, như, chẳng hạn ARN gây nhiễu nhỏ hướng vào các gen khác. Các siARN của BCL11A cũng có thể được kết hợp với các dược chất khác được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn đi kèm với thiếu oxy, đặc biệt là các bệnh đường hô hấp, và đặc biệt nữa là bệnh hen. Các phân tử siARN tổng hợp, gồm có các phân tử shARN, có thể thu được bằng cách sử dụng một số kỹ thuật đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, các phân tử siARN có thể được tổng hợp hóa học hoặc tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như sử dụng ribonucleosit phosphoramidit được bảo vệ thích hợp và máy tổng hợp ADN/ARN thông thường (tham khảo, chẳng hạn, Elbashir, S.M. et al. (2001) Nature 411:494-498; Elbashir, S.M., W. Lendeckel và T. Tuschl (2001) Genes & Development 15:188-200; Harborth, J. et al . (2001) J. Cell Science 114:4557-4565; Masters, J.R. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98:8012-8017; và Tuschl, T. et al . (1999) Genes & Development 13:3191-3197). Theo cách khác, một số nhà cung cấp bộ kit tổng hợp ARN được bán trên thị trường gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, Proligo (Hamburg, Germany), Dharmacon Research (Lafayette, CO, USA), Pierce

Chemical (một phần của Perbio Science, Rockford, IL, USA), Glen Research (Sterling, VA, USA), ChemGenes (Ashland, MA, USA), và Cruachem (Glasgow, UK). Như vậy, không quá khó để có thể tổng hợp ARN gây nhiễu có chất lượng phù hợp. Ngoài ra, ARN sợi kép có thể được biểu hiện ở dạng các cấu trúc có đầu vòng được mã hoá bởi vectơ plasmit, retrovirut và lentivirut (Paddison, P.J. et al. (2002) Genes Dev. 16:948-958; McManus, M.T. et al. (2002) ARN 8:842-850; Paul, C.P. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:505-508; Miyagishi, M. et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:497-500; Sui, G. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:5515-5520; Brummelkamp, T. et al. (2002) Cancer Cell 2:243; Lee, N.S., et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:500-505; Yu, J.Y., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 99:6047-6052; Zeng, Y., et al. (2002) Mol. Cell 9:1327-1333; Rubinson, D.A., et al. (2003) Nat. Genet. 33:401-406; Stewart, S.A., et al. (2003) ARN 9:493-501). Các vectơ này thường có đoạn khởi đầu polIII ở vị trí ngược dòng của ARN sợi kép và có thể biểu hiện các đoạn ARN có nghĩa và đối nghĩa một cách riêng biệt và/hoặc ở dạng cấu trúc kẹp tóc. Trong tế bào, Dicer sẽ xử lý ARN kẹp tóc ngắn (shARN) thành các siARN hiệu quả. Vùng đích của siARN theo sáng chế có thể được chọn từ một số trình tự gen đích, chẳng hạn, trình tự mã hoá BCL11A, bắt đầu từ khoảng 25 đến 50 nucleotit, từ khoảng 50 đến 75 nucleotit, hoặc từ khoảng 75 đến 100 nucleotit xuôi dòng tính từ mã bộ ba khởi đầu. Trình tự nucleotit có thể chứa các vùng không dịch mã 5' hoặc 3' và các vùng gần mã bộ ba khởi đầu. Một phương pháp thiết kế phân tử siARN theo sáng chế là xác định cấu trúc lặp lại gồm 23 nucleotit AA(N19)TT (SEQ ID NO:21) (trong đó N có thể là một nucleotit bất kỳ) và chọn các đoạn có hàm lượng G/C ít nhất là 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% hoặc 75%. Hàm lượng "TT" của trình tự là tùy ý. Theo một cách khác, nếu không tìm được trình tự nào như trên, quá trình tìm kiếm có thể được mở rộng sử dụng cấu trúc lặp lại NA(N21), trong đó N có thể là một nucleotit bất kỳ. Trong trường hợp này, đầu 3' của siARN có nghĩa có thể được chuyển thành TT để cho phép tạo ra cấu trúc cặp đối xứng về thành phần trình tự của các phần nhô ra có nghĩa và đối nghĩa đầu 3'. siARN đối nghĩa có thể được tổng hợp như là sợi bổ sung của trình tự nucleotit tính từ vị trí 1 đến 21 của trình tự gồm 23 nucleotit. Việc sử dụng các phần nhô ra TT đối xứng ở đầu 3' có thể là ưu việt để đảm bảng rằng các tiểu phần ribonucleoprotein gây nhiễu nhỏ (siRNPs) được

tạo thành với tỷ lệ các siRNP cắt ARN đích có nghĩa và đối nghĩa là tương đối bằng nhau (Elbashir et al., (2001) *sách đã dẫn* và Elbashir et al., 2001 *sách đã dẫn*). Phân tích cơ sở dữ liệu trình tự, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở NCBI, BLAST, Derwent và GenSeq cũng như sản phẩm của các công ty tổng hợp oligonucletotit như OLIGOENGINE®, cũng có thể được sử dụng để chọn các trình tự siARN trong ngân hàng EST để đảm bảo rằng chỉ có một gen được làm đích.

Đưa các tác nhân gây nhiễu ARN vào tế bào

Các phương pháp đưa các tác nhân gây nhiễu ARN, chẳng hạn, siARN, hoặc các vectơ chứa tác nhân gây nhiễu ARN vào các tế bào đích, chẳng hạn, tế bào lympho hoặc các tế bào đích mong muốn khác để hấp thu gồm có phương pháp tiêm chế phẩm chứa tác nhân gây nhiễu ARN, chẳng hạn, siARN, hoặc cho tế bào, tế bào lympho chẳng hạn, tiếp xúc trực tiếp với chứa phẩm chứa tác nhân gây nhiễu ARN, chẳng hạn, siARN. Theo một phương án khác, tác nhân gây nhiễu ARN, chẳng hạn, siARN có thể được tiêm trực tiếp vào mạch máu, như tĩnh mạch, động mạch, tĩnh mạch nhỏ hoặc động mạch nhỏ, bằng cách, chẳng hạn, tiêm thủy động lực hoặc truyền. Chế độ sử dụng có thể là bằng một mũi tiêm hoặc nhiều mũi tiêm. Tác nhân gây nhiễu ARN được đưa vào trong chất mang dược dụng. Một hoặc nhiều tác nhân gây nhiễu ARN có thể được sử dụng đồng thời. Theo một phương án được ưu tiên, chỉ một siARN hướng đích BCL11A được sử dụng. Theo một phương án, các tế bào đặc hiệu được hướng đích bằng sự gây nhiễu ARN, để hạn chế tác dụng phụ có thể có của sự gây nhiễu ARN gây ra do sự nhắm đích không đặc hiệu của việc gây nhiễu ARN. Phương pháp này có thể sử dụng, chẳng hạn, một phức hệ hoặc phân tử dung hợp chứa gốc hướng đích tế bào và gốc liên kết gây nhiễu ARN để đưa một cách hiệu quả sự gây nhiễu ARN vào tế bào. Chẳng hạn, protein dung hợp kháng thể-protamin khi được trộn với siARN, sẽ liên kết với siARN và đưa một cách chọn lọc siARN vào các tế bào biểu hiện kháng nguyên có thể nhận diện được bởi kháng thể nói trên, tạo ra sự bất hoạt quá trình biểu hiện gen chỉ trong các tế bào biểu hiện kháng nguyên đó. Gốc liên kết với ARN gây nhiễu nhỏ hoặc phân tử kích thích ARN gây nhiễu là protein hoặc vùng hoặc đoạn liên kết với axit nucleic của protein, và gốc liên kết sẽ được dung hợp với một phần của gốc hướng đích. Vị trí của gốc hướng đích có thể là ở đầu carboxyl hoặc đầu amino của cấu trúc hoặc ở giữa protein dung hợp. Cơ chế đưa ARN gây nhiễu qua

trung gian virut cũng có thể được sử dụng để đưa ARN gây nhiễu nhỏ vào tế bào *in vitro* và *in vivo* như được mô tả trong tài liệu Xia, H. et al. (2002) Nat Biotechnol 20(10):1006). Các cơ chế đưa các shARN qua trung gian plasmit- hoặc virut cũng có thể được sử dụng để đưa shARN vào tế bào *in vitro* và *in vivo* như được mô tả trong tài liệu "Rubinson, D.A., et al. ((2003) Nat. Genet. 33:401-406)" và "Stewart, S.A., et al. ((2003) ARN 9:493-501)". Các tác nhân gây nhiễu ARN, ví dụ như, siARN hoặc shARN, có thể được đưa vào cùng với các thành phần mà thực hiện một hoặc nhiều hoạt tính sau đây: tăng cường mức độ hấp thu các tác nhân gây nhiễu ARN, chẳng hạn, siARN, bởi tế bào, chẳng hạn, tế bào lympho hoặc các tế bào khác, ức chế quá trình gắn của các sợi đơn, ổn định hóa sợi đơn, hay nói cách khác là tạo thuận lợi cho việc phân phối đến tế bào đích và làm tăng quá trình ức chế gen đích, chẳng hạn, BCL11A. Liều lượng của tác nhân gây nhiễu ARN cụ thể sẽ là lượng cần thiết để gây nhiễu ARN hiệu quả, chẳng hạn, bất hoạt gen sau dịch mã (PTGS), của gen đích cụ thể, nhờ đó sẽ ức chế quá trình biểu hiện của gen đích hoặc ức chế hoạt tính hoặc nồng độ protein được mã hoá bởi gen đích.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu sẽ được cho tiếp xúc *ex vivo* hoặc *in vitro*. Theo một phương án cụ thể, tế bào được cho tiếp xúc là tế bào thuốc dòng tế bào tạo hồng cầu. Theo một phương án, chế phẩm được cho tiếp xúc sẽ ức chế quá trình biểu hiện BCL11A.

"Nguyên bào tạo máu" như một thuật ngữ được sử dụng ở đây, dùng để chỉ tế bào thuộc dòng tế bào gốc tạo ra các loại tế bào máu gồm có dòng tế bào tủy xương (tế bào đơn nhân và đại thực bào, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu ưa axit, tế bào hồng cầu, tế bào nhân khổng lồ/tiểu cầu, tế bào tua), và dòng tế bào lympho (tế bào T, tế bào B, tế bào NK). "Tế bào thuộc dòng tế bào hồng cầu" có nghĩa là tế bào được cho tiếp xúc là tế bào trải qua quá trình tạo hồng cầu sao cho sau lần biệt hóa cuối cùng nó sẽ tạo thành tế bào hồng cầu hoặc tế bào máu đỏ (RBC). Các tế bào này thuộc về một trong 3 dòng tế bào là dòng tế bào hồng cầu, dòng tế bào lympho, và dòng tế bào tủy xương, có nguồn gốc từ nguyên bào tạo máu ở tủy xương. Sau khi bộc lộ với các yếu tố sinh trưởng đặc hiệu và các thành phần khác của tiểu môi trường tạo máu, nguyên bào tạo máu có thể trưởng thành qua một loạt loại tế bào biệt hóa trung gian, tất cả các dạng tế bào trung gian của dòng tế bào hồng cầu, để thành RBC. Do

đó, tế bào thuộc "dòng tế bào hồng cầu", như thuật ngữ được sử dụng ở đây, bao gồm nguyên bào tạo máu, tiền nguyên hồng cầu, nguyên hồng cầu ưa bazơ, nguyên bào hồng cầu, nguyên hồng cầu giai đoạn cuối, tế bào hồng cầu lưới, và tế bào hồng cầu.

Theo một số phương án, nguyên bào tạo máu có ít nhất một trong số các chỉ thị bề mặt tế bào đặc trưng của nguyên bào tạo máu: CD34+, CD59+, Thy1/CD90+,$CD38^{lo}$/-, và C-kit/CD117+. Tốt hơn là, nguyên bào tạo máu có một số chỉ thị nêu trên.

Theo một số phương án, nguyên bào tạo máu của dòng tế bào hồng cầu có chỉ thị bề mặt tế bào đặc trưng của dòng tế bào hồng cầu là: CD71 và Ter119.

Các tế bào gốc, như nguyên bào tạo máu, có khả năng tăng sinh và phát sinh ra nhiều loại nguyên bào khác có khả năng tạo ra rất nhiều tế bào mẹ, lại có thể tạo ra các tế bào con được biệt hóa, hoặc có khả năng biệt hóa. Bản thân các tế bào con có thể được kích thích để tăng sinh và tạo ra các tế bào thế hệ sau sẽ biệt hóa thành một hoặc nhiều loại tế bào trưởng thành, trong khi vẫn giữ một hoặc nhiều té bào có khả năng phát triển thành tế bào mẹ. Thuật ngữ "tế bào gốc" dùng để chỉ tế bào có khả năng hoặc có tiềm năng, ở một số điều kiện nhất định, có thể biệt hóa thành các tế bào được biệt hóa, và vẫn giữ được khả năng, ở một số điều kiện nhất định, có thể tăng sinh mà không biệt hóa. Theo một phương án, thuật ngữ "tế bào tổ tiên" hoặc "tế bào gốc" dùng để chỉ tế bào mẹ nói chung có tế bào con (tế bào thế hệ sau) biệt hóa theo các hướng khác nhau, chẳng hạn, bằng cách đạt được các đặc điểm riêng biệt hoàn chỉnh, như diễn ra trong quá trình biệt hóa diễn tiến của tế bào phôi và mô phôi. Quá trình biệt hóa tế bào là một quá trình phức tạp thường diễn ra qua nhiều lần phân chia tế bào. Tế bào được biệt hóa có thể bắt nguồn từ một tế bào đa tiềm năng mà bản thân nó cũng bắt nguồn từ một tế bào đa tiềm năng khác. Trong khi mỗi tế bào đa tiêm năng có thể được coi là tế bào gốc, thì các loại tế bào có thể biệt hóa thành từ tế bào gốc lại khác nhau đáng kể. Một số tế bào được biệt hóa cũng có khả năng phát sinh thành các tế bào có tiềm năng phát triển lớn hơn. Tiềm năng kiểu trên có thể là tự nhiên hoặc có thể được kích thích nhân tạo bằng cách xử lý bằng các yếu tố khác nhau. Trong nhiều trường hợp, tế bào gốc cũng có thể là "đa tiềm năng" vì chúng có thể sinh ra các tế bào thuộc nhiều loại tế bào khác nhau, nhưng điều này là không phải là yêu cầu đối với "tế bào gốc". Khả năng "tự tái sinh" là một phần cổ điển trong định nghĩa tế bào gốc, và là

cần thiết khi sử dụng trong ngữ cảnh này. Theo lý thuyết, sự tự tái sinh có thể xảy ra theo một hoặc hai cơ chế chính. Tế bào gốc có thể phân chia không đối xứng, trong đó một tế bào con vẫn giữ được trạng thái gốc và tế bào con còn lại biểu hiện một số chức năng và kiểu hình cụ thể khác. Nói theo cách khác, một số tế bào gốc có thể phân chia đối xứng thành hai tế bào gốc, do đó vẫn giữ được một số tế bào gốc trong nhóm tế bào như một thể thống nhất, trong khi các tế bào còn lại sẽ phát sinh thành các tế bào con biệt hóa. Thông thường, "tế bào tổ tiên" có hình thái tế bào nguyên thủy hơn (nghĩa là, ở giai đoạn sớm trong con đường phát triển hoặc tiến triển so với tế bào đã được biệt hóa hoàn toàn). Thông thường, "tế bào tổ tiên" cũng có khả năng tăng sinh đáng kể hoặc rất cao. Tế bào tổ tiên có thể phát sinh thành nhiều loại tế bào biệt hóa khác nhau hoặc chỉ một loại tế bào biệt hóa, phụ thuộc vào con đường phát triển và môi trường trong đó tế bào phát triển và biệt hóa.

Trong ngữ cảnh phát sinh tế bào, các cụm từ "được biệt hóa", hoặc "biệt hóa" là các thuật ngữ tương đương. "tế bào được biệt hóa" là tế bào đã tiến xa hơn nhiều trong con đường phát triển so với tế bào mà nó đang được so sánh với. Do đó, tế bào gốc có thể biệt hóa thành các tiền tế bào giới hạn trong một dòng tế bào (như nguyên bào tạo máu), đến lượt mình lại có thể biệt hóa thành các loại tiền tế bào khác, tiến xa hơn trên con đường phát triển (như tiền tế bào hồng cầu), và sau đó đến tế bào biệt hóa ở giai đoạn cuối, như tế bào hồng cầu, có vai trò đặc trưng trong một số loại mô, và có thể hoặc không duy trì được khả năng tăng sinh thêm nữa.

Theo một phương án, chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A được chọn từ phân tử nhỏ và axit nucleic. Theo phương án khác và tốt hơn là, chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A là tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A, hoặc vectơ mã hoá tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A. Theo một phương án cụ thể, tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:6.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân tử nhỏ" dùng để chỉ một hợp chất hóa học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, peptit, phân tử giả peptit, axit amin, các chất tương tự axit amin, polynucleotit, các chất tương tự polynucleotit, aptame, nucleotit, các chất tương tự nucleotit, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ (nghĩa là, bao gồm các hợp chất hữu cơ chứa nguyên tử khác loại và kim loại hữu cơ) có trọng lượng

phân tử ít hơn khoảng 10.000g trên một mol, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 5.000g trên một mol, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 1000g trên một mol, các hợp chất hữu cơ hoặc vô cơ có trọng lượng phân tử ít hơn khoảng 500g trên một mol, và muối, este, và các dạng dược dụng khác của hợp chất đó.

"Axit nucleic", như được mô tả ở đây, có thể là ARN hoặc ADN, và có thể là phân tử sợi đơn hoặc sợi kép, và có thể được chọn, chẳng hạn, từ một nhóm bao gồm: axit nucleic mã hoá protein quan tâm, oligonucleotit, đồng phân axit nucleic, chẳng hạn peptit- axit nucleic (PNA), PNA bổ sung giả (pc-PNA), axit nucleic khóa (LNA) v.v. Các trình tự axit nucleic này bao gồm, chẳng hạn, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự axit nucleic mã hoá protein, chẳng hạn các trình tự hoạt động như chất ức chế phiên mã, phân tử đối nghĩa, ribozym, trình tự axit nucleic ức chế nhỏ, chẳng hạn nhưng không chỉ giới hạn ở ARNi, shARNi, siARN, micro ARNi (mARN), oligonucleotit đối nghĩa, v.v.

Như được mô tả ở đây, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai ở động vật có vú.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai ở động vật có vú cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu ở động vật có vú tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A, nhờ đó mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai được gia tăng, so với mức độ biểu hiện trước khi cho tiếp xúc.

Khi cho tế bào động vật có vú tiếp xúc với chất ức chế BCL11A, "tăng nồng độ hemoglobin bào thai trong động vật có vú" nghĩa là hemoglobin bào thai ở động vật có vú tăng ít nhất 5% ở tế bào được xử lý bằng chất ức chế BCL11A so với tế bào đối chứng tương đương không được xử lý bằng chất ức chế BCL11A. Được ưu tiên là mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai trong tế bào được xử lý bằng chất ức chế BCL11A tăng ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 1 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần, ít nhất 1000 lần, hoặc cao hơn nữa so với tế bào được xử lý bằng chất đối chứng tương đương. Thuật ngữ "tế bào được xử lý bằng chất đối

chứng tương đương" như được sử dụng ở đây để chỉ tế bào được xử lý theo quy trình tương tự trừ việc thêm chất ức chế BCL11A.

Thuật ngữ "động vật có vú" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở người; linh trưởng như khỉ hình người, khỉ, đười ươi, và tinh tinh; các loài như chó và chó sói; các loài họ mèo như mèo, sư tử, và hổ; các loài họ ngựa như ngựa, lừa, và ngựa vằn; gia súc như bò, lợn, và cừu; các loài móng guốc như hươu và hươu cao cổ; các loài gặm nhấm như chuột nhắt, chuột cống, chuột lang; và gấu. Theo một số phương án được ưu tiên, động vật có vú là người.

Do đó, theo một phương án, động vật có vú được chẩn đoán bị bệnh hemoglobin. Theo một phương án khác, bệnh hemoglobin là bệnh β-hemoglobin. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh hemoglobin là bệnh hồng cầu liềm. Như được sử dụng ở đây, "bệnh hồng cầu liềm" có thể là thiếu máu hồng cầu liềm, bệnh hồng cầu liềm hemoglobin C (HbSC), bệnh hồng cầu liềm thiếu máu beta + (HbS/β+), hoặc bệnh hồng cầu liềm thiếu máu beta không (HbS/β0). Theo phương án được ưu tiên khác, bệnh hemoglobin là bệnh thiếu máu β.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bệnh hemoglobin" dùng để chỉ một khiếm khuyết bất kỳ trong cấu trúc hoặc chức năng của hemoglobin ở một cá thể, và bao gồm khiếm khuyết trong cấu trúc bậc 1, bậc 2, bậc 3, bậc 4 của hemoglobin do một đột biến bất kỳ, như đột biến loại bỏ hoặc thay thế trong vùng mã hoá của gen β-globin, hoặc đột biến, hoặc mất đoạn trong đoạn khởi đầu hoặc yếu tố tăng cường của gen đó làm giảm lượng hemoglobin được tổng hợp so với điều kiện bình thường hoặc tiêu chuẩn. Thuật ngữ này còn bao gồm bất kỳ sự giảm lượng hoặc giảm hiệu quả của hemoglobin, dù là bình thường hay bất thường, do các yếu tố bên ngoài như bệnh, hóa trị liệu, độc tố, thuốc độc, hoặc các yếu tố tương tự.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả", như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ lượng an toàn và đủ để điều trị, làm giảm, hoặc làm chậm quá trình phát triển bệnh hemoglobin. Do đó, lượng hữu hiệu là lượng có thể điều trị khỏi hoặc cải thiện triệu chứng của bệnh hemoglobin, làm chậm quá trình tiến triển của bệnh hemoglobin, làm chậm hoặc ức chế triệu chứng của bệnh hemoglobin, làm chậm hoặc ức chế sự xuất hiện của các triệu chứng thứ cấp của bệnh hemoglobin hoặc ức chế sự phát triển của triệu chứng

thứ cấp của bệnh hemoglobin. Lượng hữu hiệu để điều trị bệnh hemoglobin phụ thuộc vào loại bệnh hemoglobin cần được điều trị, mức độ nặng của triệu chứng, đối tượng được điều trị, tuổi và tình trạng chung của đối tượng, phương thức dùng thuốc và các yếu tố tương tự. Do đó, không thể thiếu thận trọng trong việc xác định chính xác "lượng có hiệu quả". Tuy nhiên, đối với một trưởng hợp cụ thể bất kỳ, "lượng có hiệu quả" phù hợp có thể được xác định bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sử dụng các xét nghiệm thông thường.

Phương pháp điều trị theo sáng chế sẽ cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng đi kèm với rối loạn bằng cách tăng lượng hemoglobin bào thai trong cơ thể bệnh nhân. Triệu chứng thường đi kèm với bệnh hemoglobin, bao gồm, chẳng hạn, thiếu máu, giảm hấp thu oxy ở mô, rối loạn chức năng cơ quan, giá trị hematocrit bất thường, sinh tổng hợp hồng cầu không hiệu quả, số lượng hồng cầu lưới (tế bào hồng cầu) bất thường, hàm lượng sắt bất thường, có nguyên bào sắt hình vòng, phì đại lách, phì đại gan, suy giảm máu ngoại vi, khó thở, tăng huyết tán, vàng da, cơ đau thiếu máu, hội chứng ngực cấp tính, đình lưu máu tại lách, cương đau dương vật, đột quỵ, hội chứng tay-chân, và đau như đau thắt ngực.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc *ex vivo* hoặc *in vitro*, và tế bào hoặc tế bào thế hệ sau của nó sẽ được sử dụng trên động vật có vú. Theo một phương án khác, nguyên bào tạo máu là tế bào thuộc dòng dòng tế bào hồng cầu.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc với chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng. Theo một phương án, chế phẩm nói trên được dùng qua đường tiêm, truyền, nhỏ giọt, hoặc theo đường tiêu hóa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược dụng" dùng cho chế phẩm, chất mang, chất pha loãng và chất phản ứng, dùng để chỉ nguyên liệu có thể dùng cho động vật có vú mà không gây ra các tác dụng sinh lý không mong muốn như buồn nôn, chóng mặt, chán ăn và các tác dụng không mong muốn tương tự. Mỗi chất mang cần phải "dược dụng" theo nghĩa là tương hợp với các thành phần khác trong chế phẩm. Chất mang dược dụng sẽ không thúc đẩy việc tạo ra đáp ứng miễn dịch với một hoạt

chất được trộn cùng với nó, trừ khi đó là điều mong muốn. Quy trình bào chế dược phẩm chứa hoạt chất được hòa tan hoặc phân tán đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và không cần phải dựa trên dạng bào chế. Dược phẩm chứa hợp chất theo sáng chế với một hoặc nhiều thành phần dược dụng. Chất mang có thể dạng chất pha loãng rắn, bán lỏng hoặc lỏng, kem hoặc viên nang. Thông thường, các chế phẩm này được bào chế để có thể tiêm được ở dạng dung dịch hoặc hỗn dịch lỏng, tuy nhiên, cũng có thể bào chế dạng chế phẩm rắn thích hợp để pha trước khi sử dụng tạo thành dung dịch, hoặc hoặc hỗn dịch. Chế phẩm cũng có thể được nhũ tương hóa hoặc được bào chế ở dạng chế phẩm liposom. Hoạt chất có thể được trộn với tá dược dược dụng và tương hợp với hoạt chất và ở hàm lượng thích hợp để sử dụng trong các phương pháp điều trị được mô tả ở đây. Các tá dược thích hợp là, chẳng hạn, nước, muối sinh lý, dextroza, glyxerol, etanol hoặc các tá dược tương tự và hỗn hợp của các tá dược đó. Ngoài ra, nếu muốn, chế phẩm có thể chứa những lượng nhỏ chất bổ trợ như chất làm ẩm hoặc chất nhũ hóa, chất đệm pH và các chất tương tự sẽ làm tăng hiệu quả của hoạt chất. Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa muối dược dụng của các thành phần trong đó. Muối dược dụng bao gồm muối cộng axit (được tạo bởi các nhóm amin tự do của polypeptit) được tạo thành với các axit vô cơ như, chẳng hạn, axit hydrochloric hoặc phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axetic, tartaric, mandelic và các axit tương tự. Muối được tạo bởi các nhóm carboxyl tự do có thể thu được từ các bazơ vô cơ như, chẳng hạn, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit, và các bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, 2-etylamin etanol, histidin, procain và các bazơ tương tự. Các chất mang dung nạp được về mặt sinh lý đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất mang lỏng là dung dịch lỏng vô trung không chứa thành phần nào khác ngoài hoạt chất và nước, hoặc chứa dung dịch đệm như natri phosphat ở độ pH sinh lý, dung dịch muối sinh lý hoặc cả hai, như muối sinh lý được đệm phosphat. Hơn nữa, chất mang lỏng có thể chứa nhiều hơn một muối đệm, cũng như các loại muối khác như natri và kali clorua, dextroza, polyetylen glycol và các loại chất tan khác. Chế phẩm lỏng cũng có thể chứa pha lỏng khác ngoài nước. Ví dụ về các pha lỏng bổ trợ là glyxerin, dầu thực vật như dầu hạt bông, và nhũ tương nước-dầu. Lượng hoạt chất được sử dụng theo sáng chế hiệu quả trong điều trị một số rối loạn hoặc tình trạng cụ thể phụ thuộc vào bản chất của rối loạn hoặc tình trạng đó, và có thể được xác định

bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Thuật ngữ "chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng" dùng để chỉ các thành phần, nguyên liệu hoặc chất dẫn thuốc dược dụng, như chất nhồi lỏng hoặc rắn, chất pha loãng, tá dược, dùng môi hoặc vật liệu tạo nang, có vai trò trong việc mang hoặc vận chuyển hoạt chất từ một cơ quan, hoặc một phần của cơ thể, đến một cơ quan khác, hoặc một phần khác của cơ thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được sử dụng cho" dùng để chỉ việc đưa chất ức chế BCL11A vào bệnh nhân bằng phương pháp hoặc đường dùng để có thể đưa ít nhất là một phần chất ức chế vào vị trí mong muốn. Hoạt chất ức chế BCL11A có thể được dùng theo một đường dùng thích hợp bất kỳ để có thể điều trị hiệu quả cho bệnh nhân, nghĩa là việc sử dụng sẽ đưa hoạt chất vào một ví trí mong muốn ở bệnh nhân được sử dụng chế phẩm, nghĩa là sẽ có ít nhất một hoạt chất ức chế BCL11A hoạt động ở ví trí mong muốn trong một khoảng thời gian. Khoảng thời gian chất ức chế hoạt động phụ thuộc vào thời gian bán hủy *in vivo* sau khi sử dụng trên bệnh nhân, và có thể kéo dài chỉ vài giờ, chẳng hạn, 24 giờ, đến vài ngày hay kéo dài đến vài năm. Phương thức sử dụng thuốc gồm có tiêm, truyền, nhỏ giọt, hoặc qua đường tiêu hóa. "Tiêm" gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, tiêm động mạch, tiêm vào vỏ não, tiêm vào não thất, tiêm vào nang, tiêm vào mắt, tiêm vào tim, tiêm vào da, tiêm vào phúc mạc ổ bụng, tiêm qua khí quản, tiêm dưới ra, tiêm dưới biểu bì, tiêm dưới nang, tiêm dưới màng nhện, tiêm vào cột sống, tiêm vào não tủy, và tiêm vào xương ức.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu của động vật có vú cần điều trị được cho tiếp xúc với chế phẩm ức chế quá trình biểu hiện BCL11A.

Thuật ngữ "ức chế quá trình biểu hiện BCL11A" dùng để chỉ mức độ biểu hiện BCL11A ở nhóm được xử lý bằng chất ức chế BCL11A thấp hơn ít nhất 5% so với nhóm đối chứng tương đương không được xử lý chất ức chế BCL11A. Được ưu tiên là tỷ lệ phần trăm mức độ biểu hiện BCL11A trong nhóm được xử lý bằng chất ức chế BCL11A thấp hơn ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 1 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần, ít nhất 1000 lần, hoặc thấp hơn nữa so với nhóm được xử lý bằng chất đối chứng trong đó chất ức chế BCL11A không được thêm vào.

Theo một phương án, chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A được chọn từ phân tử nhỏ và axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên, axit nucleic là ARN gây nhiễu đặc hiệu với BCL11A hoặc vectơ mã hóa ARN gây nhiễu, hoặc aptamer gắn với BCL11A. Theo một phương án được ưu tiên, ARN gây nhiễu bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình tự từ trình tự SEQ ID NO:1 đến trình tự SEQ ID NO:6.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu của động vật có vú cần điều trị được cho tiếp xúc với chế phẩm ức chế hoạt tính BCL11A.

Thuật ngữ "ức chế hoạt tính BCL11A" nghĩa là lượng hoạt tính chức năng của BCL11A ở nhóm được xử lý bằng chất ức chế BCL11A thấp hơn ít nhất 5% so với nhóm đối chứng tương đương không được xử lý bằng chất ức chế BCL11A. Được ưu tiên là tỷ lệ phần trăm hoạt tính BCL11A trong nhóm được xử lý bằng chất ức chế BCL11A thấp hơn ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 1 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần, ít nhất 1000 lần, hoặc thấp hơn nữa so với nhóm đối chứng tương đương trong đó không có chất ức chế BCL11A. Tối thiểu là, hoạt tính BCL11A có thể được thử nghiệm bằng cách xác định mức độ biểu hiện BCL11A theo nồng độ protein hoặc ARN thông tin, sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính BCL11A có thể được xác định sử dụng cấu trúc gen thông báo, trong đó cấu trúc gen thông báo là cấu trúc nhạy cảm với hoạt tính BCL11A. Trình tự locut γ-globin có thể được nhận biết bởi cấu trúc liên kết với axit nucleic của cấu trúc BCL11A. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính BCL11A có thể được thử nghiệm bằng cách đo mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai theo nồng độ ARN thông tin hoặc protein sau khi xử lý bằng chất ức chế BCL11A. Sự tăng mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai ít nhất 10% có nghĩa là hợp chất thử nghiệm chính là chất ức chế BCL11A.

Theo một phương án, chất ức chế hoạt tính BCL11A được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng BCL11A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử nhỏ, và axit nucleic. Theo một phương án được ưu tiên, axit nucleic là ARN gây nhiễu đặc hiệu với BCL11A, vectơ mã hóa ARN gây nhiễu, hoặc aptamer gắn với BCL11A.

Theo phương án được ưu tiên khác, ARN gây nhiễu bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình tự từ trình tự SEQ ID NO:1 đến trình tự SEQ ID NO:6.

"Kháng thể" có thể được sử dụng theo phương pháp được mô tả ở đây gồm có globulin miễn dịch nguyên vẹn, mảnh liên kết kháng nguyên của globulin miễn dịch, cũng như protein liên kết kháng nguyên chứa vùng chức năng liên kết với kháng nguyên của globulin miễn dịch. Mảnh liên kết kháng nguyên của globulin miễn dịch bao gồm, chẳng hạn, Fab, Fab', F(ab')2, scFv và dAb. Dạng kháng thể được biến đổi đã được phát triển vẫn giữ được độ đặc hiệu liên kết, nhưng còn có các đặc khác mong muốn, chẳng hạn, đặc hiệu kép, đa trị (nhiều hơn hai vị trí liên kết), và có kích nhỏ gọn (chẳng hạn, chỉ có các vùng chức năng liên kết). Các kháng thể chuỗi đơn thiếu một số hoặc toàn bộ vùng cố định của kháng thể nguyên vẹn. Do đó, kháng thể này có thể khắc phục một số vấn đề đi kèm với việc sử dụng kháng thể nguyên vẹn. Chẳng hạn, kháng thể chuỗi đơn không có xu hướng tạo các liên kết không mong muốn giữa vùng cố định chuỗi nặng và các phân tử sinh học khác. Ngoài ra, kháng thể chuỗi đơn nhỏ hơn đáng kể so với kháng thể nguyên vẹn và có thể có khả năng thấm tốt hơn so với kháng thể nguyên vẹn, giúp cho kháng thể chuỗi đơn định vị và liên kết với các vị trí liên kết kháng nguyên đích hiệu quả hơn. Hơn nữa, kích thước tương đối nhỏ của kháng thể chuỗi đơn sẽ làm cho kháng thể này ít có khả năng tạo ra các đáp ứng miễn dịch không mong muốn ở bệnh nhân so với kháng thể nguyên vẹn. Kháng thể gồm nhiều chuỗi đơn, mỗi chuỗi có một vùng chức năng VH và VL được liên kết đồng hóa trị với nhau bằng đoạn liên kết peptit thứ nhất, có thể được liên kết đồng hóa trị với nhau bằng ít nhất một hoặc nhiều đoạn liên kết peptit để tạo thành các kháng thể chuỗi đơn đa trị, có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu. Mỗi chuỗi trong kháng thể chuỗi đơn đa trị chứa một vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng, và được liên kết bằng đoạn liên kết peptit với ít nhất một chuỗi khác. Đoạn liên kết peptit tạo bởi ít nhất 15 gốc axit amin. Số lượng axit amin lớn nhất trong đoạn liên kết là khoảng 100. Hai kháng thể chuỗi đơn có thể được kết hợp với nhau để tạo thành kháng thể kép, còn được gọi là kháng thể lưỡng trị. Kháng thể kép có hai chuỗi và hai vị trí liên kết, và có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu. Mỗi chuỗi trong kháng thể kép bao gồm vùng VH được nối với vùng VL. Các vùng chức năng này được nối bằng đoạn liên kết đủ ngắn để tránh liên kết giữa các vùng chức năng trên cùng một chuỗi, do đó sẽ tạo ra

liên kết giữa các vùng bổ sung trên các chuỗi khác nhau để tạo ra hai vị trí liên kết kháng nguyên. Ba kháng thể chuỗi đơn có thể được kết hợp để tạo thành kháng thể 3 chuỗi, còn được gọi là kháng thể tam trị. Kháng thể 3 chuỗi được tạo ra bằng các đầu axit amin của các vùng VL hoặc VH được dung hợp trực tiếp với đầu carboxyl của một vùng VL hoặc VH, nghĩa là, không có đoạn liên kết nào. Kháng thể 3 chuỗi có 3 đầu Fv trong đó các chuỗi polypeptit được sắp xếp theo kiểu đầu-đuôi, theo vòng tròn. Một cấu hình có thể có của kháng thể 3 chuỗi là mặt phẳng với 3 vị trí liên kết cũng nằm trong một mặt phẳng mỗi vị trí cách nhau một góc 120 độ. Kháng thể 3 chuỗi có thể đơn đặc hiệu, lưỡng đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu. Do đó, kháng thể hữu dụng trong phương pháp được mô tả ở đây gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể tự nhiên, mảnh lưỡng trị như (Fab')2, mảnh đơn trị như Fab, kháng thể chuỗi đơn, Fv chuỗi đơn (scFv), kháng thể một vùng chức năng, kháng thể chuỗi đơn đa trị, kháng thể kép, kháng thể 3 chuỗi, và các kháng thể tương tự liên kết đặc hiệu với kháng nguyên.

Các kháng thể cũng có thể được tạo ra từ một polypeptit hoặc một phần của polypeptit bằng các phương pháp đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể cũng có thể được tạo ra trong động vật như thỏ hoặc chuột bằng cách chủng ngừa sản phẩm gen, hoặc một đoạn gen đó. Chuột được chủng ngừa là nguồn tế bào B rất hữu ích để sản xuất tế bào lai, tế bào lai sẽ được nuôi cấy để tạo một khối lượng lớn kháng thể đơn dòng. Phương pháp sản xuất kháng thể được mô tả chi tiết, chẳng hạn, trong tài liệu Harlow et al., 1988. Mặc dù cả kháng thể đa dòng và đơn dòng có thể sử dụng trong phương pháp được mô tả ở đây, được ưu tiên là sử dụng kháng thể đơn dòng khi cần độ đặc hiệu gia tăng đối với một protein cụ thể.

Theo một phương án, chất ức chế hoạt tính BCL11A gây cản trở đến các tương tác của BCL11A với thành phần liên kết BCL11A. Theo một phương án, các thành phần liên kết BCL11A là GATA-1, FOG-1 và các thành phần của phức hệ NuRD. Theo một phương án khác, các thành phần liên kết BCL11A là matrin-3, MTA2 và RBBP7.

Thuật ngữ "cản trở các tương tác của BCL11A với các thành phần liên kết BCL11A" dùng để chỉ mức độ tương tác của BCL11A với các thành phần liên kết BCL11A ở các quần thể được xử lý bằng chất ức chế BCL11A là thấp hơn ít nhất 5%

so với quần thể đối chứng tương tương mà không được xử lý bằng chất ức chế BCL11A. Được ưu tiên là, mức độ tương tác của BCL11A với thành phần liên kết BCL11A trong quần thể được xử lý bằng chất ức chế BCL11A là thấp hơn ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 1 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 100 lần, ít nhất 1000 lần, hoặc thấp hơn nữa so với quần thể đối chứng tương đương không được xử lý bằng chất ức chế BCL11A. Tối thiểu, sự tương tác BCL11A có thể được thử nghiệm bằng cách xác định lượng BCL11A liên kết với thành phần liên kết BCL11A sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đo quang phổ khối, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, hoặc thử nghiệm lọc gel. Theo một cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính BCL11A có thể được thử nghiệm bằng cách đo mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai theo nồng độ mARN hoặc protein sau khi xử lý bằng chất ức chế BCL11A.

Theo một phương án, hoạt tính BCL11A là sự tương tác của BCL11A với các thành phần liên kết của nó: GATA-1, FOG-1, các thành phần của phức hệ NuRD, matrin-3, MTA2 và RBBP7. Do đó, kháng thể hoặc mảnh kháng thể bất kỳ, phân tử nhỏ, hợp chất hay hóa chất có thể ngăn sự tương tác này sẽ được coi là chất ức chế hoạt tính BCL11A.

Theo một phương án, một phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để đo sự tăng biểu hiện hemoglobin bào thai, chẳng hạn, phân tích thấm tách Westen cho protein γ-globin bào thai và định lượng mARN của γ-globin bào thai.

Như được mô tả ở đây, và cũng được coi là một đối tượng của sáng chế là phương pháp sàng lọc các chất điều biến hoạt tính BCL11A hoặc quá trình biểu hiện để xác định chất ức chế BCL11A.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định chất điều biến hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A, phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm, và xác định nồng độ của hemoglobin bào thai hoặc ARN thông tin của hemoglobin bào thai trong tế bào nói trên hoặc tế bào thế hệ sau của nó, trong đó sự tăng nồng độ hemoglobin

bào thai chỉ ra rằng hợp chất thử nghiệm nói trên chất ức chế hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A.

Theo một phương án, nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc *in vivo*, *ex vivo*, hoặc *in vitro*. Theo một phương án, tế bào nói trên là tế bào của người, linh trưởng không phải người hoặc động vật có vú. Theo một phương án, hợp chất thử nghiệm phân tử nhỏ, kháng thể hoặc axit nucleic. Theo một phương án, chế phẩm chứa hợp chất nói trên sẽ tạo ra sự tăng mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai.

Định nghĩa

Để thuận tiện, một số thuật ngữ sử dụng trong toàn bộ bản mô tả sẽ được đề cập ở đây. Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây đều có nghĩa tương tự như nghĩa được hiểu thông thường bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vectơ" dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển một phân tử axit nucleic khác gắn với nó. Một loại vectơ được gọi là "plasmit", là một phân tử ADN sợi kép vòng trong đó các đoạn axit nucleic bổ sung có thể được nối vào. Một loại vectơ khác là vectơ virut, trong đó các đoạn axit nucleic bổ sung có thể được nối vào hệ gen của virut. Một số vectơ có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (chẳng hạn, vectơ vi khuẩn có điểm khởi đầu phiên mã của vi khuẩn và vectơ thể bổ trợ của động vật có vú). Các loại vectơ khác (chẳng hạn, vectơ không phải thể bổ trợ của động vật có vú) được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ sau khi biến nạp vào tế bào, và nhờ đó sẽ được sao chép cùng với hệ gen của tế bào chủ. Hơn nữa, một số vectơ có khả năng định hướng quá trình biểu hiện của các gen mà chúng được liên kết linh động với. Các vectơ này ở đây được gọi là "vectơ biểu hiện tái tổ hợp", hoặc đơn giản hơn là "vectơ biểu hiện". Nói chung, vectơ biểu hiện hữu dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Theo sáng chế, thuật ngữ "plasmit" và "vectơ" có thể được sử dụng thay thế cho nhau vì plasmit là dạng vectơ thường được sử dụng nhiều nhất. Tuy nhiên, sáng chế còn đề cập đến các dạng vectơ biểu hiện khác, như vectơ virut (chẳng hạn, retrovirut không sao chép được, lentivirut, adenovirut), cũng có chức năng tương tự.

Theo một phương án, các lentivirut được sử dụng để đưa một hoặc nhiều phân tử siARN của sáng chế vào tế bào.

Trong vectơ biểu hiện, thuật ngữ "được liên kết linh động" được dùng để chỉ rằng trình tự nucleotit quan tâm được liên kết với (các) trình tự điều hòa theo cách thức mà cho phép biểu hiện trình tự nucleotit xảy ra (ví dụ, trong hệ thống phiên mã/dịch mã *in vitro* hoặc trong tế bào đích khi vectơ được đưa vào tế bào đích). Thuật ngữ "trình tự điều hòa" bao gồm các đoạn khởi đầu, yếu tố tăng cường và các yếu tố kiểm soát quá trình biểu hiện khác (chẳng hạn, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa). Các trình tự yếu tố điều hòa đã được đề cập, chẳng hạn, trong tài liệu "Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)". Trình tự điều hòa gồm các trình tự điều khiển quá trình biểu hiện liên tục trình tự nucleotit trong nhiều loại tế bào chủ khác nhau và các trình tự điều khiển quá trình biểu hiện của trình tự nucleotit chỉ trong một số loại tế bào chủ nhất định (chẳng hạn, trình tự điều hòa đặc hiệu mô). Hơn nữa, các tác nhân gây nhiễu ARN có thể được phân phối bởi vectơ chứa trình tự điều hòa để định hướng quá trình tổng hợp các siARN theo sáng chế tại các thời điểm cụ thể, hoặc trong một khoảng thời gian cụ thể. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng sẽ hiểu rằng việc thiết kế vectơ biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố như lựa chọn tế bào đích, mức độ biểu hiện của siARN mong muốn, và các yếu tố tương tự.

Các vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể được đưa vào tế bào đích để tạo ra các phân tử siARN theo sáng chế. Theo một phương án, ADN khuôn, chẳng hạn, ADN khuôn mã hóa phân tử siARN định hướng chống lại alen đột biến, có thể được gắn vào vectơ biểu hiện dưới sự kiểm soát của ARN polymeraza III (Pol III), và được đưa vào tế bào đích. Pol III sẽ điều khiển quá trình tổng hợp các bản phiên mã nhỏ, không mã hoá, có đầu 3' được xác định bằng phần đuôi nằm trong đoạn trình tự thẳng gồm 4 đến 5 thymidin. Do đó, ADN khuôn có thể được sử dụng để tổng hợp, *in vivo*, cả sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa của các siARN có tác dụng gây nhiễu ARN (Sui, et al. (2002) PNAS 99(8):5515).

Như được sử dụng theo sáng chế và yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "phương pháp" bao gồm một hoặc nhiều phương pháp, và/hoặc bước tiến hành của phương pháp được mô tả ở đây và/hoặc các phương pháp mà sẽ trở nên rõ ràng với người có trình độ

trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sau khi đọc bản mô tả. Cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết trên đây và phần ví dụ thực hiện sáng chế sau đây chỉ có mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi và biến đổi khác nhau đối với các phương án được đề cập có thể được thực hiện mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, tất cả các tài liệu patent, đơn patent và công bố tìm được được đưa vào đây với mục đích mô tả và minh họa, chẳng hạn, các phương pháp được đề cập trong các Công bố có thể được sử dụng cùng với sáng chế. Các công bố này được đưa ra trước ngày nộp đơn sáng chế này.

Sáng chế có thể được xác định theo các điểm bất kỳ sau đây:

[A] Phương pháp để làm tăng nồng độ hemoglobin bào thai trong tế bào, phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với một lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A, nhờ đó quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai được tăng lên trong tế bào, hoặc tế bào thế hệ sau của nó, so với tế bào trước khi cho tiếp xúc.

[B] Phương pháp theo điểm **[A]**, trong đó nguyên bào tạo máu là tế bào thuộc dòng tế bào hồng cầu.

[C] Phương pháp theo điểm **[A]**, trong đó nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc *ex vivo* hoặc *in vitro*.

[D] Phương pháp theo điểm **[A]**, trong đó chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A sẽ ức chế quá trình biểu hiện BCL11A.

[E] Phương pháp theo điểm **[D]**, trong đó chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A được chọn từ phân tử nhỏ và axit nucleic.

[F] Phương pháp theo điểm **[E]**, trong đó axit nucleic là tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A, hoặc vectơ mã hóa tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A.

[G] Phương pháp theo điểm **[F]**, trong đó tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình tự SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:6.

[H] Phương pháp theo điểm **[A]**, trong đó chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A sẽ ức chế hoạt tính BCL11A.

[I] Phương pháp theo điểm **[H]**, trong đó chất ức chế hoạt tính BCL11A được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng BCL11A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử nhỏ và axit nucleic.

[J] Phương pháp theo điểm **[I]**, trong đó axit nucleic là tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A, vectơ mã hóa tác nhân gây nhiễu ARN, hoặc một aptame liên kết với BCL11A.

[K] Phương pháp theo điểm **[J]**, trong đó tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình tự SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:6.

[L] Phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai ở động vật có vú, phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu ở động vật có vú tiếp xúc với một lượng hữu hiệu của chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A, nhờ đó mức độ biểu hiện hemoglobin bào thai được tăng lên ở động vật có vú so với mức độ biểu hiện trước khi cho tiếp xúc.

[M] Phương pháp theo điểm **[L]**, trong đó động vật có vú được chẩn đoán bị bệnh hemoglobin.

[N] Phương pháp theo điểm **[M]**, trong đó bệnh hemoglobin là bệnh β-hemoglobin.

[O] Phương pháp theo điểm **[M]**, trong đó bệnh hemoglobin là bệnh hồng cầu liềm.

[P] Phương pháp theo điểm **[M]**, trong đó bệnh hemoglobin là thiếu máu β.

[Q] Phương pháp theo điểm **[L]**, trong đó nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc *ex vivo* hoặc *in vitro*, và tế bào này hoặc tế bào thế hệ sau của nó sẽ được dùng cho động vật có vú.

[R] Phương pháp theo điểm **[L]**, trong đó bước cho tế bào tiếp xúc bao gồm việc cho tế bào tiếp xúc với chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

[S] Phương pháp theo điểm **[L]**, trong đó chế phẩm được dùng qua đường tiêm, truyền, nhỏ giọt hoặc qua đường tiêu hóa.

[T] Phương pháp theo điểm **[L]**, trong đó chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A sẽ ức chế quá trình biểu hiện BCL11A.

[U] Phương pháp theo điểm **[T]**, trong đó chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A được chọn từ phân tử nhỏ và axit nucleic.

[V] Phương pháp theo điểm **[U]**, trong đó axit nucleic là tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A hoặc vectơ mã hóa tác nhân gây nhiễu ARN, hoặc một aptamer liên kết với BCL11A.

[W] Phương pháp theo điểm **[V]**, trong đó tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình tự từ trình tự SEQ ID NO:1 đến trình tự SEQ ID NO:6.

[X] Phương pháp theo điểm **[L]**, trong đó chế phẩm chứa chất ức chế BCL11A sẽ ức chế hoạt tính BCL11A.

[Y] Phương pháp theo điểm **[X]**, trong đó chất ức chế hoạt tính BCL11A được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể kháng BCL11A hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử nhỏ, và axit nucleic.

[Z] Phương pháp theo điểm **[Y]**, trong đó axit nucleic là ARN gây nhiễu đặc hiệu với BCL11A, vectơ mã hóa ARN gây nhiễu, hoặc aptame liên kết với BCL11A.

[AA] Phương pháp theo điểm **[Z]**, trong đó tác nhân gây nhiễu ARN bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình từ từ trình tự SEQ ID NO:1 đến trình tự SEQ ID NO:6.

[BB] Phương pháp xác định chất điều biến hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện BCL11A, phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với chế phẩm chứa hợp chất thử nghiệm, và đo nồng độ hemoglobin bào thai hoặc mARN của hemoglobin bào thai trong tế bào đó hoặc tế bào thế hệ sau của nó, trong đó sự tăng hemoglobin bào thai chỉ ra rằng hợp chất thử nghiệm là chất ức chế hoạt tính hoặc quá trình biểu hiện của BCL11A.

[CC] Phương pháp theo điểm **[AA]**, trong đó nguyên bào tạo máu được cho tiếp xúc *in vivo*, *ex vivo*, hoặc *in vitro*.

[DD] Phương pháp theo điểm **[AA]**, trong đó tế bào là tế bào của người, linh trưởng không phải người, hoặc động vật có vú.

[EE] Phương pháp theo điểm **[AA]**, trong đó hợp chất thử nghiệm là phân tử nhỏ, kháng thể hoặc axit nucleic.

[FF] Phương pháp theo điểm **[AA]**, trong đó chế phẩm thử nghiệm gây ra sự tăng nồng độ ARN thông tin của hemoglobin bào thai hoặc quá trình biểu hiện protein.

Sáng chế sẽ được minh họa rõ ràng hơn bằng phần ví dụ thực hiện sáng chế sau đây, và không nên hiểu rằng sáng chế sẽ chỉ giới hạn ở những ví dụ đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Vật liệu và phương pháp

Nuôi cấy tế bào

Tế bào tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên bào tủy (MEL) được nuôi cấy và thể tách dòng mang enzym BirA và dạng được gắn đuôi của BCL11A được tạo ra như đã mô tả trước đây (Woo et al., Mol Cell Biol 28, 2675 (2008)). Tất cả các cấu trúc được tạo ta sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp chuẩn. Các tế bào MEL được duy trì trong môi trường Eagle biến đổi của Dulbecco (DMEM) có huyết thanh bào thai bê 10% (FCS) và penixilin-streptomyxin 2% (P/S). Các loại kháng sinh thích hợp được thêm vào môi trường khi cần để chọn lọc hoặc duy trì thể tách dòng, như được mô tả (Woo et al., Mol Cell Biol 28, 2675 (2008)).

Tế bào COS-7 và 293T được duy trì trong DMEM với FCS 10%. Tế bào được chuyển nhiễm bằng chất phản ứng FuGene 6 (Roche) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các tế bào sơ cấp CD34+ của người thu được từ các mẫu đơn nhân được chọn bằng phương pháp từ tính của mẫu máu ngoại vi được huy động bằng G-CSF từ người hiến tặng và được làm lạnh sau khi phân lập. Các tế bào thu được từ Yale Center of Excellence in Molecular Hematology (YCEMH). Các tế bào được rã đông và rửa bằng RPMI 1640 với FCS 10%, và sau đó được cấy trải trong môi trường StemSpan SFEM (StemCell Technologies Inc.) với hỗn hợp xytokin 1X CC100 (StemCell Technologies Inc.) và P/S 2%. Các tế bào được duy trì trong môi trường biệt hóa ở mật độ từ 0,1 đến $1x10^6$ tế bào/ml và môi trường được thay đổi hàng ngày hoặc sau 3 ngày nếu cần. Các tế bào được giữ trong môi trường giãn nở trong tổng số 6 ngày. Vào ngày thứ 6, tế bào

được cấy trải lại vào môi trường StemSpan SFEM có P/S 2%, SCF 20ng/ml, Epo 1U/ml, IL-3 5ng/ml, 2mmol dexamethason, và 1mmol β-estradiol. Các tế bào được duy trì trong môi trường biệt hóa, môi trường được thay đổi hàng ngày hoặc sau 3 ngày nếu cần. Các tế bào được duy trì ở mật độ từ 0,1 đến $1x10^6$ tế bào/ ml. Vào ngày thứ 3 của quá trình biệt hóa, có sự đồng nhất mạnh hơn trong môi trường. Vào ngày thứ 5, phần lớn tế bào đều có hình thái sơ bộ của tiền nguyên bào hồng cầu và vào ngày thứ 7 phần lớn tế bào đều có hình thái nguyên bào hồng cầu ưa bazơ. Vào ngày thứ 12, phần lớn tế bào có hình thái của nguyên bào hồng cầu bắt màu bình thường và bắt nhiều màu.

Dịch máu được chuẩn bị từ các tế bào vào ngày 12 của quá trình biệt hóa, như đã được mô tả (Sankaran et al., Genes Dev. 22:463 (2008)), sử dụng phương pháp gây tan thẩm thấu trong nước và 3 chu trình đông lạnh-rã động nhanh. Các mảnh vỡ tế bào được làm sạch bằng phương pháp ly tâm và dịch thủy phân được bảo quản ở nhiệt độ -80°C hoặc trong một vài ngày ở nhiệt độ 4°C. Điện di hemoglobin bằng xenluloza axetat và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được tiến hành trong các phòng thí nghiệm lâm sàng ở bệnh viện Brigham and Women sử dụng các tiêu chuẩn lâm sàng đối với hemoglobin của người.

Tách chiết ARN và qRT-PCR

Quá trình phân tách ARN được thực hiện sử dụng hóa chất Trizol (Sigma) hoặc bằng bột kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). ARN thu được bằng cách sử dụng hóa chất Trizol, tiếp theo được xử lý bằng RQ1 ADNaza (Promega) trước khi quá trình tổng hợp ADN bổ trợ diễn ra. Quá trình phân giản trên cột ADNaza (Qiagen) được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất bằng bộ kit RNeasy Mini Kit. ADN bổ trợ được tổng hợp bằng bộ kít tổng hợp ADN bổ trợ iScript (Bio-Rad). PCR xác định theo thời gian thực được thực hiện sử dụng iQ SYBR Green Mastermix (Bio-Rad), như được mô tả trước đây (Sankaran et al., Genes Dev. 22:463 (2008)). Mức độ biểu hiện tương đối được định lượng bằng cách sử dụng phương pháp ΔΔCt như đã được mô tả (Sankaran et al., Genes Dev 22, 463 (2008)). Trình tự của đoạn mồi sử dụng cho RT-PCR là có sẵn theo yêu cầu. Quá trình bào chế mẫu để phân tích biểu hiện trên vi mạch được thực hiện như đã được mô tả (Sankaran et al., Genes Dev 22, 463 (2008)) và vi mạch được xử lý bằng Dana-Farber Cancer Institute Microarray Core Facility. Quy

trình xử lý số liệu được thực hiện sử dụng dChip tại phòng vi tính trên trang Web của trường đại học Harvard và trang web của tổ chức r-project) với quy trình lọc được thực hiện như đã được mô tả (Sankaran et.al., Genes Dev 22, 463 (2008); Mootha et al., Nat Genet 34, 267 (2003); Su et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:6062 (2004); và Su et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:4465 (2002)). Vì các kết quả trước đây đã đề xuất rằng mức độ phương sai trung bình Affymetrix là <100 đối với ít nhất một mẫu có ARN có khả năng được biểu hiện (Su et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:4465 (2002)), nên tham số này được sử dụng là tiêu chí lọc đối với tất cả các phân tích được thực hiện ở đây.

Phân tích proteomic

Phân tích kiểu liên kết protein sử dụng dạng BCL11A được gắn ái lực được thực hiện như đã được mô tả (Woo et al., Mol. Cell. Biol. 28:2675 (2008)). Phân tích quang phổ khối được thực hiện tại phòng phổ khối Taplin của khoa Y trường đại học Harvard. Sau khi xác định peptit trong các mẫu riêng biệt (trong đó 3 mẫu sẽ được cho vào cùng một đường chạy trên gel), sẽ loại bỏ được các phần dư thừa. Phương pháp loại trừ được sử dụng để xác định protein được tinh chế đặc hiệu trong mẫu lắng chứa BCL11A và không tinh chế đặc hiệu trong mẫu lắng đối chứng ở dòng tế bào MEL mẹ chứa enzym BirA. Sau đó số liệu được củng cố bằng cách xác định protein phổ biến trong các thử nghiệm độc lập. Tất cả các bước chuẩn bị dịch chiết nhân (NE), thử nghiệm kết tủa miễn dịch (IP), thử nghiệm lọc gel của NE, thử nghiệm biểu hiện ngoại sinh tạm thời với IP, và thử nghiệm thiết lập bản đồ được tiến hành sử dụng các phương pháp như đã được mô tả (Woo et al., Mol Cell Biol 28, 2675 (2008)).

Xác định siARN và shARN

Dharmacon cung cấp các mẫu siARN được thu thập . Mẫu mày gồm có nhóm không đặc hiệu (D-001810-10) và nhóm hướng đích BCL11A (L-006996-00). Sử dụng các trình tự đích siARN BCL11A được nêu trong bảng 1.

Bảng 1

SEQ ID NO 1	GAGCACAAACGGAAACAAU
SEQ ID NO 2	GCCACAGGAUGACGAUUGU

SEQ ID NO 3	GCACUUAAGCAAACGGGAA
SEQ ID NO 4	ACAGAACACUCAUGGAUUA

Các siARN này được chuẩn bị ở dạng các phần 100µM, như được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng. Các siARN được đưa vào các tế bào CD34 đã phát triển và đang biệt hóa bằng cách sử dụng Microporator-Mini (Digital Bio Technology). Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sau khi sàng lọc một số điều kiện, đã phát hiện được rằng với xung điện 1800V (sử dụng biên độ xung là 20ms) có thể thu được hiệu quả chuyển nạp tốt nhất, được đánh giá bằng cách sử dụng plasmit thông báo GFP. Hiệu quả chuyển nạp được ước tính là khoảng 50 đến 60% số tế bào sống. Thông thường, khoảng 250.000 tế bào được chuyển nạp với 4µl siARN trong thể tích khoảng 15µl. Sau đó, các tế bào được cấy trải vào môi trường biệt hóa mới.

Các dòng shARN trong vectơ pLKO thu được từ một tập hợp lớn các shARN như đã được mô tả trước đây (Moffat et al., Cell 124:1283 (2006)). Thu được hai shARN hướng đích BCL11A với các trình tự được nêu trong bảng 2.

Bảng 2

SEQ ID NO 5	CCGGCGCACAGAACACTCATGGATTCTCGAGAATCCATGAG TGTTCTGTGCGTTTTTG
SEQ ID NO 6	CCGGCCAGAGGATGACGATTGTTTACTCGAGTAAACAATCG TCATCCTCTGGTTTTTG

Các shARN này được chọn vì chúng hướng đến cả hai dạng đồng phân chính của BCL11A trong các tế bào hồng cầu. Lentivirut được chuẩn bị và quá trình chuyển nhiễm tế bào được thực hiện như đã được mô tả (Moffat et al., Cell 124:1283 (2006)). Tế bào được rửa hai lần bằng PBS và môi trường được thay đổi 24 giờ sau khi chuyển nhiễm. Quá trình chọn lọc puromyxin được bắt đầu tại thời điểm 48 giờ sau chuyển nhiễm, đây là thời điểm tương ứng với thời điểm khi tế bào được cấy trải vào môi trường biệt hóa.

Kết quả

Tương quan nghịch giữa nồng độ BCL11A và nồng độ HbF

Bước đầu tiên khi xác định xem sự thay đổi tại locut BCL11A có thể ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện globin như thế nào, quá trình biểu hiện BCL11A trong tế bào hồng cầu được khảo sát. Trong tế bào hồng cầu của người trưởng thành nguyên phát, BCL11A được biểu hiện ở hai đồng phân chính là protein và ARN (Fig.1A). Các dạng đồng phân này đã được ký hiệu từ trước là đồng phân 1 và 2 hoặc XL và L (Liu et al., Mol Cancer 5, 18 (2006)). Đồng phân XL và L chỉ khác nhau trong việc sử dụng exon ở đầu 3'và có vẻ như là gắn với nhau và có chức năng tương tự trong điều kiện khác (Liu et al., Mol. Cancer 5, 18 (2006)). Thử nghiệm thấm tách Westen chỉ ra các dạng đồng phân chính, XL và L, từ dịch chiết nhân tế bào hồng cầu người (A). Hai đồng phân này cũng có thể được khẳng định bằng RT-PCR đối với các exon và đã biết trước, được thể hiện bên phải của bản vẽ và số lượng chính xác exon được thể hiện bên trên biểu đồ. Thăm dò kiểu biểu hiện của BCL11A trong một tập hợp số liệu biểu hiện từ tế bào của người (Su et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:6062 (2004)) đã chỉ ra tương quan nghịch giữa mức độ biểu hiện BCL11A và mức độ biểu hiện của gen β-globin trong tế bào thuộc dòng tế bào hồng cầu (Fig.1B). Quá trình biểu hiện BCL11A trong tế bào hồng cầu tại các giai đoạn phát triển khác nhau của tế bào người và với các kiểu biểu hiện gen globin khác nhau được thể hiện (Fig.1B), được đánh giá từ một tập hợp lớn dữ liệu biểu hiện trong các loại mô và tế bào của người (Su et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:6062 (2004)). Bảng trên cùng thể hiện quá trình biểu hiện bình thường (theo một bảng gồm có 79 loại tế bào của người, được thực hiện ít nhất hai lần đối với mỗi loại tế bào) của BCL11A trong các loại tế bào hồng cầu erythroid và giai đoạn khác nhau được chỉ dẫn ở phần cuối từ đoạn dò 219497_s_at. Cũng có kết quả tương tự với các đoạn dò BCL11A 219498_s_at và 210347_s_at. Bảng ở dưới thể hiện nồng độ được chuẩn hóa của globin trong bào thai và trong phôi từ tập hợp dữ liệu nói trên. Số liệu được chuẩn hóa như đối với bảng ơ trên và sau đó tỷ lệ phần trăm tương đối được tính dựa trên tất cả các gen β-globin của người (gồm có gen ε-, γ-, δ- và β-globin). Đáng chú ý là, mức độ biểu hiện BCL11A là rất thấp trong tế bào hồng cầu trong gan bào thai và trong dòng tế bào hồng cầu trong phôi K562. Tương quan nghịch như vậy chỉ ra rằng quá trình biểu hiện BCL11A bị hạn chế theo giai đoạn phát triển. Hơn nữa, kiểu biểu hiện theo thời gian là phù hợp với hoạt tính BCL11A như làm chất ức chế tiềm năng quá trình biểu hiện γ-globin.

Các đột biến gen trong intron số 2 của gen BCL11A có tương quan có ý nghĩa thống kê với nồng độ HbF ở người bình thường và bệnh nhân bị rối loạn hemoglobin (Lettre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2008); Uda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 105:1620 (2008); và (Menzel et al., Nat. Genet. 39, 1197 (2007)). Dấu hiệu liên quan đã được thiết lập rõ ràng với một thể đột biến đơn có độ mất cân bằng liên kết gần (LD) với SNP rs4671393 (Lettre et al., *sách đã dẫn* (2008)). Vì mối tương quan này đã được khẳng định trong các nhóm chủng tộc châu Âu và châu Phi, nên quá trình biểu hiện BCL11A như một chức năng của kiểu gen at rs4671393 trong dòng tế bào nguyên bào lympho từ các nhóm người HapMap European (CEU) và African (YRI) đã được khảo sát. Như được chỉ ra trên Fig.2A, thể đột biến thông thường rs4671393 có liên quan với quá trình biểu hiện BCL11A trong dòng tế bào nguyên bào lympho của người HapMap European (CEU) và African (YRI). qRT-PCR được thực hiện trên ARN từ các dòng tế bào nói trên và được chuẩn hóa thành nồng độ β-actin của người. Hai phản ứng PCR riêng biệt được thực hiện có thể đánh giá riêng rẽ nồng độ của đồng phân XL (trên) và L (dưới) dựa trên sự khác biệt ở đầu 3'của các gen này. Cũng thu được kết quả tương tự bằng cách phân tích trình tự 5' chung sử dụng qRT PCR. Kết quả được thể hiện ở dạng giá trị trung bình với độ lệch chuẩn được thể hiện bằng thang sai số. Sự khác biệt giữa các kiểu gen được tính bằng cách sử dụng thử nghiệm Student t-test. Kiểu tăng nồng độ HbF đối với mỗi kiểu gen được thể hiện ở phía trên (Lettre et al., Proc Natl Acad Sci U S A (2008)).

Có thể quan sát được sự chênh lệch rõ rệt trong quá trình biểu hiện đối với cả hai đồng phân XL và L giữa các cá thể đồng hợp đối với alen HbF thấp (GG), dị hợp về cả hai alen, hoặc đồng hợp về alen nhỏ đi kèm với nồng độ HbF cao (AA) (Fig.2A). Tế bào đồng hợp về các alen "HbF cao" biểu hiện bản phiên mã BCL11A có nồng độ thấp hơn so với cá tế bào đồng hợp về alen "HbF thấp" hoặc dị hợp về cả hai alen. Do đó, mức độ biểu hiện BCL11A ở các thể đột biến khác nhau có tương quan nghịch với nồng độ HbF kèm theo. Sự chênh lệch trong quá trình biểu hiện giữa các alen BCL11A đi kèm với HbF "cao" và "thấp" HbF là khoảng 3 lần. Do đó, mức độ chênh lệch trung bình tương đối ở mức độ biểu hiện BCL11A có vẻ có tương quan với sự thay đổi trong quá trình biểu hiện HbF. Cùng với kiểu phụ thuộc vào quá trình phát triển của quá trình biểu hiện BCL11A, kết quả này đã cung cấp căn cứ độc lập, tuy là

gián tiếp, về cách thức mà BCL11A có thể hoạt động như một chất ức chế quá trình biểu hiện γ-globin.

Ngạc nhiên là, dòng tế bào tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên bào tủy phôi K562 biểu hiện ở mức độ rất thấp các đồng phân XL và L, nhưng lại biểu hiện các protein đột biến mạch ngắn hơn (Fig.2B). Để đánh giá liệu sự khác biệt giữa nguyên bào hồng cầu trưởng thành và tế bào K562 có tạo ra sự kiểm soát theo giai đoạn phát triển BCL11A hay đây là một đặc điểm ác tính của các tế bào này, nguyên bào hồng cầu CD71+/CD235+ phù hợp theo từng giai đoạn được phân lập từ tủy xương của người trưởng thành được nghiên cứu, tế bào trong gan bào thai trong giai đoạn 3 tháng thứ hai (FL), và tế bào nguyên phát tuần toàn trong giai đoạn 3 tháng thứ nhất. FL và nguyên bào hồng cầu nguyên phát, đều biểu hiện mạnh γ-globin (C. Peschle et al., 1985, Nature 313, 235), biểu hiện chủ yếu là thể đột biến BCL11A mạch ngắn hơn (Fig.2B). Trong khi tác giả sáng chế đang nghiên cứu cấu trúc của các protein đột biến này, các phát hiện ở đây chỉ ra rằng locut BCL11A được điều hoà theo giai đoạn phát triển, do đó đồng phân XL và L nguyên vẹn được biểu hiện chủ yếu ở nguyên bào hồng cầu trưởng thành. Một cách độc lập, số liệu di truyền khẳng định rõ ràng rằng nồng độ của các đồng phân XL và L bị tác động bởi các đột biến trong trình tự của gen BCL11A.

BCL11A liên kết với phức hệ ức chế NuRD, GATA-1, và FOG-1 trong tế bào hồng cầu.

Để hiểu rõ hơn về cơ chế hoạt động của BCL11A trong tế bào hồng cầu, protein liên kết với BCL11A được nghiên cứu. Đầu tiên, dạng được gắn ái lực của BCL11A trong tế bào tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên bào tủy (MEL) của chuột được chuẩn bị (Fig.3A). Các tế bào này là mẫu hình thuận lợi của tế bào hồng cầu trưởng thành biểu hiện duy nhất các globin trưởng thành (Papayannopoulou et.al., Cell 46:469 (1986)). Quy trình được sử dụng để tinh chế ái lực trong tế bào tăng sinh nguyên hồng cầu-nguyên bào tủy (MEL) của chuột được thể hiện trong sơ đồ. Khi quá trình tách rửa FLAG peptit đã được thực hiện, quang phổ phối toàn bộ đường chạy trên gel acrylamit được thực hiện như đã được mô tả. Để xác định các liên kết đặc hiệu, phương pháp loại trừ bao gồm phương pháp làm lắng đồng thời trong tế bào Mel-BirA (MB) mẹ được sử dụng. Kết quả của phương pháp sàng lọc loại trừ được chỉ ra (Fig.3B) với số

lượng peptit thu được trong mỗi thử nghiệm được ghi liền với protein xác định được. Các thành phần khác nhau của phức hệ NuRD được thể hiện bằng màu xanh trong bảng này (Fig.3D).

Không quan sát được các thay đổi phiên mã toàn phần bằng phân tích vi mạch sau quá trình biểu hiện dạng gắn ái lực của BCL11A trong các tế bào này (Fig.3C). Cường độ được chuẩn hóa bằng $\log_2$ của các dầu dò được lọc từ vi mạch Affymetrix 430 2.0 trên các tế bào MB mẹ và tập hợp gồm 4 thể tách dòng chứa dạng FLAG-Biotag của BCL11A (thể tách dòng FBB) được thể hiện bằng màu đỏ. Hồi quy tuyến tính được thể hiện bằng đường kẻ màu đen (r^2 = 0,9753). Phân tích vi mạch và quy trình lọc được thực hiện như được mô tả ở đây. Hệ số tương quan toàn phần (r^2) là 0,9753 đối với cường độ được chuẩn hóa bằng $\log_2$ của đầu dò từ dòng tế bào trong suốt ó với tập hợp các thể tách dòng biểu hiện BCL11A được gắn ái lực, chỉ ra sự tương quan chặt trong hoạt tính phiên mã của các tế bào này (với giá trị r^2 lần lượt là 0,9678, 0,9445, 0,9667, và 0,9736 đối với từng thể tách dòng cho thấy mức độ biểu hiện gấp lần lượt 1, 1, 4, và 9 lần ở BCL11A được gắn ái lực so với mức độ nội sinh). Sau khi tinh chế ái lực phức hệ protein chứa BCL11A được gắn ái lực và đọc trình tự peptit bằng quang phổ khối, tác giả sáng chế đã xác định được nhiều peptit của BCL11A, phù hợp với phát hiện rằng BCL11A có thể tự liên kết và các phức hệ này có vẻ như gồm có nhiều đồng phân (Liu et al., Mol Cancer 5, 18 (2006)) (Fig.3B). Tất cả các thành phần của phức hệ ức chế tái tạo nucleosom và histon deacetylaza (NuRD) được tìm thấy, cho thấy liên kết vật lý giữa BCL11A và phức hệ trong tế bào hồng cầu (Fig.3B, màu xanh), phù hợp với các phát hiện trước đây về BCL11A trong tế bào B và đồng phân BCL11B trong tế bào T (Cismasiu et al., Oncogene 24:6753 (2005)). Phù hợp với liên kết phát hiện được, BCL11A chứa cấu trúc đầu N được cho là của các protein khác để tạo ra phức hệ NuRD (Fig.3D) (Lauberth et. al., J. Biol. Chem. 281:23922 (2006) và Hong et al., Embo J. 24:2367 (2005)).

Cũng phát hiện được rằng, protein chất nền trong nhân, matrin-3 (Nakayasu et.al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:10312 (1991)), được đồng tinh chế với BCL11A, có thể có vai trò một phần trong việc định khu BCL11A trong chất nền trong nhân (Liu et al., Mol. Cancer 5, 18 (2006)) (Fig.3B). Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng locut β globin được liên kết chặt với chất nền trong nhân cho đến các

giai đoạn muộn của quá trình sinh tổng hợp hồng cầu khi quá trình phiên mã gen globin ở mức độ cao xảy ra (Ragoczy et. al., Genes Dev. 20:1447 (2006)). Ngoài ra, phức hệ BCL11A chứa các peptit thu được từ GATA-1, yếu tố phiên mã hồng cầu cơ bản (Martin, Nature 338:435 (1989)) (Fig.3B).

Liên kết này còn được xác định đặc điểm và kiểm định. Bằng thử nghiệm kết tủa miễn dịch (IP), có thể khẳng định rằng GATA-1 liên kết đặc hiệu với BCL11A trong tế bào hồng cầu (Fig.4A). Thử nghiệm kết tủa miễn dịch (IP) được thực hiện bằng các hạt M2-agaroza. Hơn nữa, đã phát hiện được rằng đồng yếu tố FOG-1 GATA-1 (Tsang et al., Cell 90:109 (1997)) cũng liên kết đặc hiệu với BCL11A và sự liên kết với các thành phần NuRD trong tế bào hồng cầu càng được khẳng định hơn nữa (Fig.4A). Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng FOG-1 cũng liên kết với phức hệ NuRD (Hong et al., Embo J. 24:2367 (2005)) và kết quả này khẳng định rằng BCL11A có thể đồng bộ hoá với liên kết này ở những locut đặc hiệu.

Các phân đoạn lọc gel (cứ phân đoạn thứ 4 các thể tích 1ml được thể hiện trên gel thẩm tách) từ dịch chiết nhân tế bào hồng cầu được thể hiện và thẩm tách đối với BCL11A, MTA2, GATA-1, và FOG-1. Trong quá trình phân đoạn kích thước dịch chiết nhân tế bào hồng cầu, có thể thấy sự trùng lặp đáng kể giữa các thành phần NuRD và BCL11A trong các phức hệ có trọng lượng khổng lồ (Fig.4B). Sự trùng lặp của BCL11A với polypeptit GATA-1 và FOG-1 là ít hơn (Fig.4B). Có sự trùng lặp đáng kể giữa BCL11A và MTA2, mới một đỉnh nhỏ của GATA-1 và FOG-1 cũng quan sát được ở đây. Liên kết của BCL11A với GATA-1 (Fig.4C) và FOG-1 (Fig.4D) có thể được khẳng định bằng quá trình biểu hiện ngoại lai trong tế bào Cos7 sử dụng dạng được gắn FLAG của GATA-1 hoặc FOG-1 và dạng được gắn V5 của BCL11A. Bằng cách sử dụng phương pháp tương tự, các phân đoạn của GATA-1 (tất cả đều thể hiện quá trình biểu hiện mạnh ở đây) có thể được sử dụng để thiết lập bản đồ liên kết với BCL11A (Fig.4E). Không bị ràng buộc bởi một giả thuyết nào, có thể chỉ có một phân đoạn rất nhỏ của các yếu tố này được liên kết trong BCL11A và phức hệ NuRD. Theo một cách khác, quá trình liên kết *in vivo* có thể là lớn hơn nhưng quá trình phân ly các thành phần trong phức hệ protein có thể xảy ra trong quá trình chiết và phân đoạn theo kích thước. GATA-1 và FOG-1 kết tủa miễn dịch với BCL11A sau quá trình biểu hiện ngoại lai trong tế bào không phải tế bào hồng cầu, rằng các protein này liên

kết trực tiếp với nhau (Fig.4C và 4D). Phương pháp này được sử dụng để vẽ bản đồ các yếu tố quyết định xúc tác quá trình liên kết của GATA-1 với BCL11A (Fig.4E). Đã phát hiện được rằng BCL11A liên kết với dạng "zinc-finger" của GATA-1 (axit amin 200 đến 338) và sự liên kết này có vẻ như bị ức chế một phần bởi vùng đầu N của GATA-1. Vùng đầu N của GATA-1 được biết là rất quan trọng đối với quá trình sinh tổng hợp hồng cầu bình thường ở người (Hollanda et al., Nat. Genet. 38:807 (2006)) và được đột biến sinh dưỡng trong rối loạn tăng sinh tuỷ xương ở trẻ em và bệnh bạch cầu ở bệnh nhân bị hội chứng Down (Wechsler et al., Nat. Genet. 32:148 (2002); và Vyas et. al., Curr Opin Pediatr 19:9 (2007)). Tóm lại, số liệu protein chỉ ra rằng BCL11A liên kết với phức hệ NuRD cùng với GATA-1 và FOG-1 trong tế bào hồng cầu. Các yếu tố đi kèm có khả năng là cần thiết cho quá trình hoạt động của BCL11A như một chất ức chế phiên mã trong tế bào hồng cầu.

Đánh giá chức năng của BCL11A như một chất ức chế quá trình biểu hiện của HbF

Các kết quả đã cho thấy các bằng chứng về di truyền, quá trình phát triển và hoá sinh trong việc ủng hộ vai trò tiềm năng của BCL11A như một chất ức chế quá trình biểu hiện của gen γ-globin. Để kiểm định giả thiết này, quá trình điều biến nồng độ BCL11A trong tế bào hồng cầu nguyên phát được thực hiện. Là một hệ thống tế bào để thực hiện các thử nghiệm, tiền tế bào hồng cầu từ các tế bào gốc tạo máu của người CD34+ được phát triển và biệt hoá. Tác dụng của việc đưa tạm thời các siARN hướng đích đến mARN của BCL11A được nghiên cứu. Khi các siARN được đưa vào tế bào tạo hồng cầu vào ngày 0 của quá trình biệt hoá, đạt được mức độ giảm nồng độ mARN của BCL11A từ 40 đến 45%, được đánh giá vào ngày thứ 4 của quá trình biệt hoá. Với mức độ giảm như vậy, có thể quan sát được sự tăng gấp khoảng 2,3 lần nồng độ γ-globin được đánh giá bằng qRT-PCR ở giai đoạn nguyên bào hồng cầu ưa bazơ vào ngày thứ 7 của quá trình biệt hoá (Fig.5A). Với mức độ giảm như vậy, có thể quan sát thấy sự tăng 2,3 lần nồng độ γ-globin ARN (trung bình từ 7 đến 15,7%) ở giai đoạn nguyên bào hồng cầu ưa bazơ vào ngày thứ 7 của quá trình biệt hóa (Fig.5A). Đã phát hiện được rằng, khi các siARN này được đưa vào ở các thời điểm càng muộn trong quá trình biệt hoá tế bào hồng cầu thì mức độ kích thích gen γ-globin càng thấp (mức độ kích thích γ-globin trung bình gấp 1,7 và 1,4 lần mức trung bình quan sát được khi thêm siARN vào các ngày thứ 1 và 2 của quá trình biệt hoá).

Các kết quả quan sát được từ sự giảm BCL11A do siARN có thể là do sự tác động lớn lên giai đoạn biệt hoá tế bào, đã được chỉ ra là làm thay đổi quá trình biểu hiện γ-globin (Nathan et. al., Nathan và Oski's hematology of infancy và childhood. 6th, pp. 2 v. (x9) (2003) và Stamatoyannopoulos, Exp. Hematol. 33:259 (2005)), hoặc phản ánh nhiều tác động trực tiếp lên một số lượng giới hạn các phân tử đích, bao gồm gen γ-globin. Để phân biệt các khả năng này, việc xác định đặc điểm biểu hiện vi mạch của tế bào sau khi làm giảm nồng độ BCL11A và tiếp theo là hoạt hoá. Việc xác định đặc điểm dựa trên vi mạch tế bào sử dụng vi mạch Affymetrix U133 Plus 2.0 đã chỉ ra rằng có sự tương đồng lớn trong đặc điểm biểu hiện của các tế bào xử lý bằng siARN không hướng đích và các tế bào được xử lý bằng siARN hướng đích BCL11A (r^2 = 0,9901). Biểu đồ được thể hiện bằng cường độ đầu dò được chuẩn hoá $\log_2$. Đặc điểm phiên mã của gen trong khoảng định lượng của vi mạch (trừ globin) là giống nhau đáng kể giữa các tế bào vào ngày thứ 7 sau khi xử lý bằng siARN BCL11A và siARN không hướng đích (NT – non targeting) vào ngày 0, với r^2 bằng 0,9901 ở cường độ được chuẩn hoá $\log_2$ (Fig.5B). Ngoài ra, hình thái của hai nhóm tế bào này là không thể phân biệt được trong quá trình biệt hoá. Tóm lại, kết quả nói trên chỉ ra rằng sự giảm BCL11A có thể làm thay đổi quá trình biểu hiện globin mà không gây ra các thay đổi toàn phần trong trạng thái biệt hoá của tế bào.

Để nghiên cứu tác dụng của sự giảm kéo dài mức độ biểu hiện BCL11A, shARN của lentivirut điều khiển sự giảm mức độ biểu hiện BCL11A với việc chọn lọc tế bào được chuyển nạp được sử dụng (Moffat et al., Cell 124, 1283 (2006)). Hai cấu trúc shARN riêng biệt được chọn để thực hiện mục đích này. Khi các tế bào được chuyển nhiễm bằng hai lentivirut mang shARN BCL11A và phương pháp chọn lọc bằng dược chất được thực hiện khi bắt đầu quá trình biệt hoá, xác định được mức độ giảm BCL11A trung bình khoảng 97% và 60% ở nồng độ protein vào ngày thứ 5 của quá trình biệt hoá tế bào hồng cầu, dựa trên phép đo mật độ sản phẩm thấm tách Western (Fig.5C). Vào ngày thứ 6 của quá trình biệt hoá (giai đoạn từ tiền nguyên bào hồng cầu đến nguyên bào hồng cầu ưa bazơ), tế bào có vẻ là không thể phân biệt được về mặt hình thái so với các giai đoạn khác của quá trình biệt hoá. Không có sự khác biệt về hình thái giữa các nhóm tế bào trong khi biệt hoá, chỉ ra rằng cũng giống như

trong trường hợp các thử nghiệm siARN, sự giảm BCL11A không ảnh hưởng chung đến quá trình biệt hoá tế bào hồng cầu (Fig.5D).

Nồng độ của γ-globin vào ngày thứ 7 của quá trình biệt hoá được tăng nhanh chóng lên 6,5 và 3,5 lần (từ mức trung bình là 7,4% lên 46,8% và 26%) trong hai nhóm tế bào được xử lý bằng shARN gây giảm nồng độ BCL11A so với tế bào đối chứng (Fig.5E). Hiệu quả mạnh này có khả năng là kết quả của quá trình chọn lọc tế bào được chuyển nạp, cũng như sự biểu hiện liên tục shARN sau khi chuyển nhiễm virut. Quá trình kích thích ARN γ-globin đi kèm với nồng độ tương ứng của HbF trưởng thành, được chỉ ra bằng điện di hemoglobin và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) (Fig.5F). Dịch máu được tạo ra từ tế bào vào ngày thứ 12 của quá trình biệt hoá cho thấy sự có mặt của HbFb trưởng thành. Điều này có thể được đánh giá bằng cách sử dụng điện di xenluloza axetat hemoglobin, với vết HbF thể hiện ở các hình phía trên và thông số trung bình tương ứng từ phép đo mật độ được chỉ ra dưới các hình này. Điều này cũng có thể được định lượng một cách chính xác hơn bằng phương pháp HPLC hemoglobin, như được chỉ ra ở phía dưới hình. Đỉnh HbF được đánh dấu bằng mũi tên trong từng sơ đồ sắc ký, với đỉnh thứ nhất tương ứng với HbF được axetyl hoá và đỉnh thứ hai là HbF không bị biến đổi. HPLC cho thấy rằng một phân đoạn đáng kể của hemoglobin trưởng thành trong tế bào là HbF (với nồng độ trung bình là 35,9 và 23,6%, trong khi nồng độ ở nhóm đối chứng là không phát hiện được). Dựa trên sự thay đổi trong mức độ giảm BCL11A từ các thử nghiệm siARN và shARN và mức độ kích thích γ-globin đi kèm, có vẻ như BCL11A hoạt động như một biến trở để điều hoà quá trình bất hoạt gen γ-globin.

Các nghiên cứu phân tử về quá trình chuyển đổi globin trong quá trình phát sinh gen có vai trò như một mô hình kiểm soát quá trình phát triển của gen đồng vật có vú. Mặc dù đã được nghiên cứu nhiều, nhưng cơ chế phân tử chính xác đằng sau quá trình này vẫn chưa được biết. Khi không bị ràng buộc bởi bất kỳ một giả thuyết nào, kết quả được mô tả ở đây đã chỉ ra rằng bản thân BCL11A là một chất điều biến được điều hoà theo giai đoạn phát triển và cần thiết của quá trình này. Tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng BCL11A ức chế quá trình biểu hiện gen γ-globin trong tế bào hồng cầu trưởng thành nguyên phát của người. Số liệu protein cho thấy BCL11A hoạt động cùng với phức hệ chất ức chế NuRD, GATA-1, và FOG-1. Đáng chú ý là, chất ức chế histon deaxetylaza

(HDAC) có thể kích thích HbF ở bệnh nhân bị các rối loạn hemoglobin (Perrine, Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program, 38 (2005)). Cả HDAC1 và HDAC2 đều là các thành phần lõi của phức hệ NuRD và liên kết với BCL11A chỉ ra rằng phức hệ này có thể là đích phân tử của các liệu pháp điều trị. Từ các nghiên cứu di truyền người, có thể thấy là quá trình điều biến BCL11A có thể làm tăng nồng độ HbF và làm giảm mức độ nghiêm trọng của các bệnh nói trên (Lettre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2008); Uda et al., Proc Natl Acad Sci U S A 105, 1620 (2008) và Menzel et al., Nat Genet 39, 1197 (2007)). Là một thành phần tham gia vào quá trình ức chế quá trình biểu hiện γ-globin đặc hiệu với từng giai đoan, BCL11A là một đích điều trị để tái hoạt hoá HbF trong bệnh hồng cầu liềm và bệnh thiếu máu β. Có khả năng là các nghiên cứu tiếp theo về BCL11A và các yếu tố đi kèm trong quá trình điều hoà gen globin sẽ thu được các hiểu biết về cơ chế của quá trình chuyển đổi trong bào thai và biến đổi nồng độ HbF ở người.

Ví dụ 2

Vật liệu và phương pháp

Động vật thử nghiệm

Tất cả các thử nghiệm được thực hiện với chuột có locut β, K-RasG12D, BCL11A -/-, GATA1-Cre, và Mx1-Cre được phê duyệt bởi hội đồng của bệnh viện Nhi khoa Boston và hội đồng y đức của trung tâm nghiên cứu ung thư Fred Hutchinson.

Chủng chuột chuyển gen locut β kiểu dại YAC (β-YAC) được sử dụng trong nghiên cứu này có kiểu biểu hiện gen globin của người tương tự và là đại diện cho một số các chủng chuột chuyển gen khác nhau mang toàn bộ locut β-globin của người (Peterson, K.R. et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:7593-7; Peterson, K.R., et al. 1998, Hum. Mol.Genet. 7:2079-88; Harju, S., et al., 2005, Mol. Cell Biol. 25:8765-78; Porcu, S. et al. 1997, Blood 90:4602-9; Gaensler, K.M., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:11381-5; Strouboulis, J., et al., 1992, Genes Dev. 6:1857-64). Dòng chuột chuyển gen được cung cấp bởi K. Peterson và được tạo ra bằng phương pháp xen YAC 213kb chứa locut β-globin toàn vẹn của người và đã được mô tả và xác định đặc điểm trước đây (Peterson, K.R. et al. 1993; Peterson, K.R., et al.

1998; Harju, S., et al., 2005, *sách đã dẫn*). Dòng β-YAC chứa 3 bản sao nguyên vẹn của locut β-globin của người được kết hợp trong một locut hệ gen đơn nhất. Hai dòng β-YAC (A20 và A85) mang một bản sao của YAC locut β-globin 150kb cũng được sử dụng trong nghiên cứu này và đã được mô tả (Porcu, S. et al. 1997, *sách đã dẫn*) (được cung cấp bởi K. Gaensler). Các gen chuyển này được duy trì ở trạng thái bán hợp tử. Động vật được nuôi duy trì trên chất nền C57Bl/6 tinh khiết đối với tất cả các thử nghiệm bao gồm phân tích quá trình tạo máu trưởng thành. Rối loạn tăng sinh tuỷ xương kiểu bạch cầu đơn nhân tuỷ xương thiếu niên được gây ra bằng cách lai chéo dòng Mx1-Cre với dòng mang alen điều hoà K-rasG12D (Chan, I.T. et al., J. 2004, Clin. Invest. 113:528-38; Braun, B.S. et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:597-602), cùng với gen chuyển β-YAC của K. Peterson. Chuột Congenic B6.SJL-PtprcaPep3b/BoyJ (Ptprca hoặc CD45.1) được mua từ Taconic Farms hoặc The Jackson Laboratory. Chuột mang alen BCL11A được kẹp giữa hai vị trí flox P (các vị trí loxP nằm hai bên exon 1) được tạo ra bằng phương pháp tác động gen và sẽ được mô tả trong các nghiên cứu tiếp theo (G.C.I., S.D.M, và P.W.T., chưa được công bố). Để thu được alen BCL11A không có hiệu lực, chuột được lai chéo với chuột GATA1-Cre và sàng lọc để loại bỏ dòng mầm (Garrick, D. et al. 2006, PLoS Genet. 2:e58; Jasinski, M., et al., 2001, Blood 98:2248-55).

Phân tích quá trình tạo máu trưởng thành

Các phân tích huyết học trưởng thành, cấy ghép tủy xương, và kích thích bằng 5-flouraxil (5-FU) được thực hiện như đã được mô tả (Sankaran, V.G., et al., 2008, Genes Dev. 22:463-475; Walkley, C.R., et al., 2005, Nat. Cell Biol. 7:172-8). PB toàn phần được phân tích trên máy phân tích huyết học Beckman Coulter AcT (Jasinski, M., et al., 2001, *sách đã dẫn*). Chuột nhận (CD45.1) được chiếu xạ với tổng số 10,5Gy tia xạ γ (5Gy và 5,5Gy, cách nhau 3 giờ) vào ngày cấy ghép. BM toàn phần được phân lập và lấy nguồn gen từ chuột β-YAC. Tổng số $2X10^6$ tế bào/chuột được tiêm qua ổ mắt vào chuột nhận. ARN thu được trong máu sử dụng bộ kit QiaAmp Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) và RT-PCR định lượng (qRT-PCR) được thực hiện như đã được mô tả (Sankaran, V.G., et al., 2008, *sách đã dẫn*; Sankaran, V.G. et al., 2008, Science 322:1839-42) (sử dụng đoạn mồi của gen globin nêu dưới đây hoặc đoạn mồi của chuột đã được báo cáo trước đây (Kingsley, P.D. et al., 2006, B!ood 107:1665-72).

Đoạn mồi của gen globin của người là exon 1 của ε-globin xuôi 5'-GAGAGGCAGCAGCACATATC-3' (SEQ ID NO:7), exon 2 của ε-globin ngược 5'-CAGGGGTAAACAACGAGGAG-3' (SEQ ID NO:8), exon 2 của γ-globin xuôi 5'-TGGATGATCTCAAGGGCAC-3' (SEQ ID NO:9), exon 3 của γ-globin ngược 5'-TCAGTGGTATCTGGAGGACA-3' (SEQ ID NO:10), exon 1 của β-globin xuôi 5'-CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTA-3' (SEQ ID NO:11), và exon 2 của β-globin ngược 5'- AGCATCAGGAGTGGACAGAT-3' (SEQ ID NO:12). Đoạn mồi của gen globin của chuột là exon 1 εγ-globin xuôi 5'-TGGCCTGTGGAGTAAGGTCAA-3' (SEQ ID NO:13), exon 2 của εγ-globin ngược 5'-GAAGCAGAGGACAAGTTCCCA-3' (SEQ ID NO:14), exon 2 của βh1 globin xuôi 5'-TGGACAACCTCAAGGAGACC-3' (SEQ ID NO:15), exon 3 của βh1 globin ngược 5'-ACCTCTGGGGTGAATTCCTT-3' (SEQ ID NO:16), exon 2 của β lớn/β nhỏ globin xuôi 5'-TTTAACGATGGCCTGAATCACTT-3' (SEQ ID NO:17), và exon 3 của β lớn/β nhỏ globin ngược 5'- CAGCACAATCACGATCATATTGC-3' (SEQ ID NO:18). Đoạn mồi qRT-PCR của BCL11A của chuột là xuôi 5'-AACCCCAGCACTTAAGCAAA-3'(SEQ ID NO:19) và ngược 5'-ACAGGTGAGAAGGTCGTGGT-3' (SEQ ID NO:20).

Phân tích sự tạo máu trong quá trình phát triển

Phôi thu được từ quá trình giao phối định kỳ, được lấy máu, và các tế bào dương tính với Ter119 được chọn lọc bằng phương pháp tán xạ vuông góc tương tự như phương pháp đã được mô tả (Kingsley, P.D. et al., 2006, *sách đã dẫn*). Tế bào được giữ trong nước muối sinh lý được đệm phosphat (PBS) có huyết thanh bào thai bê 5% (FCS). Heparin chưa phân đoạn trong PBS được thêm vào dung dịch này đến nồng độ cuối cùng là 12,5μg/ml. Thử nghiệm hóa mô miễn dịch sử dụng đa dòng kháng thể kháng HbF được thực hiện trên lát cắt tiêu bản được cố định trong paraffin như đã được mô tả (Choi, J.W., et al., 2001, Int. J. Hematol. 74:277-80). Tế bào gan của phôi chuột E13.5 được cắt và hỗn dịch đơn tế bào được tạo ra. Tương tự, các tế bào tủy xương thu được từ chuột theo phương pháp như đã được mô tả (Sankaran, V.G., et al., 2008, Genes Dev. 22:463-475). Trong cả hai trường hợp, tế bào được đánh dấu bằng Ter-1 19 và CD71, cũng như 7-AAD. Nhóm tế bào Ter-119+/CD71+ được

chọn lọc như đã được mô tả (Sankaran, V.G., et al., 2008, *sách đã dẫn*). Mẫu tế bào của người ở giai đoạn phát triển phù hợp được thu lại và chọn lọc như đã được mô tả (Sankaran, V.G. et al., 2008, Science 322:1839-42). Mẫu tế bào người được cung cấp bởi H. Mikkola và B. Van Handel.

Phân tích thấm tách Westen BCL11A

Quá trình biểu hiện BCL11A được thực hiện sử dụng kháng thể 14B5 (Abcam Inc., ab19487), như đã được mô tả (Sankaran, V.G. et al., 2008, Science 322:1839-42). Quá trình biểu hiện GAPDH được coi là tiêu chuẩn sử dụng kháng thể đa dòng FL-335 của thỏ (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-25778).

Thử nghiệm FISH cho bản sao ARN sơ cấp

Thử nghiệm FISH cho bản sao ARN sơ cấp được thực hiện như đã được mô tả (Wijgerde, M., et al., 1995, Nature 377:209-13; Ragoczy, T., et. al., 2006, Genes Dev. 20, 1447-57) với một số biến đổi. Trước khi lai, tiêu bản được cân bằng trong formamit 50%/2X SSC, pH=7,0. Đầu dò ADN sợi đơn bổ sung với các intron của gen α- và εγ-globin của chuột và γ- và β-globin của người được tạo ra bằng phương pháp phiên mã *in vitro* cho các đoạn intron được tách dòng sau khi phiên mã ngược và đưa vào DIG-11-dUTP, biotin-16-dUTP (Roche) hoặc DNP-11-dUTP (Perkin Elmer) trong phản ứng như đã được mô tả (Bolland, D.J. et al. 2004, Nat. Immunol. 5:630-7). Đầu dò được đánh dấu được lai với tế bào trong formamit 50%/dextran sulfat 10%/2XSSC/phức hệ ribonucleotit vanadat 5mM/BSA 0,05%/Cot-1 ADN 0,1mg/ml/ARN vận chuyển *E.coli* 1µ/µl. Đầu dò được biến tính nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 5 phút, gắn mồi sơ bộ ở nhiệt độ 37°C, và sau đó lại qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong buồng ẩm. Tiêu bản được rửa trong formamit 50%/2XSSC, pH=7 ở nhiệt độ 37°C, rửa nhẹ trong 2X SSC và phong bế trong NaCl 145mM/Tris 0,1M pH=7,5/BSA 2%/phức hệ ribonucleotit vanadat 2mM. Các bản sao phiên mã sơ cấp được phát hiện bằng phương pháp miễn dịch phát huỳnh quang gián tiếp với kháng thể liên hợp Cy3-, Alexa Fluor 488- và 647- bao gồm một hoặc hai lớp khuếch đại tín hiệu, như đã được mô tả (Trimborn, T., et al., 1999, Genes Dev. 13, 112-24).

Chụp ảnh FISH và phân tích

Chùm ảnh (các tiểu bản Z cách nhau một khoảng 0,25µm) được chụp bằng kính hiển vi Olympus IX71 (vật kính Olympus 100X/1.40, UPLS Apo) được trang bị bằng máy ảnh CCD sử dụng phần mềm Deltavision SoftWorx (Applied Precision). Sự có mặt của các bản sao phiên mã sơ cấp của gen globin được xác định trong hình chiếu 2D của Z ảnh sử dụng Photoshop (Adobe). Khoảng 100 đến 200 nhân tế bào được phân tích đối với mỗi tập hợp đầu dò và giai đoạn hoàn thiện.

Kết tủa miễn dịch chất nhiễm sắc (ChIP) của tế bào hồng cầu nguyên phát

Tế bào tạo hồng cầu thu được từ dòng tế bào CD34 của người được thu lại vào ngày thứ 5 của quá trình biệt hoá (giai đoạn tiền nguyên bào hồng cầu). Tế bào được cố định sử dụng formaldehyt nồng độ cuối cùng 1% và quá trình liên kết chéo được thực hiện trong thời gian 10 phút. Glyxin được thêm vào đến nồng độ cuối cùng 125mM để kết thúc quá trình liên kết chéo. Tế bào được rửa hai lần trong PBS và viên tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Thông thường, khoảng 15 đến $20X10^6$ tế bào được sử dụng trong một phản ứng ChIP. Thử nghiệm ChIP được thực hiện theo cách thức tương tự như đã được mô tả trong tài liệu "J. Kim,et al., 2008, Cell 132:1049". Đệm cho việc siêu âm được sửa đổi bằng cách sử dụng SDS 0,5%, thay vì 0,1%. Quy trình siêu âm được biến đổi bằng cách sử dụng từ 4 đến 6 xung trong 30 giây, mỗi xung chứa một lượng sóng âm không đổi. Quy trình chính xác như vậy thường sẽ tạo ra các phân đoạn có độ dài trong khoảng từ 300 đến 1000 cặp bazơ. Các kháng thể sau được sử dụng trong quy trình ChIP: BCL11A [14B5] (Abcam, ab19487), BCL11A [15E3AC11] (Abcam, ab18688), BCL11A (Novus Biologicals, Inc. NB600-261), và IgG thỏ (Upstate, 12-370). Cũng thu được kết quả tương tự với tất cả các kháng thể BCL11A trong tất cả các vùng được thử nghiệm.

Các mẫu ChIP được phân tích bằng PCR định lượng theo thời gian thực (BioRad). Tất cả các đoạn mồi được thử nghiệm để đạt hiệu quả của PCR theo khuyến cáo của nhà sản xuất (BioRad). Đường cong chuẩn được tạo ra cho mỗi tập hợp đoạn mồi sử dụng phương pháp chuẩn độ theo tỷ lệ ADN đầu vào. Lượng tương đối của chất nhiễm sắc kết tủa (tỷ lệ phần trăm đầu vào) được tính toán từ đường cong chuẩn đặc hiệu với đoạn mồi sử dụng phần mềm phân tích số liệu iCycler Data Analysis Software. Đoạn mồi đặc hiệu được thiết kế để khuếch đại các trình tự ở các vùng HS3; đoạn khởi đầu HBG1; vùng xuôi dòng HBG1 (+ 3kb); vùng ngược dòng HBD (-1kb);

và vùng đoạn khởi đầu HBB của locut β-globin của người. Ngoài ra, tập hợp đoạn mồi thoái hóa gắn với đoạn khởi đầu của cả HBG2 và HBG1 cũng được sử dụng và cho kết quả tương tự với tập hợp đoạn mồi đoạn khởi đầu HBG1 (không phát hiện được có sự làm giàu hay không).

Kết quả

Sự đóng góp những thay đổi trong các yếu tố điều hòa cis hoặc yếu tố tác động trans vào những sự khác nhau giữa các loài trong quá trình biểu hiện gen chưa được biết rõ. Locut β-globin của động vật có vú đóng vai trò như một mẫu hình điều hoà gen trong quá trình phát triển. Chuột chuyển gen mang locut β-globin của người, bao gồm các gen trong phôi (ε), trong bào thai (γ) và trưởng thành (β) được liên kết với nhau, đã được sử dụng là mẫu hình để nghiên cứu quá trình chuyển đổi theo thời gian từ hemoglobin bào thai sang hemoglobin trưởng thành, như quá trình diễn ra ở người. Tác giả sáng chế chỉ ra rằng gen γ-globin của người ở những con chuột này vẫn chỉ hoạt động như các gen globin trong phôi chuột, cho thấy sự hạn chế của mẫu và chứng tỏ sự khác biệt cơ bản trong cơ chế hoạt động điều hòa ngoại phân tử đã phát sinh trong quá trình tiến hóa của động vật có vú. Tác giả sáng chế chỉ ra rằng sự biểu hiện BCL11A, một yếu tố ức chế quá trình biểu hiện γ-globin của người được xác định qua các nghiên cứu hệ gen, là khác nhau giữa chuột và người. Việc bất hoạt gen globin phôi chuột và gen γ-globin của người trong quá trình phát triển đã không xảy ra ở chuột khi không có BCL11A. Do đó, BCL11A là một yếu tố trung gian cần thiết trong quá trình chuyển đổi globin khác biệt theo loài. Bằng cách so sánh quá trình phát sinh của quá trình điều hoà gen β-globin ở chuột và người, tác giả sáng chế đã chỉ ra rằng các thay đổi trong quá trình biểu hiện yếu tố điều hòa ngoại phân tử sẽ tạo ra yếu tố điều khiển sự thay đổi trong quá trình biểu hiện gen trong quá trình tiến hóa.

Mức độ mà những thay đổi trong các yếu tố điều hòa cis hoặc môi trường tác động trans tạo nên những khác biệt trong quá trình biểu hiện gen trong các loài có quan hệ gần là đối tượng gây tranh cãi (Carroll, S.B., 2008,Cell 134:25-36; Hoekstra, H.E. và Coyne, J.A., 2007, Evolution 61:995-1016). Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng những thay đổi trong các yếu tố điều hòa cis phần lớn chịu trách nhiệm cho những khác biệt giữa nhiều loài trong quá trình biểu hiện gen (Wallace, H.A. et al., 2007, Cell 128:197-209;Wilson, M.D. et al., 2008, Science 322:434-8). Sự đóng góp của các thay

đổi trong môi trường tác động trans ít được công bố. Với các chuyển đổi theo thời gian quá trình biểu hiện globin của chúng, locut β-globin của động vật có vú làm thành mẫu hình cho quá trình điều hoà gen trong quá trình phát triển (McGrath, K. & Palis, J., 2008, Curr. Top. Dev. Biol. 82:1-22). Để nghiên cứu quá trình điều hoà các yếu tố cis của người trong môi trường tác động trans của chuột, các tác giả sáng chế đã sử dụng chuột chuyển gen mang locut β-globin của người (chuột mang locut β). Quá trình điều hoà locut β-globin của người đã được nghiên cứu rộng rãi sử dụng mẫu chuột này (Wijgerde, M., et al., 1995, Nature 377:209-13; Peterson, K.R., et al., 1998, Hum. Mol. Genet. 7:2079-88; Porcu, S. et al., 1997, Blood 90:4602-9). Đã được chấp nhận rằng các mẫu chuột này cung cấp một hệ thống có giá trị để đánh giá quá trình điều hoà gen globin trong quá trình phát triển của người, mặc dù có một số khác biệt đã được lưu tâm giữa người và những con chuột này. Ví dụ, sự bắt đầu quá trình biểu hiện γ-globin xảy ra trong giai đoạn phôi, hoàng thể của quá trình sinh tổng hợp hồng cầu ở chuột, trong khi đó mức độ biểu hiện cao của gen này lại xảy ra trong giai đoạn gan bào thai ở người. Hơn nữa, sự chuyển đổi từ γ-globin thành β-globin trưởng thành xảy ra trong giai đoạn sinh tổng hợp hồng cầu trong gan bào thai sớm ở chuột (Wijgerde, M., et al., 1995; Peterson, K.R., et al., 1998, Porcu, S. et al., 1997, *sách đã dẫn*), trong khi đó quá trình này lại xảy ra trong khoảng thời điểm sinh ra ở người (Peschle, C. et al., 1985, Nature 313, 235-8). Ngoài ra, đã thấy là có sự khác biệt trong khả năng của chuột đáp ứng với các kích thích do hemoglobin bào thai (HbF) có hoạt tính ở người gây ra (Sloane-Stanley, J., 2006, Br. J. Haematol. 135:735-7; Pace, B., et al., 1994, Blood 84:4344-53). Tác giả sáng chế bắt đầu bằng việc đánh giá liệu chuột có đáp ứng với các kích thích tăng cùng với nồng độ HbF ở người hay không (Papayannopoulou, T., et al., 1984, Science 224:617-9). Tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng chuột có mức độ biểu hiện γ-globin ban đầu thấp hơn nhiều so người người trưởng thành và chuột không thể đáp ứng với các kích thích gây ra sự tăng nồng độ HbF ở người (Fig.10). Hình vẽ này chỉ ra, lần lượt, thông số ban đầu ở chuột trưởng thành (n=10), chuột cấy ghép tủy xương bằng $2X10^6$ tế bào tủy xương (chuột mang locut β) (Alter, B.P., et al., 1976, Blood 48:843-53) (n=10) vào ngày thứ 10 và 17 sau khi cấy ghép, quá trình xử lý bằng 5-FU khi mức độ giảm tế bào máu ở mức thấp nhất vào ngày thứ 7 (n=10), và xuất hiện rối loạn tăng sinh tế bào tủy xương kiểu bạch cầu

đơn nhân tủy xương thiếu niên (JMML) do quá trình hoạt hóa K-ras (Braun, B.S. et al. 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:597-602; Chan, I.T. et al. 2004, J. Clin. Invest .113:528-38) (n=3). Số liệu được vẽ biểu đồ là tỷ lệ phần trăm γ-globin so với nồng độ gen globin giống β của người tổng số được tính dựa trên kết quả qRT-PCR. Kết quả được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn của giá trị trung bình. Đáng chú ý là, mức độ ban đầu của γ-globin ở chuột thấp hơn 50 đến 100 lần so với với ở người trưởng thành (Oneal, P.A. et al. 2006, Blood 108:2081 to 6; Nathan, D. G., et al., 2003, in Hematology of infancy and childhood, 2 v. (xiv, 1864, xli p.) (Saunders, Philadelphia, Pa.,). Tương tự, trong mẫu hình bệnh bạch đầu đơn nhân tủy xương thiếu niên được tạo ra ở chuột, không phát hiện được sự tăng nồng độ γ-globin, ngược lại với nồng độ γ-globin cao ghi nhận được ở người bị hội chứng này (Weatherall, D.J. et al., 1975, Nature 257:710-2).

Các gen γ-globin bào thai người hoạt động như gen trong phôi của chuột

Để tìm ra cơ chế tiềm ẩn của sự khác biệt giữa các loài, tác giả sáng chế đã đánh giá lại quá trình phát sinh biểu hiện γ-globin của người trong quá trình phát triển của chuột. Đầu tiên, tác giả sáng chế tách được máu tuần hoàn từ phôi tại thời điểm bắt đầu quan sát được quá trình biểu hiện γ-globin (E13.5) (Wijgerde, M., et al., 1995, Nature 377:209-13; Peterson, K.R., et al., 1998, Hum. Mol. Genet. 7:2079-88; Porcu, S. et al., 1997, Blood 90:4602-9). Do các tế bào có kích thước khác nhau nên có thể phân tách các dòng tế bào tuần hoàn nguyên phát và trưởng thành bằng cách sử dụng máy đếm tế bào theo dòng (Kingsley, P.D. et al., 2006, Blood, 107:1665-72; Fraser, S.T., et al., 2007, Blood, 109:343-52), tác giả sáng chế đã làm giàu tế bào hồng cầu trong máu từ phôi vào ngày 13,5 (E13.5) của chuột mang locut β (Fig.6A). Như đã dự đoán, quá trình biểu hiện của gen εγ-globin của phôi chuột, một gen đặc hiệu với dòng tế bào hồng cầu nguyên phát cùng với βh1 globin của chuột (Kingsley, P.D. et al., 2006, Blood, 107:1665-72; Fraser, S.T., et al., 2007, Blood, 109:343-52), được làm giàu (khoảng 5 lần) trong nhóm tế bào nguyên phát so với nhóm tế bào trưởng thành (Fig.6B). Phù hợp với cách phân bố này, bản sao phiên mã ε-gobin phôi người cũng được làm giàu tương tự trong nhóm tế bào nguyên phát (Fig.6B). Ngạc nhiên là, không phát hiện được sự khác biệt giữa mức độ làm giàu tương đối gen trong phôi và mức độ làm giàu bản sao phiên mã ε-globin của người trong nhóm tế bào hồng cầu nguyên

phát so với nhóm tế bào trưởng thành (Fig.6B). Phát hiện này chỉ ra rằng gen γ-gobin của người không được biểu hiện mạnh trong tế bào hồng cầu trưởng thành sơn ở chuột mang locut β.

Sau đó, tác giả sáng chế sử dụng thử nghiệm hóa mô miễn dịch (IHC) cho γ-globin trong phôi E13.5 để đánh giá sự phân bố tế bào. IHC cho gan bào thai người (FL) cho thấy có sự đánh dấu dương tính tất cả nguyên bào hồng cầu (Fig.6C). Ngược lại, phần lớn nguyên bào hồng cầu có trong bào thai gan của chuột mang locut β không thể nhuộm màu đối với γ-globin. Tác giả sáng chế phát hiện được các nguyên hồng cầu khổng lồ, có nhân to trong bào thai gan dương tính đối với γ-globin (Fig.6D và 6E). Về mặt hình thái, các tế bào này giống với tế bào nguyên phát tiếp tục tuần hoàn với số lượng đáng kể trong giai đoạn này của thai kỳ (McGrath, K. & Palis, J., 2008, Curr. Top. Dev. Biol. 82:1-22). Phù hợp với kết quả này, một số lượng lớn các tế bào dương tính với γ-globin phát hiện trong quá trình tuần toàn đều là các nguyên bào hồng cầu khổng lồ nguyên phát, trong khi đó các tế bào nhỏ hơn, không nhân đều âm tính (Fig.6E và 6F). Để khái quát hóa phát hiện này, tác giả sáng chế đã thực hiện thử nghiệm nhuộm hóa mô miễn dịch trong các dòng tế bào thu được riêng biệt từ chuột mang locut β (Fig.6G và 6H) (Porcu, S. et al., 1997, Blood 90:4602-9). Trong tất cả các dòng tế bào, quá trình biểu hiện γ-globin (như được chỉ ra bằng kết quả IHC dương tính) là đặc hiệu với các tế bào nguyên hồng cầu khổng lồ là các tế bào hiếm có trong nhu mô FL. Với các quan sát tương tự ở chuột mang locut β thu được độc lập, phát hiện của tác giả sáng chế đã chứng minh một đặc điểm đặc trưng của chuột mang locut β.

Phân tích tế bào đơn khẳng định hoạt động phân ly của locut β của người ở chuột

Để có thêm hiểu biết ở mức độ tế bào đơn, tác giả sáng chế sử dụng phương pháp lai *in situ* phát huỳnh quang ARN (PT-FISH) để đánh giá mức độ biểu hiện tương đối của gen globin nội sinh của người và chuột ở các giai đoạn khác nhau của quá trình phát sinh cá thể (Ragoczy, T., et al., 2006, Genes Dev. 20:1447-57; Trimborn, T., 1999, Genes Dev. 13:112-24). Đầu tiên, tác giả sáng chế đánh giá mức độ biểu hiện tương đối của gen γ- và β-globin của người (với α-globin của chuột là đối chứng) trong tế bào hồng cầu nguyên phát của phôi E 11.5 từ hai dòng chuyển gen độc

lập (A20 và A85). Phù hợp với các phân tích trước đây chỉ ra rằng quá trình biểu hiện ở mức độ cao của γ-globin ở giai đoạn hồng cầu nguyên phát ở chuột mang locut β, tác giả sáng chế đã ghi nhận mức độ biểu hiện tương đối cao của γ-globin bằng thử nghiệm PT-FISH, và mức độ biểu hiện thấp hoặc không biểu hiện β-globin của người (Fig.7A và 2B). Trong số các tế bào nguyên phát tuần hoàn ở giai đoạn muộn hơn của quá trình phát triển (E13.5), có thể thấy được một kiểu tương tự, mặc dù có thể thấy được là quá trình biểu hiện β-globin của người tăng lên và sự giảm toàn phần tỷ lệ phần trăm tế bào có tín hiệu PT-FISH (sử dụng α-globin của chuột là đối chứng), với chỉ một phần tế bào (khoảng 1/3) có các locut có hoạt tính phiên mã tại một thời điểm (Fig.7A và 7B). Ví dụ về các tế bào được sử dụng trong phân tích này được chỉ ra (không nêu số liệu). Một phát hiện thú vị với phân tích PT-FISH cho γ- và β-globin của người là mức độ đồng phiên mã, thể hiện sự đồng tồn tại của hai tín hiệu tín hiệu phiên mã sơ cấp trong cùng một locut gen (không nêu số liệu).

Phân tích quá trình đồng phiên mã bằng phân tích lai in situ phát huỳnh quan phiên mã sơ cấp (PT-FISH)

Quá trình đồng phiên mã được định nghĩa là sự có mặt đồng thời của hai tín hiệu phiên mã sơ cấp từ cùng một locut gen trong một tế bào. Đã quan sát được tần số đồng phiên mã cao trong phân tích này, đặc biệt là ở các giai đoạn khi ít gen γ-globin trưởng thành được biểu hiện. Trong các tế bào máu ngoại vi (tế bào tuần hoàn nguyên phát) lấy từ phôi vào ngày 13,5 (E13.5), 19% và 21% (lần lượt ở hai dòng A85 và A20) tế bào biểu hiện γ-globin cho thấy có quá trình đồng phiên mã β- globin (không nêu số liệu). Trong tế bào gan bào thai trong phôi E13.5, mức độ trùng lặp tăng rất nhanh, với 52% và 55% tế bào biểu hiện γ-globin có quá trình đồng phiên mã β-globin (không nêu số liệu). Bản chất của quá trình đồng phiên là chưa rõ ràng. Trước đây, cơ chế này đã được mô tả là một cơ chế chuyển đổi qua lại của vùng kiểm soát locut (LCR) với các gen globin xuôi dòng (Wijgerde, M., et al., 1995, Nature 377:209-13). Kết quả chỉ ra rằng các bản sao phiên mã sơ cấp có thể được tạo ra nhờ quá trình đồng phiên mã ngay cả khi không có quá trình phiên mã mạnh (như được chỉ ra đối với γ-globin trong tế bào FL trong E13.5). Vì PT-FISH bị hạn chế ở ảnh chụp đơn quá trình phiên mã, nên không rõ là liệu tốc độ phiên mã ở các locut được đồng phiên mã có tương đương nhau hay không. Phát hiện này chỉ rằng tốc độ và/hoặc hiệu quả ở các

locut được đồng phiên mã có khả năng là khác nhau và do đó sự có mặt của các bản sao phiên mã sơ cấp trong quá trình đồng phiên mã, có thể không phải là chỉ thị cho việc tổng hợp hiệu quả bản sao phiên mã trưởng thành.

So sánh εγ-globin với γ-globin trong phôi của chuột đã chỉ ra quá trình biểu hiện tương tự của gen trong phôi chuột với γ-globin ở tế bào tuần hoàn nguyên phát trong phôi E13.5 (Fig.7C và 7D). Phát hiện này chỉ ra rằng quá trình biểu hiện gen γ - globin song song với biểu hiện của gen giống β trong phôi chuột trong môi trường điều hòa ngoại phân tử của chuột. Tế bào FL từ E13.5 được phân tích theo cách tương tự, bằng cách đánh giá quá trình biểu hiện của εγ-globin của chuột và γ-globin của người bằng thử nghiệm PT-FISH ở các tế bào này. Chỉ có một tỷ lệ phần trăm nhỏ tế bào thể hiện đặc tính nhuộm đối với εγ hoặc γ-globin (Fig.7C và 7D), so với quá trình phiên mã mạnh β-globin của người ở cùng giai đoạn (Fig.7A và 7B). Phù hợp với các phân tích về quá trình phát triển trước đây ở chuột (Kingsley, P.D. et al., 2006, Blood, 107:1665-72; Trimborn, T., 1999, Genes Dev. 13:112-24), các tế bào dương tính đối với εγ chuột là các tế bào tuần hoàn nguyên phát có trong gan bào thai chuột. Tế bào dương tính với quá trình biểu hiện γ-globin của người cũng có khả năng là tế bào hồng cầu nguyên phát, và quan trọng là biết được rằng trong các tế bào này chỉ có một phần (khoảng 1/3) số locut là hoạt động tại một thời điểm bất kỳ, nhờ đó sẽ hạn chế mức độ đồng biểu hiện. Đáng chú ý là, 45% và 54% (lần lượt trong các dòng A85 và A20) số tế bào nguyên phát từ E13.5 (PBC) có bản sao phiên mã γ-globin thể hiện quá trình biểu hiện εγ-globin, phù hợp cho phát hiện rằng γ-globin hoạt động như một gen trong phôi trong môi trường tác động trans của chuột. Thú vị là, một phân tích trước đây về các gen chuyển có mức độ biểu hiện rất thấp không có trình tự điều hòa locut cơ bản, cho thấy rằng γ-globin thực sự hoạt động như một gen trong phôi, như các tác giả sáng chế đã chỉ ra đối với chuột chứa toàn bộ locut β của người được biểu hiện mạnh (Chada, K., et al., 1986, Nature 319:685-9).

BCL11A ức chế quá trình biểu hiện của globin giống β trong phôi chuột ở dòng tế bào nguyên phát

Từ các kết quả trên, có thể kết luận rằng môi trường điều hòa ngoại phân tử hồng cầu của chuột khác với của người, xét về khía cạnh thành phần hoặc quá trình điều hoà của các yếu tố điều hòa phiên mã cần thiết. Gần đây đã thấy rằng gen

BCL11A, mang các đột biến di truyền ảnh hưởng đến nồng độ HbF ở người (Uda, M. et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105:1620-5; Lettre, G. et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105:11869-74; Menzel, S. et al., 2007, Nat. Genet. 39:1197-9; Sedgewick, A.E. et al., 2008, Blood Cells Mol. Dis. 41:255-8), mã hoá chất ức chế đặc hiệu theo giai đoạn phát triển của gen γ-globin của người (Sankaran, V.G. et al., 2008, Science 322:1839-42). Các phát hiện trước đây chỉ giới hạn ở phân tích tế bào hồng cầu người, trong đó tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng các dạng BCL11A nguyên vẹn được biểu hiện mạnh trong nguyên bào hồng cầu tủy xương trưởng thành, ở nồng độ thấp hơn đáng kể trong FL, và không có trong nguyên bào hồng cầu nguyên phát. Hơn nữa, dạng đột biến ngắn hơn của BCL11A được biểu hiện trong nguyên bào hồng cầu trong FL và hồng cầu nguyên phát của người, cả hai loại tế bào đều biểu hiện γ -globin. Để đánh giá sự khác biệt có thể có giữa các loài trong quá trình biểu hiện protein BCL11A, tác giả sáng chế đã đánh giá tế bào hồng cầu của người và chuột ở cùng giai đoạn, được chọn lọc bằng FACS. Đáng chú ý là, việc so sánh quá trình biểu hiện BCL11A ở chuột và người cho thấy sự khác biệt rõ rệt (Fig.8A, Fig.11). Quá trình biểu hiện ARN BCL11A được đo bằng qRT-PCR trong tế bào ở cùng giai đoạn được chọn lọc (chọn lọc đối với CD71 và Ter-119) ở các giai đoạn phát triển khác nhau ở chuột chứng tỏ rằng ARN BCL11A được biểu hiện ở mức độ tương đương trong tất cả các tế bào chuột trưởng thành, nhưng không có hoặc được biểu hiện ở mức độ bị giảm đáng kể trong các tế bào nguyên phát (được chuẩn hóa thành GAPDH). Thứ nhất, ARN và protein BCL11A là không có trong tế bào hồng cầu nguyên phát của chuột. Thứ hai, dạng nguyên vẹn của BCL11A được biểu hiện ở các mức độ tương tự nhau trong tế bào hồng cầu trưởng thành trong cả các tế bào FL và tế bào tủy xương của chuột, trong khi đó không thể xác định được bất kỳ thể đột biến ngắn hơn nào ở những tế bào chuột này (Fig.8A). Ngoài ra, dạng đột biến ngắn có trong các giai đoạn phát triển sớm. Tất cả các tế bào của người được chọn lọc đối với quá trình biểu hiện CD235 và CD71. Ngược lại, trong tế bào chuột, có thể thấy quá trình biểu hiện protein BCL11A nguyên vẹn trong tất cả các tế bào gốc trưởng thành, gồm có tế bào hồng cầu trong gan bào thai và ở tủy xương có cùng giai đoạn trong phôi E13.5 (tất cả các tế bào được chọn lọc đối với Ter119+/CD71+). Không phát hiện được quá trình biểu hiện BCL11A trong tế bào nguyên phát của chuột. Kết quả này đã nhấn mạnh sự khác biệt

quan trọng giữa các loài có thể đóng vai trò trong việc gây ra quá trình điều hoà sự phân ly gen globin. Một mẫu hình dựa trên phát hiện về quá trình biểu hiện trong quá trình phát triển của gen globin giống β ở người, chuột, và chuột mang locut β được thể hiện, cùng với tóm tắt về quá trình biểu hiện BCL11A trong hai loài này (Fig.8B).

Tác giả sáng chế đã chứng minh rằng quá trình biểu hiện gen γ-globin người tương quan chặt chẽ với quá trình biểu hiện của gen trong phôi chuột, εγ và βh1, trong môi trường điều hòa ngoại phân tử của chuột. Hơn nữa, mẫu biểu hiện BCL11A cho thấy vai trò trong toàn bộ quá trình sinh tổng hợp hồng cầu bào thai ở chuột, ngược lại với vai trò chiếm ưu thế của nó ở giai đoạn sau sinh ở người. Do đó, có thể giả thiết rằng sự thay đổi trong quá trình biểu hiện BCL11A có thể có vai trò, ít nhất trong một phần, đối với quá trình biểu hiện phân ly giữa các loài của gen globin giống β. Để kiểm định trực tiếp vai trò với BCL11A trong việc làm bất hoạt gen trong phôi nội sinh trong dòng tế bào hồng cầu, chuột bị bất hoạt BCL11A được đánh giá. Như đã được mô tả (Liu, P. et al. 2003, Nat. Immunol. 4:525-32), chuột BCL11A -/- chết trong giai đoạn chu sinh không rõ nguyên nhân. Chuột BCL11A -/- ở các thời điểm E14.5 và E18.5 trong thai kỳ được xác định thời điểm nào quá trình sinh tổng hợp hồng cầu trưởng thành mạnh mẽ diễn ra trong FL (Fig.12). Bằng các phương pháp đánh giá kiểu hình và hình thái (Sankaran, V.G. et al., 2008, Genes Dev. 22:463-475; Zhang, J., et al., 2003, Blood, 102:3938-46), quá trình sinh tổng hợp hồng cầu có vẻ là bình thường trong các phôi này (Fig.9A, Fig.13 đến 15). Sau đó, quá trình biểu hiện gen globin của chuột được đánh giá. Rất phù hợp với giả thiết của tác giả sáng chế, có thể thấy rằng sự bất hoạt quá trình biểu hiện gen globin phôi chuột không xảy ra trong tế bào hồng cầu trong FL của phôi E14.5 và E18.5 (Fig.9B-E, Fig.16). Không có sự ức chế quá trình biểu hiện globin phôi ở dòng tế bào nguyên phát là không có. Quá trình biểu hiện của gen globin εγ và βh1 được điều hoà ngược lên tới 70 và 350 lần ở phôi E14.5 (Fig.9B). Ngoài ra, các gen globin trong phôi người chiếm khoảng 50% tổng số gen giống β trong giai đoạn này, so với 0,4% ở nhóm chứng. Trong phôi E18.5, trong khi mức độ đóng góp của các bản sao này vào tổng số bản sao phiên mã giống β có bị giảm đôi chút, thì số lượng bản sao globin εγ và βh1 vẫn tăng lên 2600 và 7600 lần so nhóm chứng (Fig.9C). Để đánh giá sự phân bố trong tế bào của globin phôi chuột, thử nghiệm nhuộm hóa mô miễn dịch được thực hiện. Bằng cách sử dụng phương pháp

này, tác giả sáng chế đã tìm ra rằng globin βh1 và εγ được biểu hiện mạnh mẽ trong tế bào hồng cầu trưởng thành (Fig.9D và 9E, Fig.17), trong khi đó bình thường các globin trong phôi này chỉ hoạt động ở dòng tế bào hồng cầu nguyên phát (McGrath, K. & Palis, J., 2008, Curr. Top. Dev. Biol. 82:1-22) (Fig.8B).

Bất hoạt quá trình biểu hiện γ-globin của người phụ thuộc vào BCL11A

Sau đó, tác giả sáng chế đánh giá hậu quả của sự mất BCL11A đối với quá trình điều hoà gen globin của người trên chuột mang locut β. Bằng cách cho gen chuyển mang locut β vào môi trường bất hoạt, tác giả sáng chế đã phát hiện được rằng khi không có BCL11A, quá trình bất hoạt theo giai đoạn phát triển gen của γ-globin bị suy giảm đáng kể trong dòng tế bào hồng cầu trưởng thành (Fig.9F, Fig.18). Ở chuột BCL11A -/-, +/, và chuột đối chứng, ARN γ-globin làn lượt chiếm 76%, 20%, và 0,24% ARN tổng số của gen giống β trong phôi E 18.5 (Fig.9F, Fig.18). Sự giảm bất hoạt gen γ-globin trong thể dị hợp BCL11A +/- là phù hợp với sự tương quan di truyền giữa BCL11A và nồng độ HbF và điều này đã mở rộng thêm phát hiện trước đây khi sử dụng phương pháp bất hoạt trong tế bào người (Sankaran, V.G. et al., 2008, Science 322:1839-42), phương pháp này cũng chỉ ra rằng BCL11A là yếu tố điều hòa định lượng của quá trình biểu hiện γ-globin. Thất bại trong việc gây bất hoạt gen γ-globin khi có quá trình sinh tổng hợp hồng cầu bình thường đã cung cấp các bằng chứng thuyết phục rằng BCL11A là yếu tố điều hòa chính trong quá trình chuyển đổi globin trong quá trình phát sinh cá thể của người và chuột.

Về cơ bản, BCL11A có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen globin một cách trực tiếp bằng cách tương tác với yếu tố điều hòa cis trong nhóm gen β-globin hoặc một cách gián tiếp bằng cách tác động đến chu trình tế bào hoặc các con đường khác tác động chủ yếu lên quá trình biểu hiện HbF. Để phân biệt các khả năng này, thử nghiệm kết tủa miễn dịch nhiễm sắc (ChIP) được sử dụng để đánh giá các tế bào tạo hồng cầu nguyên phát của người. Sự liên kết với đoạn khởi đầu gần của γ- hoặc β-globin được phát hiện. Nói cách khác, đã phát hiện được sự liên kết chặt ở một số vùng khác nhau của nhóm gen β-globin (Fig.19). Các vùng này bao gồm vị trí tăng mẫn cảm thứ ba (HS3) của vùng kiểm soát locut (LCR) (P. A. Navas et al., 1998, Mol. Cell. Biol. 18:4188), vùng ngược dòng loại bỏ Corfu đi kèm với HbF của gen δ-globin (A. Bank, 2006, Blood 107:435), và vùng xuôi dòng khác của gen Aγ-globin thường bị

loại bỏ trong một số dạng duy trì hemoglobin bào thai do di truyền (A. Bank, 2006, Blood 107:435). Đặc biệt cần chú ý là tất cả các yếu tố điều hòa cis này đã được cho là đóng vai trò trong việc bất hoạt γ-globin. Kết quả này khẳng định rằng BCL11A hoạt động trong nhóm gen β-globin. Các thể đột biến BCL11A ngắn hơn có trong các tế bào biểu hiện hoạt tính γ-globin có thể tham gia vào các khía cạnh khác nhau của quá trình điều hoà phiên mã trong nhóm gen β-globin. Do đó, BCL11A, ở các nồng độ và biến thể khác nhau, sẽ cấu hình lại locut β-globin ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

Kết luận

Tóm lại, các phát hiện ở đây chứng tỏ rằng những thay đổi trong quá trình biểu hiện của một yếu tố ngoại phân tử trong quá trình tiến hóa có thể dẫn đến sự biểu hiện gen sẽ bị biến đổi trong quá trình phát triển. Cũng thấy rằng các yếu tố điều hòa cis trong locut β-globin của người là không đủ để gây ra quá trình điều hoà trong quá trình phát triển ở chuột. Trước đây, đã được đề xuất là quá trình tiến hóa biểu hiện của gen globin giống β được xúc tác chủ yếu nhờ sự thay đổi yếu tố cis (Johnson, R.M. et al. 2006, Proc. Natl. Acad. Sci .U. S. A. 103:3186-91). Phát hiện ở đây khẳng định một cách thuyết phục rằng những thay đổi trong các yếu tố tác động trans có thể tạo ra tác dụng rõ rệt lên quá trình chuyển đổi gen trong quá trình phát triển. BCL11A có vai trò gây bất hoạt các gen trong phôi ở tế bào hồng cầu trưởng thành của chuột, trái ngược với vai trò của nó ở người, trong đó hợp chất này chỉ có vai trò bất hoạt quá trình biểu hiện γ-globin sau khi sinh. Hơn nữa, tác giả sáng chế chỉ ra rằng BCL11A là một yếu tố điều hòa mạnh đối với việc gây chuyển đổi globin phân ly giữa các loài chứng tỏ rằng gen γ-globin đã tránh được quá trình bất hoạt trong quá trình phát triển trong môi trường điều hòa ngoại phân tử BCL11A -/-. Phát hiện ở đây chỉ ra một mẫu hình trong đó một (hoặc nhiều) yếu tố gây bất hoạt điều hòa ngoại phân tử của gen globin trong phôi, ban đầu được biểu hiện trong toàn bộ quá trình sinh tổng hợp hồng cầu trưởng thành, đã bị biến đổi trong quá trình tiến hóa của linh trưởng, do đó quá trình biểu hiện của chúng được chuyển sang giai đoạn muộn hơn của quá trình sinh tổng hợp hồng cầu trưởng thành, tạo ra sự tiến hóa của giai đoạn biểu hiện hemoglobin bào thai độc nhất. Ở đây, đã được chỉ ra rằng BCL11A là một trong số nhiều yếu tố chính điều hòa quá trình chuyển đổi này. Các phát hiện theo sáng chế cũng làm đơn giản hóa mô hình phân tử giải thích cho sự chuyển trạng thái trong quá trình phát triển cần thiết này.

Sáng chế không chỉ đưa ra các hiểu biết mới về cách thức thay đổi trong quá trình biểu hiện gen xảy ra trong quá trình tiến hóa, mà còn đưa ra các dự đoán về cơ chế bổ sung của quá trình chuyển đổi từ hemoglobin bào thai thành hemoglobin trưởng thành, là quá trình có tầm quan trọng về mặt lâm sàng ở người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tăng nồng độ hemoglobin bào thai trong tế bào, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho nguyên bào tạo máu tiếp xúc với chế phẩm chứa chất ức chế quá trình biểu hiện BCL11A với lượng hữu hiệu, *ex vivo* hoặc *in vitro*, nhờ đó quá trình biểu hiện hemoglobin bào thai được tăng trong tế bào đó hoặc tế bào thế hệ sau của nó, so với tế bào trước khi cho tiếp xúc, và trong đó chất ức chế nêu trên là chất ức chế axit nucleic đặc hiệu với BCL11A để lai với trình tự axit nucleic của BCL11A.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nguyên bào tạo máu là tế bào thuộc dòng tế bào hồng cầu.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất ức chế axit nucleic đặc hiệu với BCL11A chứa tác nhân gây nhiễu ARN đặc hiệu với BCL11A có một hoặc nhiều trình tự nucleotit trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-6.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION

<120> PHƯƠNG PHÁP TĂNG NỒNG ĐỘ HEMOGLOBIN BÀO THAI TRONG TẾ BÀO

<130> 701039-062892-PCT

<140>
<141>

<150> 61/222,571
<151> 2009-07-02

<150> 61/097,017
<151> 2008-09-15

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 1
Gagcacaaac ggaaacaau
19

<210> 2
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 2
gccacaggau gacgauugu
19

<210> 3
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 3
gcacuuaagc aaacgggaa
19

<210> 4
<211> 19
<212> ARN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 4
acagaacacu cauggauua
19

<210> 5
<211> 58
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 5
ccggcgcaca gaacactcat ggattctcga gaatccatga gtgttctgtg cgtttttg
58

<210> 6
<211> 58
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 6
ccggccagag gatgacgatt gtttactcga gtaaacaatc gtcatcctct ggtttttg
58

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 7
gagaggcagc agcacatatc
20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 8
caggggtaaa caacgaggag
20

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 9
tggatgatct caagggcac
19

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 10
tcagtggtat ctggaggaca
20

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 11
ctgaggagaa gtctgccgtt a
21

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 12
agcatcagga gtggacagat
20

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 13
tggcctgtgg agtaaggtca a
21

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 14
gaagcagagg acaagttccc a
21

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 15

tggacaacct caaggagacc
20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 16
acctctgggg tgaattcctt
20

<210> 17
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 17
tttaacgatg gcctgaatca ctt
23

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 18
cagcacaatc acgatcatat tgc
23

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 19

aaccccagca cttaagcaaa
20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đoạn mồi tổng hợp

<400> 20
acaggtgaga aggtcgtggt
20

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<220>
<221> bazơ được biến đổi
<222> (3)..(21)
<223> a, c, g, t, không biết hoặc khác

<400> 21
aannnnnnnn nnnnnnnnnn ntt
23

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 22
Met Ser Arg Arg Lys Gln Gly Lys Pro Gln His Leu Ser Lys Arg Glu
1 5 10 15

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Ser Arg Arg Lys Gln Gly Lys Pro Gln His Leu Ser Lys Arg Glu

1 5 10 15

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 24
Met Ser Arg Arg Lys Gln Gly Asn Pro Gln His Leu Ser Gln Arg Glu
1 5 10 15

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 25
Met Ser Arg Arg Lys Gln Ser Asn Pro Arg Gln Ile Lys Arg Ser Leu
1 5 10 15

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 26
Met Ser Arg Arg Lys Gln Ala Lys Pro Arg Ser Leu Lys Asp Pro Asn
1 5 10 15

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 27
Met Ser Arg Arg Lys Gln Ala Lys Pro Arg Ser Val Lys Val Glu Glu
1 5 10 15

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 28
Met Ser Arg Arg Lys Gln Ala Lys Pro Gln His Phe Gln Ser Asp Pro
1 5 10 15

Fig. 1

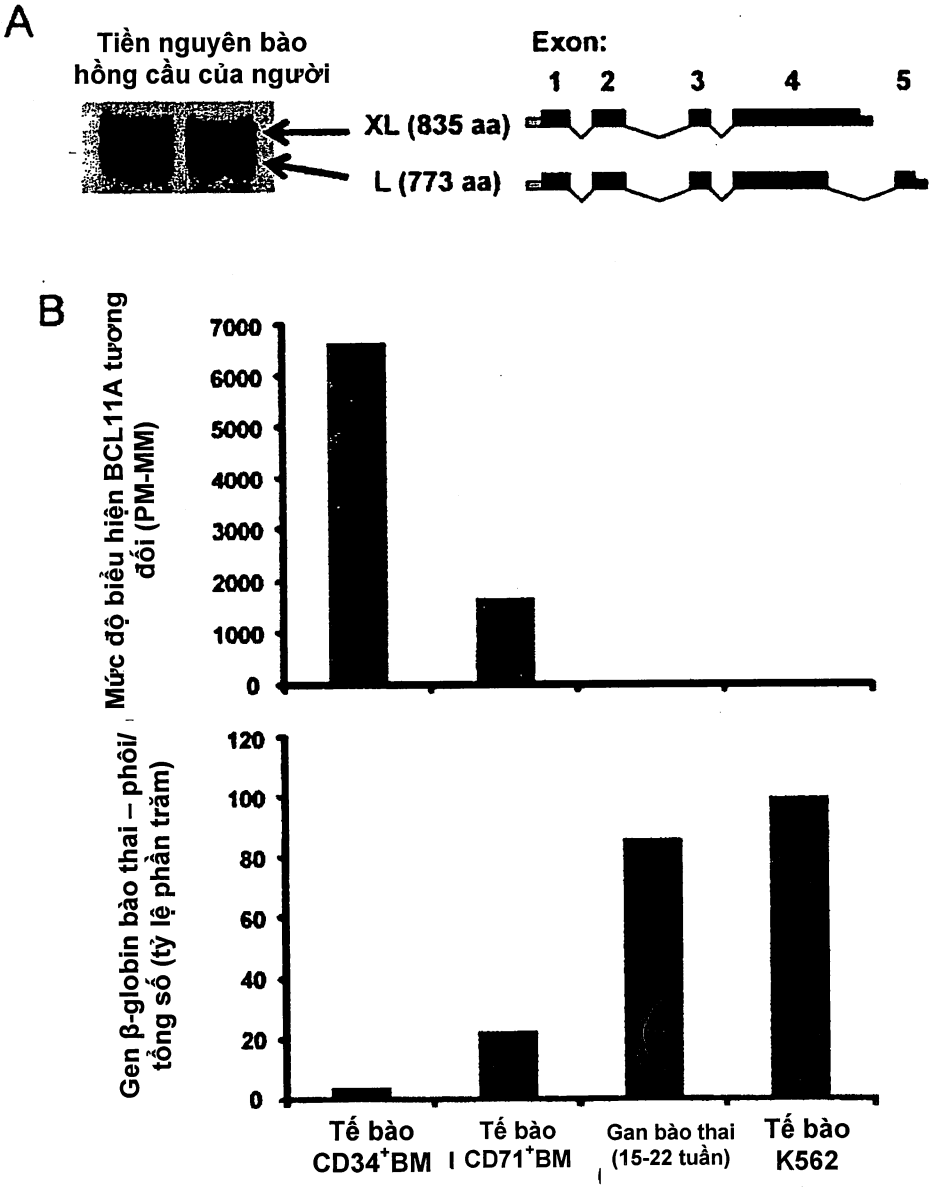
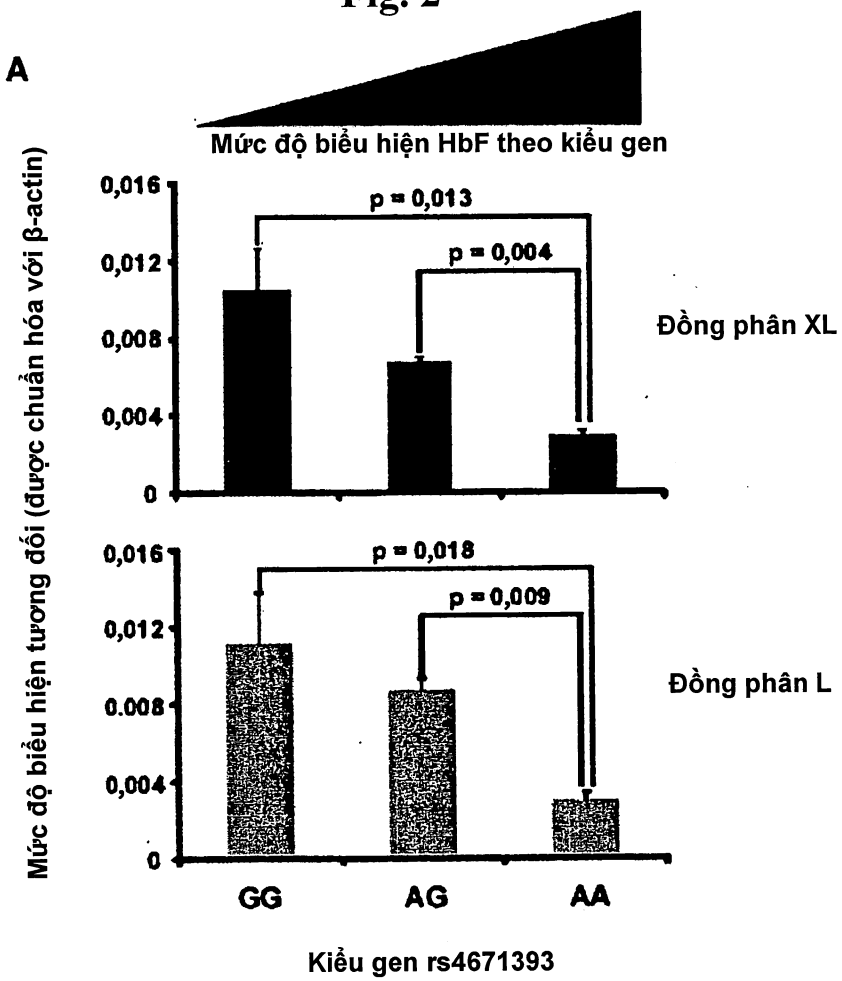

A
Tiền nguyên bào hồng cầu của người
Exon:
1 2 3 4 5
XL (835 aa)
L (773 aa)
B
Mức độ biểu hiện BCL11A tương đối (PM-MM)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Gen β-globin bào thai – phôi/ tổng số (tỷ lệ phần trăm)
120
100
80
60
40
20
0
Tế bào CD34+BM
Tế bào I CD71+BM
Gan bào thai (15-22 tuần)
Tế bào K562

Fig. 2


A
Mức độ biểu hiện HbF theo kiểu gen
Mức độ biểu hiện tương đối (được chuẩn hóa với β-actin)
0,016
0,012
0,008
0,004
0
p = 0,013
p = 0,004
Đồng phân XL
p = 0,018
p = 0,009
Đồng phân L
GG
AG
AA
Kiểu gen rs4671393

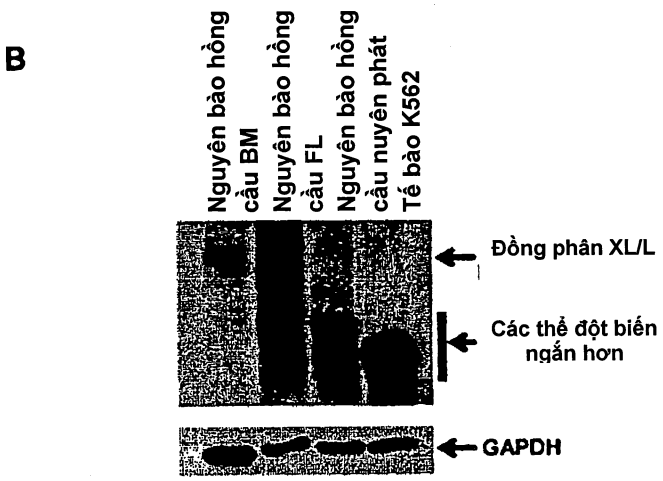
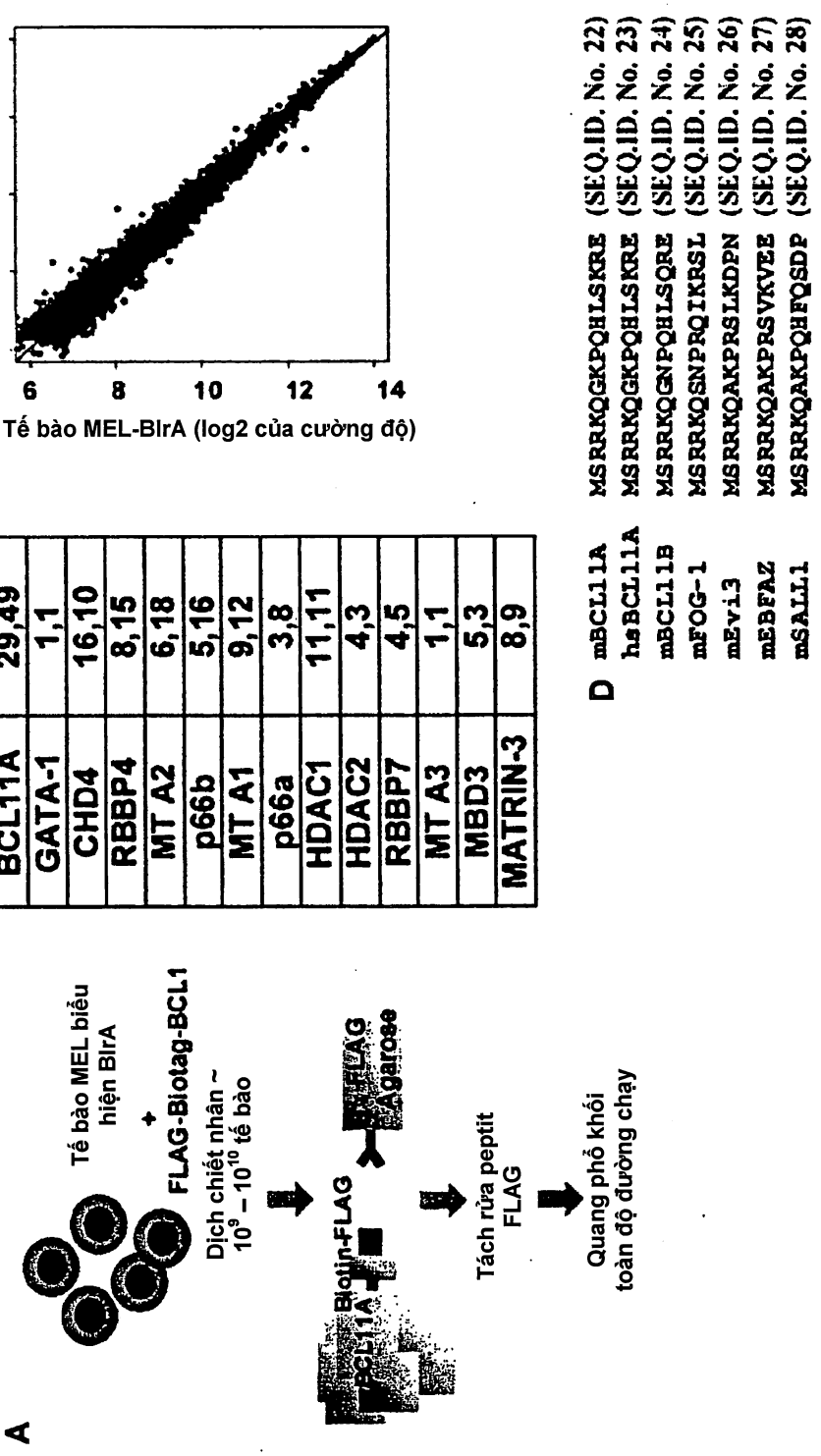

B
Nguyên bào hồng cầu BM
Nguyên bào hồng cầu FL
Nguyên bào hồng cầu nuyên phát
Tế bào K562
Đồng phân XL/L
Các thể đột biến ngắn hơn
GAPDH

Fig. 3



Protein	Peptit
BCL11A	29,49
GATA-1	1,1
CHD4	16,10
RBBP4	8,15
MT A2	6,18
p66b	5,16
MT A1	9,12
p66a	3,8
HDAC1	11,11
HDAC2	4,3
RBBP7	4,5
MT A3	1,1
MBD3	5,3
MATRIN-3	8,9

Fig. 4

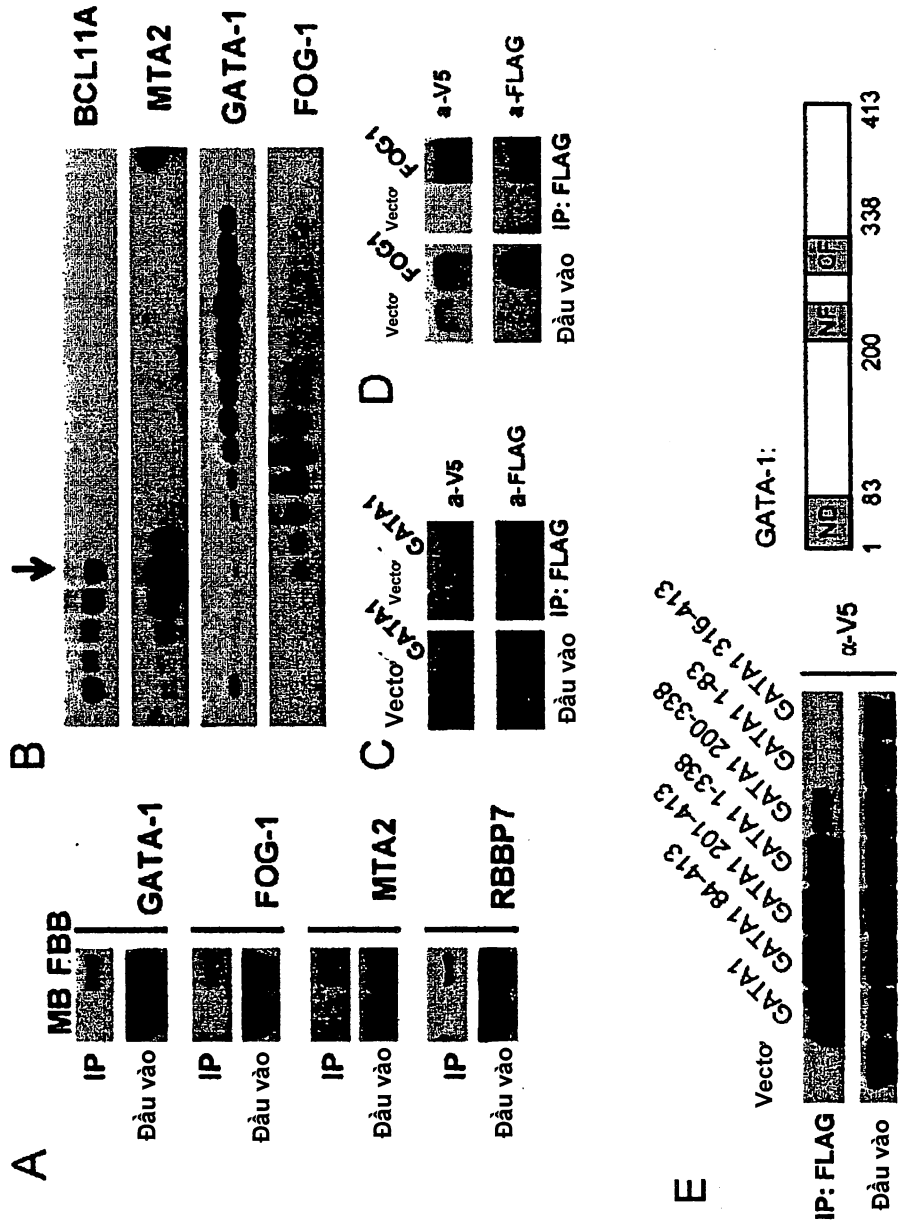

A
MB FBB
IP
Đầu vào
GATA-1
FOG-1
MTA2
RBBP7
B
BCL11A
MTA2
GATA-1
FOG-1
C
Vector
GATA1
a-V5
a-FLAG
Đầu vào
IP: FLAG
D
Vector
FOG1
a-V5
a-FLAG
Đầu vào
IP: FLAG
E
Vector
GATA1
GATA1 84-413
GATA1 201-413
GATA1 1-338
GATA1 200-338
GATA1 1-83
GATA1 316-413
IP: FLAG
Đầu vào
α-V5
GATA-1:
ND
NF
CF
1
83
200
338
413

Fig.5

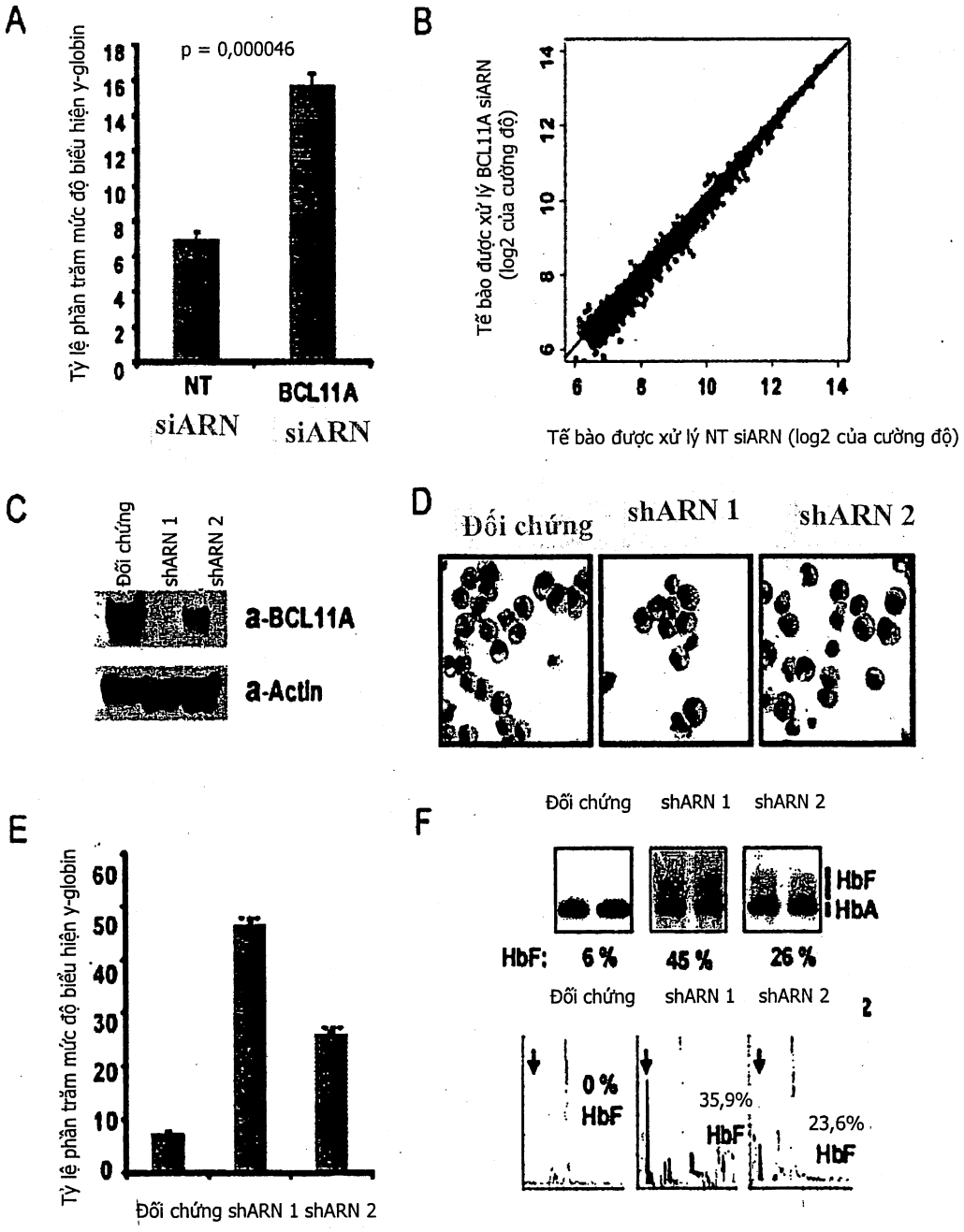

A
Tỷ lệ phần trăm mức độ biểu hiện γ-globin
p = 0,000046
NT siARN
BCL11A siARN
B
Tế bào được xử lý BCL11A siARN (log2 của cường độ)
Tế bào được xử lý NT siARN (log2 của cường độ)
C
Đối chứng
shARN 1
shARN 2
α-BCL11A
α-Actin
D
Đối chứng
shARN 1
shARN 2
E
Tỷ lệ phần trăm mức độ biểu hiện γ-globin
Đối chứng shARN 1 shARN 2
F
Đối chứng shARN 1 shARN 2
HbF
HbA
HbF: 6 % 45 % 26 %
Đối chứng shARN 1 shARN 2
0 % HbF
35,9% HbF
23,6% HbF

Fig. 6

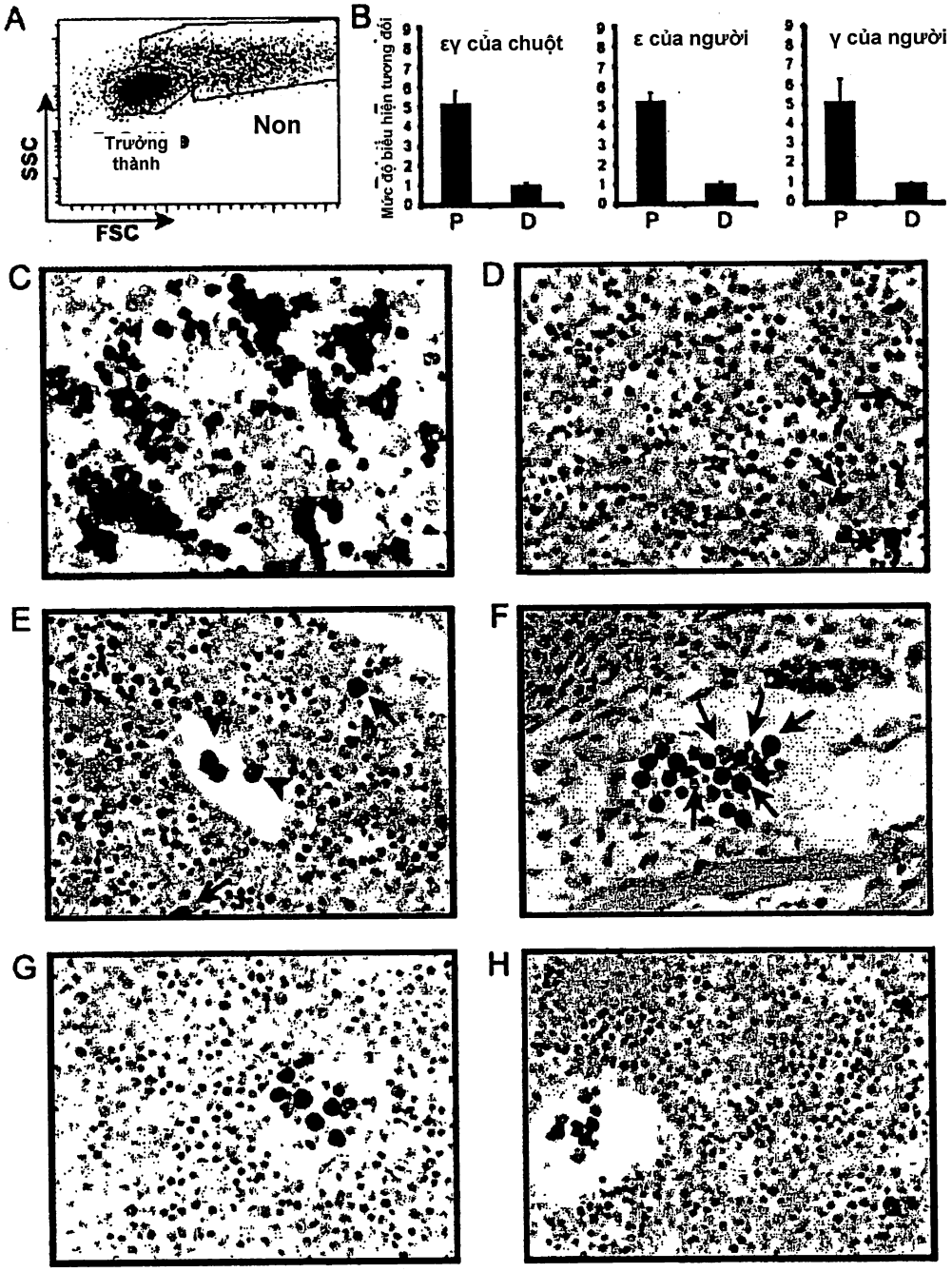

A
SSC
FSC
Trưởng thành
Non
B
Mức độ biểu hiện tương đối
εγ của chuột
ε của người
γ của người
P
D
C
D
E
F
G
H

Fig. 7

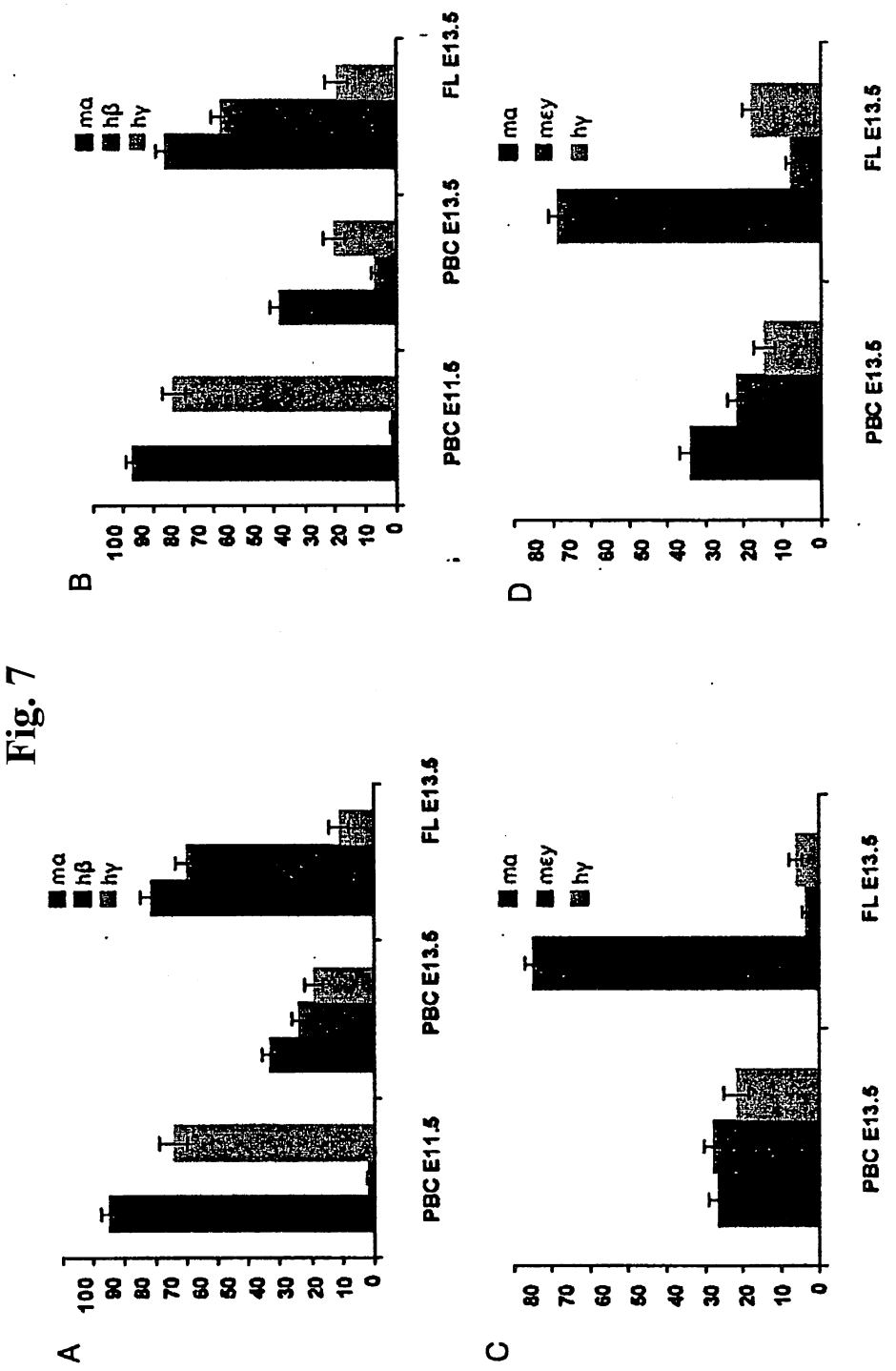
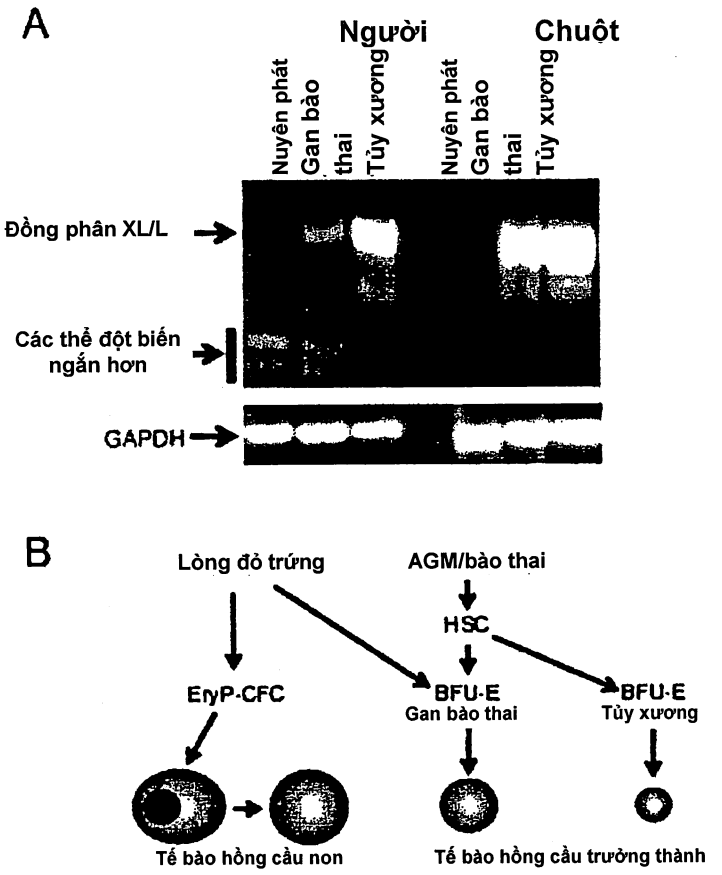

A
B
C
D
mα
hβ
hγ
mεγ
PBC E11.5
PBC E13.5
FL E13.5
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Fig. 8



Chuột	βh1, εy	βmaj, βmin	βmaj, βmin
Người	ε > γ	γ > β	β > γ
Chuột chuyển gen β-globin của người	γ > ε	β	β

Chuột — **BCL11A XL/L**

Người — **BCL11A XL/L**

Các thể đột biến BCL11A ngắn hơn

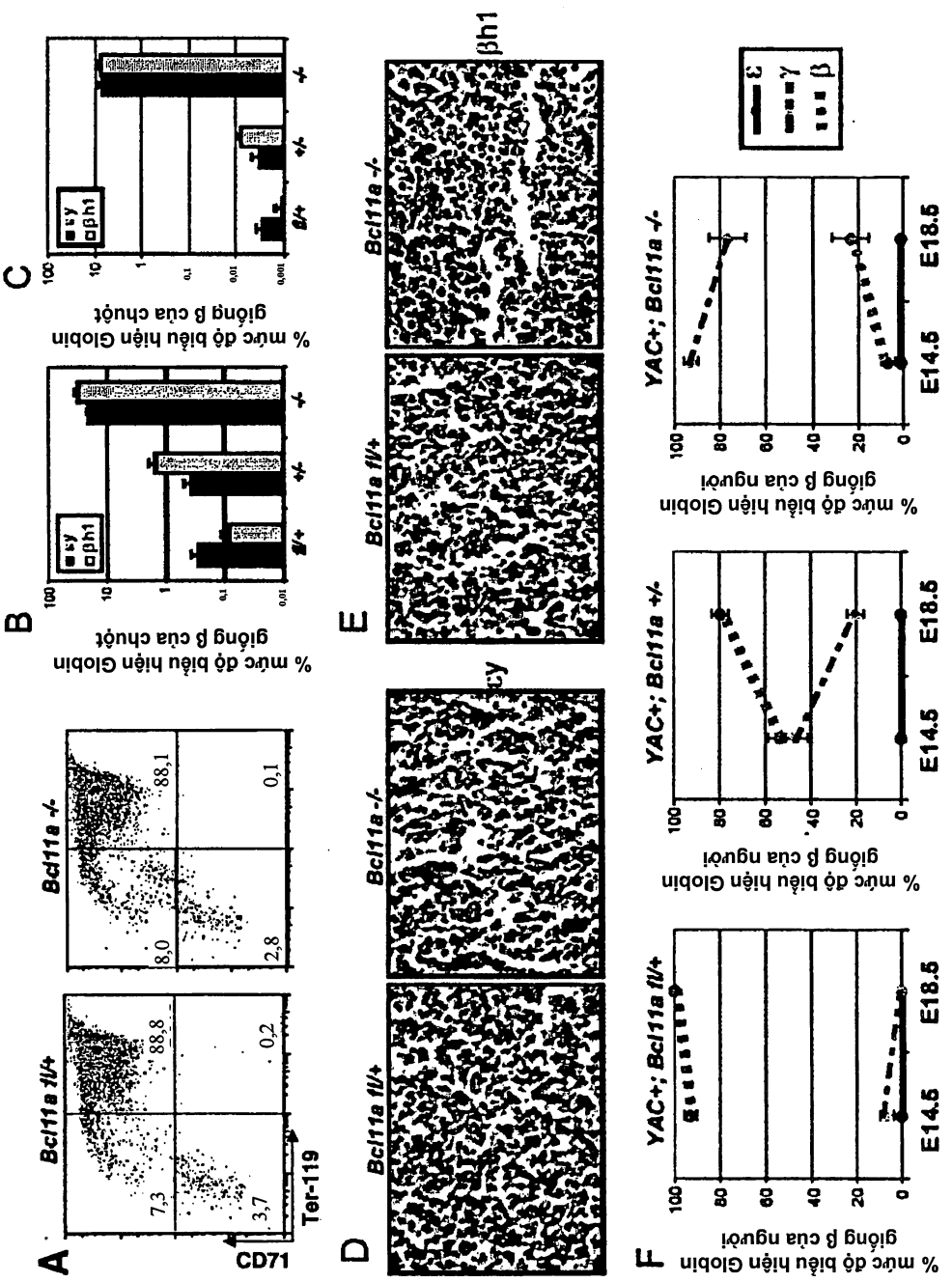

A
Bcl11a fl/+
Bcl11a -/-
88,8
7,3
3,7
0,2
88,1
8,0
2,8
0,1
CD71
Ter-119
B
% mức độ biểu hiện Globin giống β của chuột
εγ
βh1
C
% mức độ biểu hiện Globin giống β của chuột
D
Bcl11a fl/+
Bcl11a -/-
εγ
E
Bcl11a fl/+
Bcl11a -/-
βh1
F
% mức độ biểu hiện Globin giống β của người
YAC+; Bcl11a fl/+
YAC+; Bcl11a +/-
YAC+; Bcl11a -/-
E14.5
E18.5
ε
γ
β

Fig. 9

Fig. 10

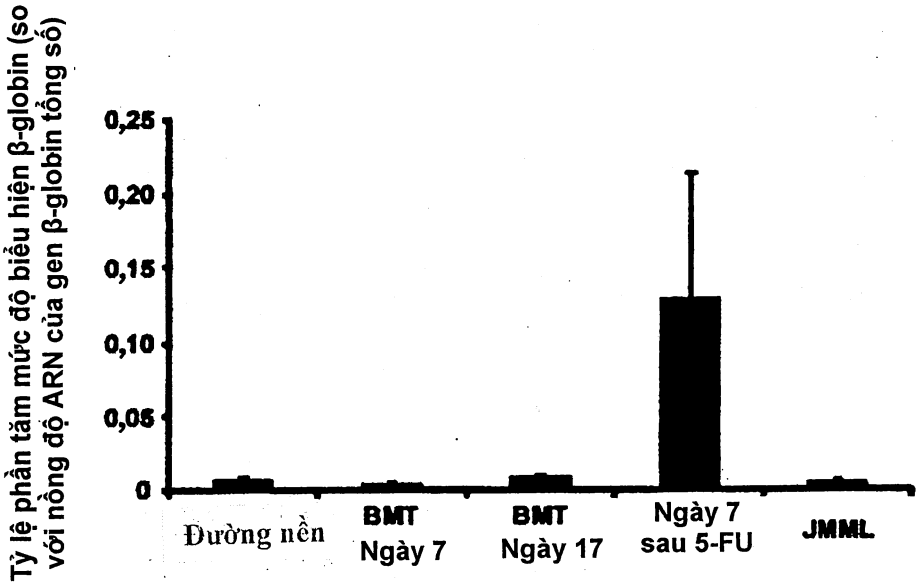

Tỷ lệ phần tăm mức độ biểu hiện β-globin (so với nồng độ ARN của gen β-globin tổng số)
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0
Đường nền
BMT Ngày 7
BMT Ngày 17
Ngày 7 sau 5-FU
JMML

Fig. 11

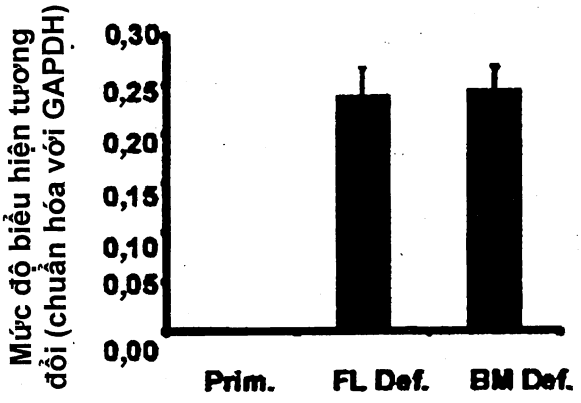

Mức độ biểu hiện tương đối (chuẩn hóa với GAPDH)
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Prim.
FL Def.
BM Def.

Fig. 12

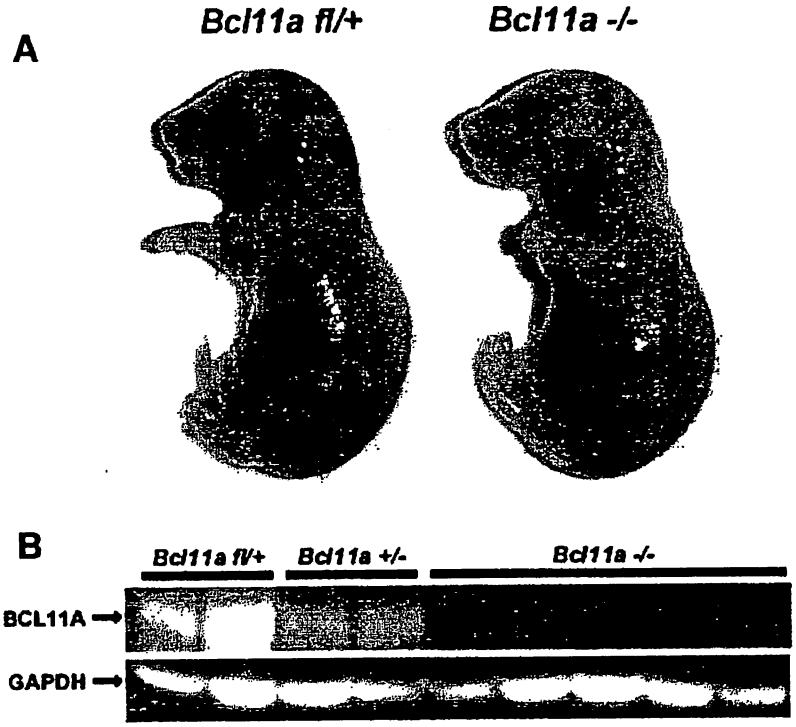

A
Bcl11a fl/+
Bcl11a -/-
B
Bcl11a fl/+
Bcl11a +/-
Bcl11a -/-
BCL11A
GAPDH

Fig. 13

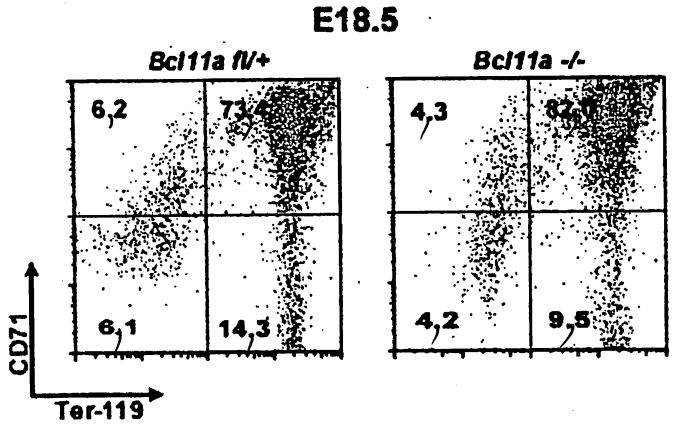

E18.5
Bcl11a fl/+
Bcl11a -/-
6,2
73,4
6,1
14,3
4,3
82,1
4,2
9,5
CD71
Ter-119

Fig. 14

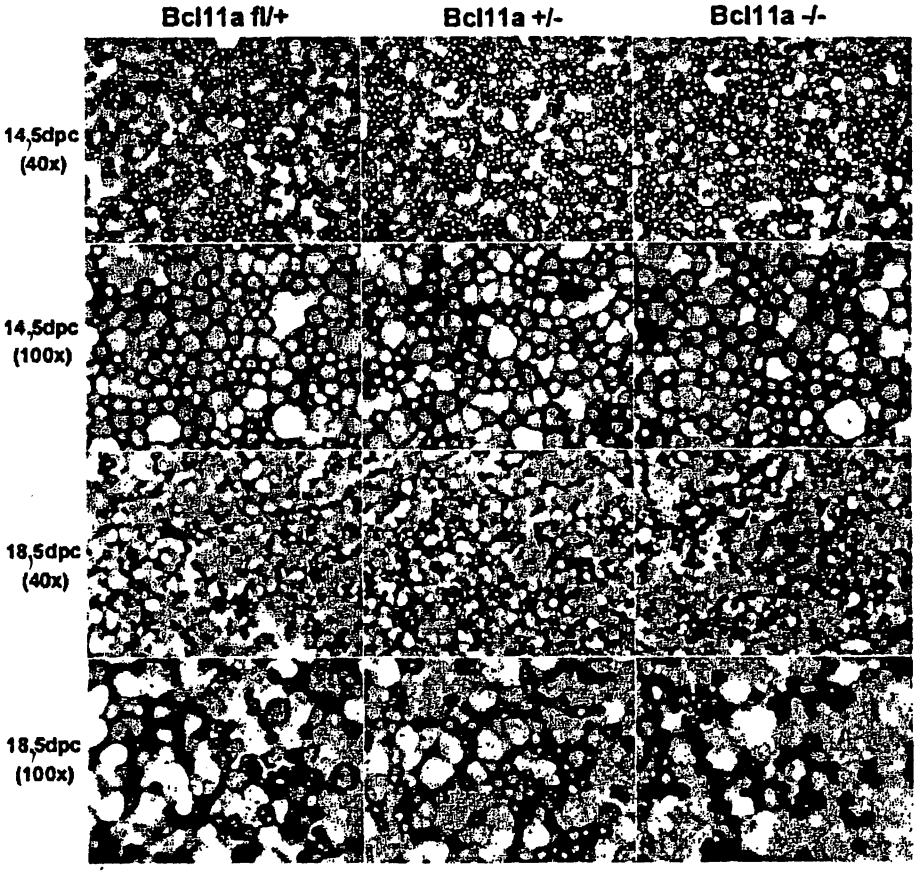

Bcl11a fl/+
Bcl11a +/-
Bcl11a -/-
14,5dpc (40x)
14,5dpc (100x)
18,5dpc (40x)
18,5dpc (100x)

Fig. 15

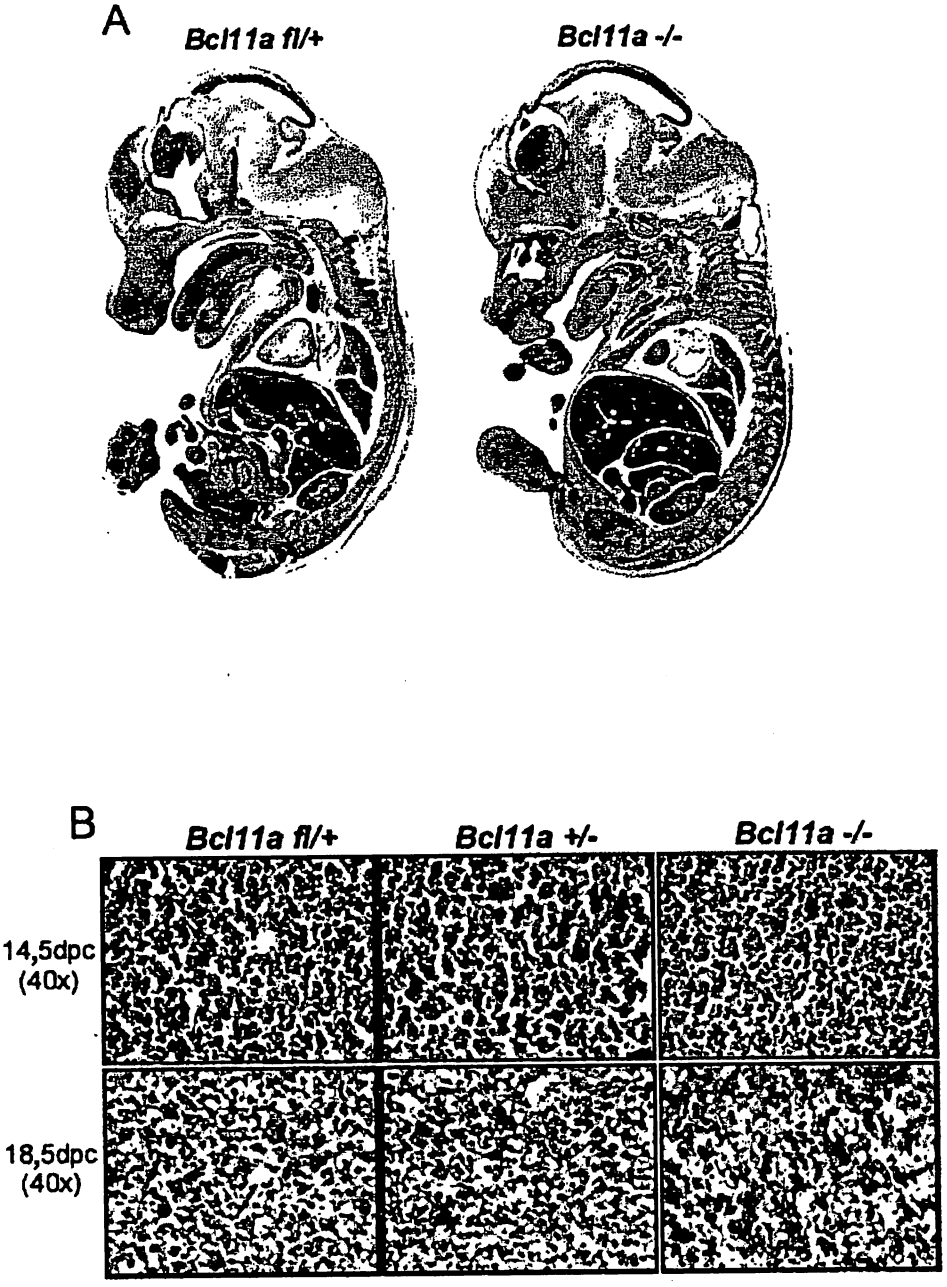

A
Bcl11a fl/+
Bcl11a -/-
B
Bcl11a fl/+
Bcl11a +/-
Bcl11a -/-
14,5dpc
(40x)
18,5dpc
(40x)

Fig. 16

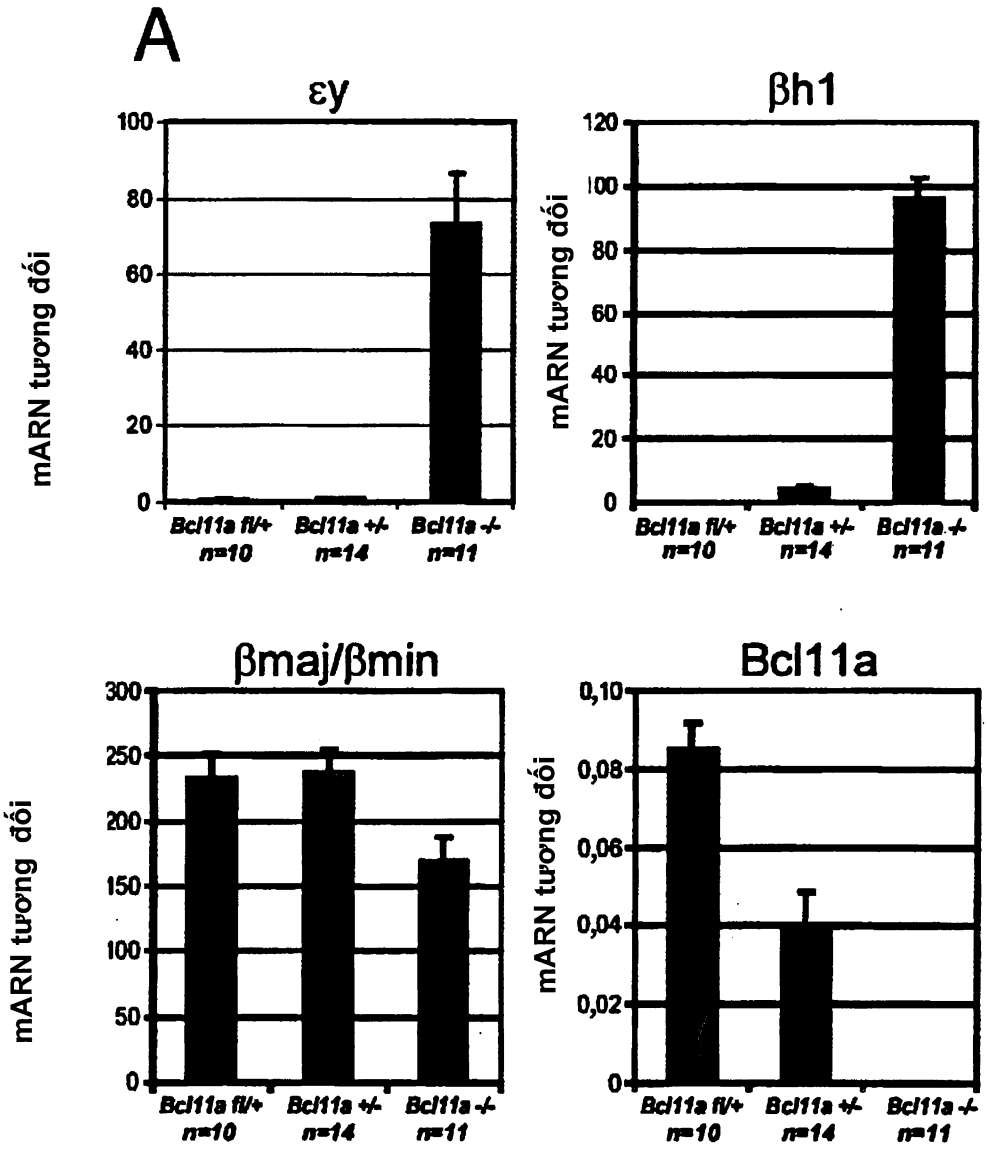
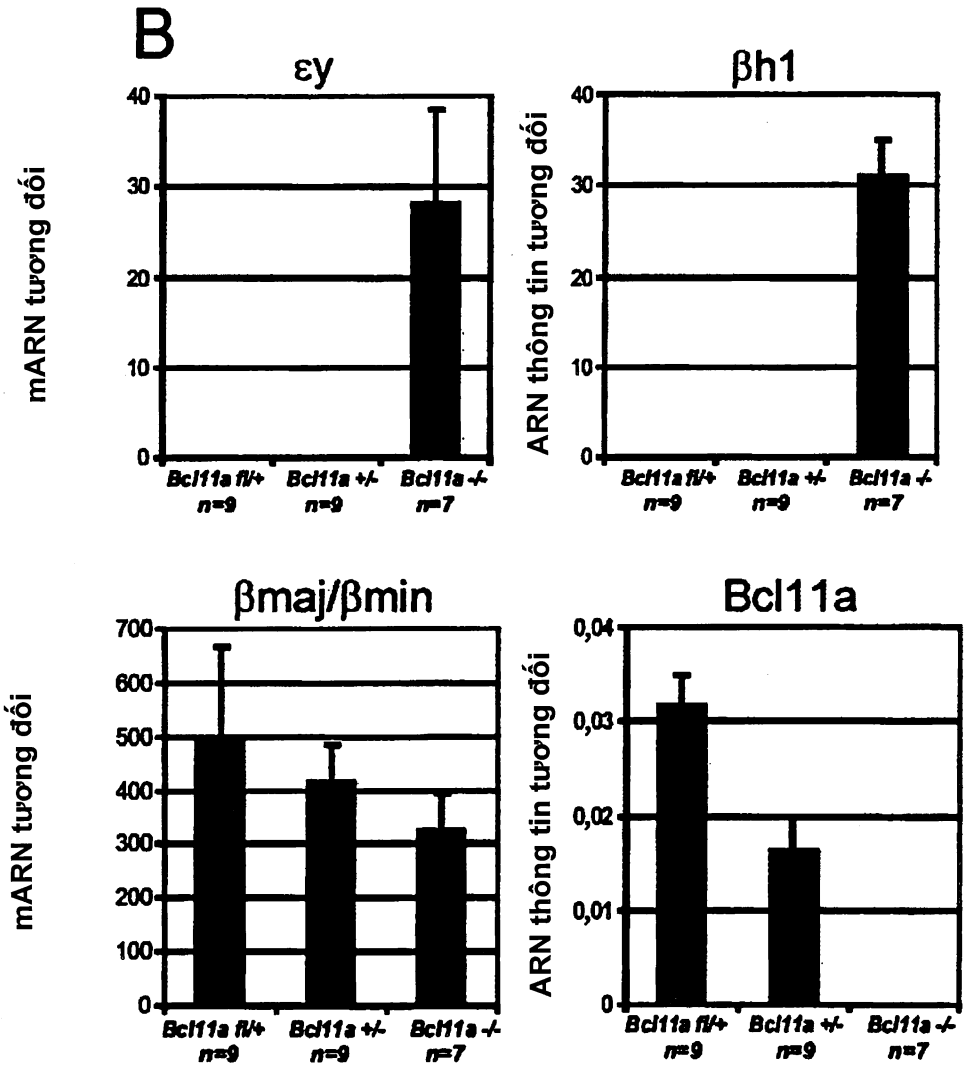

A
εy
βh1
βmaj/βmin
Bcl11a
mARN tương đối
Bcl11a fl/+ n=10
Bcl11a +/- n=14
Bcl11a -/- n=11

Fig. 16 (tiếp)


B
εy
βh1
mARN tương đối
ARN thông tin tương đối
40
30
20
10
0
Bcl11a fl/+ n=9
Bcl11a +/- n=9
Bcl11a -/- n=7
βmaj/βmin
Bcl11a
700
600
500
400
300
200
100
0
0,04
0,03
0,02
0,01

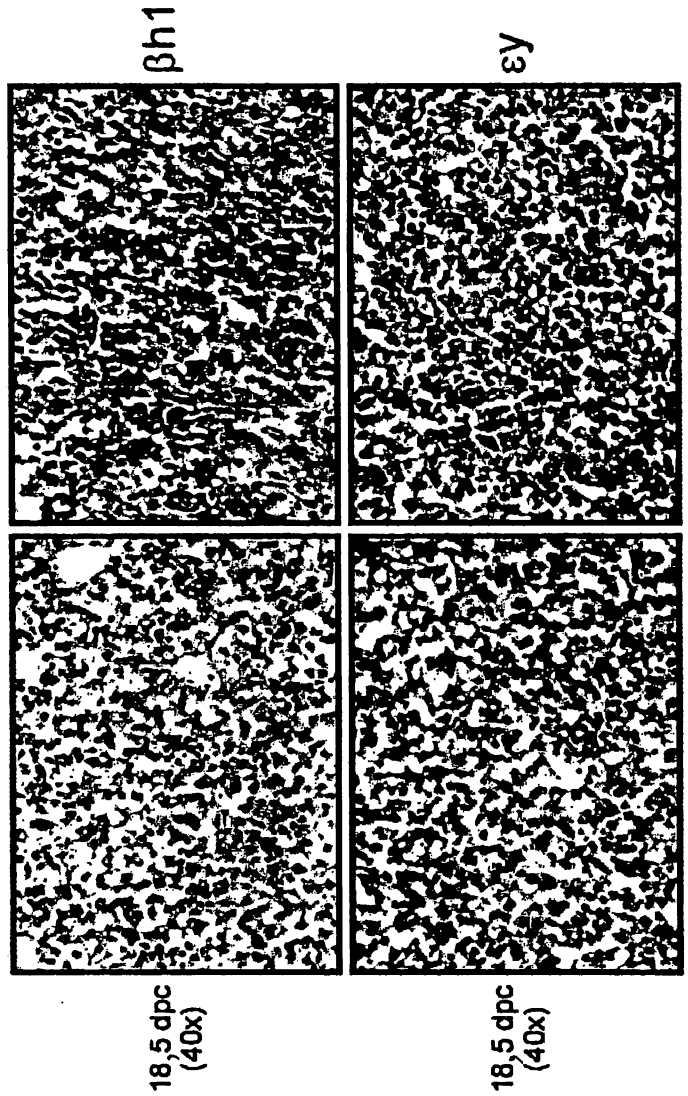


Fig. 17

Fig.18

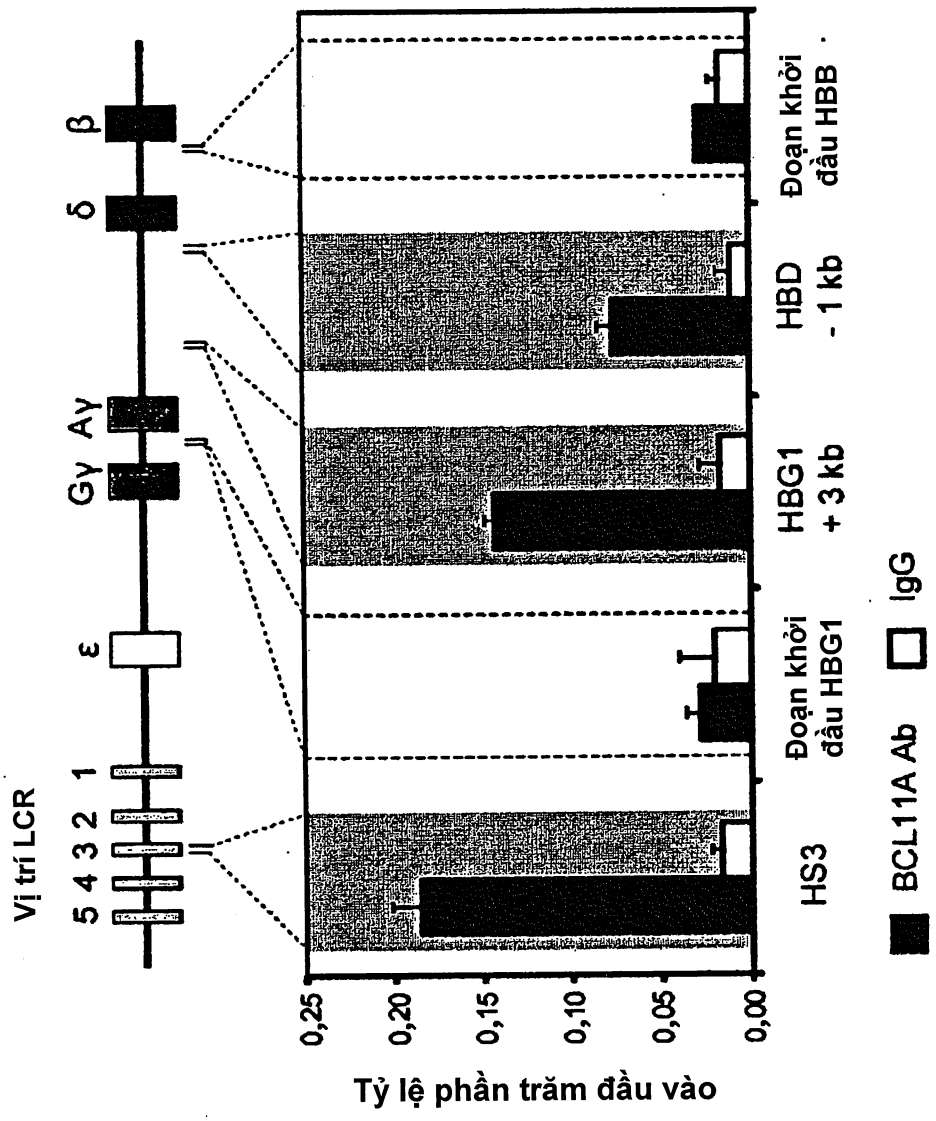
A

Gan bào thai E14.5		YAC+; Bcl11a fl/+ (n=4)	YAC+; Bcl11a +/- (n=6)	YAC+; Bcl11a -/- (n=4)
% mức độ biểu hiện Globin giống β của người	ε	0,022 ± 0,011	0,043 ± 0,026	0,37 ± 0,14
	γ	6,75 ± 2,84	46,39 ± 5,18	93,33 ± 2,91
	β	93,22 ± 2,83	53,56 ± 5,17	6,30 ± 3,03

B

E18.5 Fetal Liver		YAC+; Bcl11a fl/+ (n=4)	YAC+; Bcl11a +/- (n=7)	YAC+; Bcl11a -/- (n=4)
% mức độ biểu hiện Globin giống β của người	ε	0,003 ± 0,001	0,012 ± 0,005	0,35 ± 0,08
	γ	0,24 ± 0,05	20,36 ± 3,84	76,65 ± 8,35
	β	99,76 ± 0,05	79,63 ± 3,84	23,00 ± 8,36

Fig. 19


Vị trí LCR
5 4 3 2 1
ε
Gγ Aγ
δ
β
HS3
Đoạn khởi đầu HBG1
HBG1 + 3 kb
HBD - 1 kb
Đoạn khởi đầu HBB
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Tỷ lệ phần trăm đầu vào
BCL11A Ab
IgG