



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

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

(11)



1-0024324

(51)⁷ C12N 9/12; A61K 48/00; A61P 3/10; (13) B
C12N 15/63; C12N 15/86; A61K 38/45;
C12N 15/54

(21) 1-2011-02062 (22) 06/01/2010
(86) PCT/CN2010/070038 06/01/2010 (87) WO2010/078842 15/07/2010
(30) 200910000087.1 07/01/2009 CN
(45) 27/07/2020 388 (43) 30/01/2012 286A
(73) Yiyuan (Shenzhen) Biotech Limited (CN)
RM 202, Building A1, 140 Jinye Blvd, Kuiyong Subdistrict, Dapeng District,
Shenzhen, Guangdong province 518000, China
(72) HUANG Haidong (CN).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) GEN MÃ HÓA THỂ ĐỘT BIẾN GLUCOKINAZA CỦA NGƯỜI, THỂ ĐỘT BIẾN GLUCOKINAZA CỦA NGƯỜI, VECTƠ TÁI TỔ HỢP, VẬT CHỦ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ ĐỘT BIẾN GLUCOKINAZA CỦA NGƯỜI VÀ VECTƠ TÁI TỔ HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người. Gen này có trình tự nucleotit được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 và trình tự nucleotit trong đó vùng ORF mã hóa cùng trình tự axit amin như trình tự được mã hóa bởi vùng ORF (từ vị trí 487 đến 1884) có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và vùng còn lại giống như vùng không ORF có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2. Sáng chế cũng đề cập đến thể đột biến glucokinaza của người được mã hóa bởi gen, vectơ tái tổ hợp mang gen, vật chủ chứa vectơ, dược phẩm chứa chúng, ứng dụng chúng trong phương pháp điều trị và ngăn ngừa bệnh. Thể đột biến glucokinaza của người được mã hóa bởi gen có hoạt tính cao hơn so với hoạt tính của glucokinaza dạng đại của người, và do đó tạo ra phương pháp mới để kiểm soát mức glucoza huyết hoặc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat, đặc biệt là ngăn ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến gen mã hóa thể đột biến glucokinaza ở người, thể đột biến glucokinaza của người được biểu hiện bởi gen này, vector tái tổ hợp mang gen mã hóa thể đột biến glucokinaza ở người, vật chủ chứa vector tái tổ hợp này, được phẩm chứa một hoặc nhiều gen được chọn từ gen mã hóa thể đột biến glucokinaza ở người, thể đột biến glucokinaza của người, vector tái tổ hợp và vật chủ, gen mã hóa thể đột biến glucokinaza ở người, thể đột biến glucokinaza của người, vector tái tổ hợp và vật chủ dùng để bào chế thuốc kiểm soát glucoza huyết hoặc thuốc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat, gen mã hóa thể đột biến glucokinaza ở người, thể đột biến glucokinaza của người, vector tái tổ hợp và vật chủ dùng để bào chế thuốc ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường. Sáng chế cũng mô tả phương pháp kiểm soát glucoza huyết hoặc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa hydrat-cacbon bằng cách sử dụng chúng, và mô tả phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường bằng cách sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Glucokinaza (glucokinase - GK) là thành viên quan trọng của họ hexoza kinaza với hoạt tính sinh học cơ bản của nó là xúc tác cho quá trình phosphoryl hóa của glucoza. Gen mã hóa glucokinaza của người nằm ở phần ngắn của nhiễm sắc thể số 7 và chứa mười exon. GK chứa 465 axit amin, đặc biệt là có mặt ở tế bào gan trưởng thành và tế bào beta tiểu đảo, và có liên quan đến nhiều bước quan trọng trong quá trình chuyển hóa glyco và tiết insulin.

Hiện nay, đã thấy rằng cường độ tiết insulin *in vivo* đáp ứng tương ứng về mặt tỷ lệ với tốc độ chuyển hóa glucoza ở các tế bào beta insulin. Do đó, enzym kiểm soát tốc độ dòng chảy glucoza vào tế bào được xem như chất nhận diện glucoza điều hòa quá trình giải phóng insulin, và GK là chất nhận diện glucoza trong tế bào beta tiểu đảo. Khi được dịch chuyển vào tế bào beta thông qua chất vận chuyển 2, glucoza được phosphoryl hóa dưới tác động của glucokinaza và được đưa vào con đường phân hủy đường để thu được ATP với lượng tương ứng về mặt tỷ lệ với lượng glucoza được đưa vào tế bào beta; ATP có thể làm ngừng kênh ion kali trên màng huyết tương của tế bào beta, dẫn đến việc khử phân cực, lần lượt dẫn đến tạo ra dòng chảy ion canxi và cuối cùng là tiết insulin. Do hoạt tính của GK được kiểm soát trực tiếp hoặc gián tiếp bởi nồng độ glucoza trong máu, việc thay đổi tốc độ trao đổi chất đối với glucoza trong tế bào beta có thể làm điều hòa quá trình tiết insulin. Ngoài ra, do enzym cũng có thể kiểm soát nồng độ glucoza huyết bằng cách tạo điều kiện thuận lợi quá trình tổng hợp glycogen của gan và xúc tác quá trình chuyển hoá glucoza

thành glucoza-6-phosphat, sự bất thường của hoạt tính GK đóng vai trò quan trọng trong việc xuất hiện và phát triển chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat.

Một số nghiên cứu đã phát hiện ra rằng ở bệnh nhân và một số mô hình động vật (ví dụ, chuột) mắc bệnh đái tháo đường typ 2, hoạt tính GK ở tế bào gan của chuột mắc bệnh đái tháo đường typ 2 do chế độ ăn có lượng chất béo cao gây ra giảm được đáng kể so với mẫu kiểm chứng bình thường; nghiên cứu khác còn chứng minh được kết quả là việc tăng hoạt tính GK có thể làm giảm mức glucoza huyết đáng kể. Nghiên cứu này đã xác nhận sự thay đổi gen GK gắn liền chặt chẽ với sự khởi phát của nhóm phụ bệnh đái tháo đường typ 2, tức là bệnh đái tháo đường khởi phát sớm ở người trẻ (*maturity-onset diabetes of the young* - MODY), trong đó gen đột biến đóng vai trò quan trọng trong quá trình khởi phát của MODY.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích kỹ thuật đạt được bằng cách tạo ra gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người mà từ đó thể đột biến glucokinaza của người được biểu hiện với hoạt tính GK cao hơn so với hoạt tính GK của dạng đại, sao cho cách mới kiểm soát được glucoza huyết, điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat cũng như bệnh đái tháo đường, cụ thể là bệnh đái tháo đường typ 2.

Sáng chế đề xuất gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người, trong đó gen này có:

- (1) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2; hoặc
- (2) trình tự nucleotit đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 chỉ khác là khung đọc mở (open reading frame-ORF) nằm trong khoảng từ vị trí 487 đến 1884 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, và có ORF mã hóa cùng trình tự axit amin như được mã hóa bởi ORF của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2.

Trong giải pháp kỹ thuật đã biết thường tin rằng do đột biến sai nghĩa, đột biến vô nghĩa, và đột biến lệch khung ở các bazơ trong ORF của gen mã hóa protein có thể gây biến đổi cấu trúc cơ bản của trình tự axit amin của sản phẩm protein được mã hóa bởi gen, chỉ có đột biến xảy ra trong exon của gen mã hóa protein có thể dẫn đến những thay đổi tương đối rõ rệt về tính năng của sản phẩm protein. Hiện nay, chức năng đối với intron của gen mã hóa protein vẫn chưa rõ ràng, và nói chung, việc biến đổi trong intron khó có thể đạt được hiệu quả cần thiết đối với tính năng của sản phẩm protein. Tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng gen của thể đột biến glucokinaza của người có đột biến xảy ra trong vùng intron của gen glucokinaza dạng đại của người có thể biểu hiện thể đột biến glucokinaza của người có hoạt tính GK tăng đáng kể so với hoạt tính GK của dạng đại.

Sáng chế cũng đề xuất thể đột biến glucokinaza của người, trong đó gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người là gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vector tái tổ hợp bao gồm vector và gen đang quan

tâm chứa trên đó, trong đó gen đang quan tâm là gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vật chủ, trong đó vật chủ này chứa vector tái tổ hợp theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa tá được được dụng và một hoặc nhiều gen được chọn từ gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế.

Sáng chế cũng mô tả việc dùng gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế để bào chế thuốc kiểm soát mức glucoza huyết hoặc thuốc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat.

Sáng chế cũng mô tả việc dùng gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế để bào chế thuốc ngăn ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp kiểm soát mức glucoza huyết hoặc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat, trong đó tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân cần điều trị bệnh này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường, trong đó tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế được dùng cho bệnh nhân cần điều trị bệnh này.

Thể đột biến glucokinaza của người được biểu hiện bởi gen theo sáng chế có hoạt tính cao hơn đáng kể so với hoạt tính của dạng đại, do đó thu được phương tiện mới, hiệu quả để kiểm soát mức glucoza huyết hoặc để ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat, đặc biệt là bệnh đái tháo đường.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện ảnh chụp điện di thu được sau khi nối plasmit PIRE2-EGFP đã được tuyến tính hóa và gen đang quan tâm (Ví dụ 1).

Fig. 2 thể hiện đường cong về mối quan hệ hàm giữa đơn vị insulin (μ đơn vị/ml) trên trục X và số lượng 125 I trên trục Y.

Fig. 3 thể hiện biểu đồ thể hiện cấu trúc của vector plasmit pIRE2-EGFP.

Fig. 4 thể hiện ảnh chụp điện di để nhận diện các tế bào min6 đã chuyển nhiễm thành công với vector plasmit tái tổ hợp.

Fig. 5 thể hiện ảnh chụp từ kính hiển vi các tế bào min6 đã chuyển

nhiệm thành công với vector plasmit tái tổ hợp.

Fig. 6 thể hiện ảnh chụp điện di để nhận diện plasmit con thoi dạng vòng tái tổ hợp pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP hoặc plasmit con thoi dạng vòng tái tổ hợp pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP.

Fig. 7 thể hiện ảnh chụp điện di để nhận diện adenovirut tái tổ hợp pAd-GFP-G261 hoặc adenovirut tái tổ hợp pAd-GFP-G262.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người, trong đó gen này có:

(1) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2; hoặc

(2) trình tự nucleotit đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 chỉ khác là khung đọc mở (open reading frame-ORF) (ORF) nằm trong khoảng từ vị trí 487 đến 1884 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, và có ORF mã hóa cùng trình tự axit amin như được mã hóa bởi ORF của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2.

Tốt hơn là, gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2. Gen mã hóa glucokinaza của người có thể được tách ra từ bạch cầu của cơ thể người khỏe mạnh, có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 của trình tự được liệt kê, tức là gen dạng đại mã hóa glucokinaza của người (số truy nhập Genbank BC001890, M88011, NM033508, và NM033507). Trình tự nucleotit của gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế nêu trong SEQ ID NO: 2 có khuyết một bazơ C ở vị trí 2643 so với vị trí này của gen dạng đại.

Cần phải hiểu rằng người có hiểu biết trong lĩnh vực này có thể tổng hợp trình tự nucleotit khác nhau từ trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 trong khi mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, theo sự suy biến codon và xu hướng sử dụng codon ở các loài khác nhau. Nghĩa là, đây là trình tự nucleotit đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 chỉ khác là khung đọc mở (open reading frame-ORF) nằm trong khoảng từ vị trí 487 đến 1884 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, và có ORF mã hóa cùng trình tự axit amin như được mã hóa bởi ORF của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2.

Sáng chế cũng đề xuất thể đột biến glucokinaza của người, trong đó gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người là gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế.

Trong lĩnh vực này đã biết rằng trong số 20 loại axit amin khác nhau cấu thành nên protein, 18 loại axit amin khác nhau được mã hóa riêng biệt bằng từ 2 đến 6 codon, chỉ khác là Met (ATG) hoặc Trp (TGG) được mã hóa riêng biệt bằng một codon (xem, Appendix D trong Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 950). Nói cách khác, do codon mã hóa cho axit amin là nhiều hơn một trong hầu hết các trường hợp do sự suy biến codon về mặt di truyền và việc thay thế của nucleotit thứ ba trong codon bộ ba thường không dẫn đến việc

thay đổi thành phần axit amin, trình tự nucleotit mã hóa các protein với các trình tự axit amin đồng nhất có thể là khác nhau. Theo bảng codon đã biết, người có hiểu biết trong lĩnh vực này đã thu được trình tự nucleotit trên đây từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 được mô tả theo sáng chế, bằng các quy trình sinh học (ví dụ, các phương pháp dựa trên cơ sở PCR, phương pháp đột biến điểm) hoặc tổng hợp hóa học, và sử dụng chúng trong kỹ thuật tái tổ hợp và các phương pháp điều trị bằng gen, do đó tất cả các phần trình tự nucleotit này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, trình tự ADN được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, các phương pháp được mô tả bởi Sambrook và đồng tác giả (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), nhờ cải biến trình tự axit nucleic được đề xuất theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất vector tái tổ hợp bao gồm vector và gen đang quan tâm chứa trên đó, trong đó gen đang quan tâm là gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế.

Gen đang quan tâm cũng có thể bao gồm trình tự điều hòa, ví dụ, chất trợ xúc tác, gen kết thúc, và gen tăng cường cho sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen đang quan tâm. Gen đang quan tâm cũng có thể bao gồm gen đánh dấu (ví dụ, gen mã hóa β -galactosidaza, protein huỳnh quang xanh lá cây hoặc các protein huỳnh quang khác) hoặc gen có sản phẩm điều hòa sự biểu hiện của các gen khác. Ngoài ADN, gen đang quan tâm cũng có thể là ARN thông tin, ARN vận chuyển, hoặc ARN ribosom, và cũng có thể bao gồm trình tự điều hòa phiên mã liên quan thường được đi liền với phiên mã trình tự như, ví dụ, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, và yếu tố tăng cường xuôi dòng.

Vector có thể là các vector khác nhau có khả năng mang gen đang quan tâm thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này và các vector khác nhau có khả năng mang gen đang quan tâm có thể được dùng và cải tiến bằng phát triển công nghệ. Ví dụ, vector là các plasmid (ADN trần), liposom, thể tiếp hợp phân tử, polyme và virut.

Plasmid (ADN trần) có thể mang gen đang quan tâm, và plasmid mang gen đang quan tâm có thể được tiêm trực tiếp hoặc được đưa vào nhờ súng gen, kỹ thuật xung điện, và kỹ thuật dung hợp bằng điện vào các tế bào trong mô. Ngoài ra, sóng siêu âm tạo điều kiện thuận lợi trong việc làm tăng hiệu quả dịch chuyển đối với plasmid. Sóng siêu âm kết hợp với chất cản quang phản hồi bong bóng cực nhỏ có thể làm tăng độ thấm từ của màng huyết tương, nhờ đó làm tăng đáng kể hiệu quả dịch chuyển và biểu hiện đối với ADN trần. Do kỹ thuật thấm của màng huyết tương này có thể tạo ra tạm thời các lỗ trên bề mặt của màng huyết tương, ADN có cơ hội được đưa vào tế bào.

Liposom là giọt nhỏ chứa lá non có hai phân tử lipid và có thể làm trung gian cho việc đi vào của gen đang quan tâm qua màng huyết tương. Lipid có thể là phospholipid tự nhiên chiếm ưu thế trong lexitin (phosphatidylcholin, PC) và có nguồn gốc từ lòng đỏ trứng và đậu tương; cũng có thể là phospholipid tổng

hợp như dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), dipalmitoyl phosphatidyletanolamin (DPPE), distearoyl phosphatidylcholin (DSPC), và v.v.; và cũng có thể bao gồm cholesterol. Liposom được ưu tiên là liposom cation, chủ yếu tạo ra từ việc kết hợp lipid tích điện dương và lipid trung tính bổ trợ ở tỷ lệ mol đương lượng. Phức hợp có thể được tạo thành một cách hiệu quả giữa liposom tích điện dương và ADN tích điện âm, và được dịch chuyển vào các tế bào nhờ cơ chế nội bào.

Polyme là phức hợp polyme/ADN ổn định được tạo thành bằng cách trung hòa điện do gắn kết của các điện tích dương trên polyme cation (ví dụ, poly-L-lysine) với các điện tích âm trên ADN. Phức hợp thu được của polyme cation và ADN vẫn mang các điện tích dương, có thể gắn kết với thụ thể tích điện âm trên bề mặt của tế bào, và sau đó được đưa vào tế bào.

Thế tiếp hợp phân tử là thực thể trong đó gen ADN ngoại sinh đang quan tâm được liên kết cộng hóa trị trên phôi tử, kháng thể đơn dòng, hoặc protein vỏ virus với thụ thể đặc hiệu trên bề mặt tế bào và gen ngoại sinh được đưa vào dạng tế bào cụ thể nhờ đặc tính gắn kết đặc hiệu.

Do virus thường có thể đi vào dạng tế bào cụ thể với hiệu suất cao, biểu hiện chính các protein của nó, và sinh ra các virion mới, do đó virus được cải biến trước hết hoạt động như vector cho phép trị liệu bằng gen. Ví dụ, virus được đề cập có thể được tạo ra từ vector retrovirus, vector adenovirus, vector virus kết hợp adeno, vector virus gây bệnh mụn giộp, v.v. Trong số đó, virus kết hợp adeno thuộc nhóm không gây bệnh của họ Parvoviridae, có thể được tăng sinh riêng biệt phụ thuộc vào virus trợ giúp. Virus kết hợp adeno có bộ gen rất nhỏ. Ví dụ, virus kết hợp adeno typ 2 có bộ gen ADN sợi đơn chứa 4681 nucleotit, bao gồm hai gen, tức là gen rep (mã hóa các protein đáp ứng với điều hòa sao chép virus, biểu hiện của gen cấu trúc và xâm nhập vào bộ gen của vật chủ) và gen cap (mã hóa protein vỏ capsit cấu trúc), với một đoạn lặp đầu tận có chiều dài 145 bp có mặt ở một đầu mút của bộ gen. Virus kết hợp adeno có thể tác động đến các tế bào trong pha phân chia và trong pha tĩnh, được cài xen vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, hoặc được biểu hiện ổn định trong thời gian dài ở dạng ADN khảm ngoài nhiễm sắc thể. Nó có thể biến nạp một cách hiệu quả các dạng tế bào não, cơ xương, gan và v.v., và có các đặc tính như tính kháng nguyên, độc tính thấp, không gây bệnh, v.v.

Tốt hơn là, vector được chọn từ nhóm bao gồm vector tách dòng vô tính, vector biểu hiện tế bào nhân chuẩn, vector biểu hiện tế bào tiền nhân, và vector con thoi (ví dụ, plasmid con thoi pShuttle2) để thực hiện khuếch đại và biểu hiện của gen đang quan tâm. Khi được sử dụng trong phép trị liệu bằng gen, tốt hơn là vector biểu hiện cảm ứng được sử dụng, ví dụ, pIRES2-EGFP. Tốt hơn nữa là, vector được chọn từ nhóm bao gồm pIRES2-EGFP, pCMVp-NEO. BAN, pEGFT-Actin, và vector adenovirus. Vector được ưu tiên nhất là vector adenovirus. Adenovirus là virus không vỏ với bộ gen ADN sợi đơn, thẳng, tồn tại rộng rãi trong tự nhiên, và được phân loại thành ít nhất hơn 100 kiểu huyết thanh. Bộ gen adenovirus có chiều dài khoảng 36kb và có một đoạn lặp đầu tận đảo lần lượt ở một trong số cả hai đầu tận với virus đóng gói tín hiệu ở bên

trong. Có bốn đơn vị phiên mã sớm (E1, E2, E3, và E4) đáp ứng với quá trình điều hòa và một đơn vị phiên mã muộn đáp ứng với mã hóa các protein virus cấu trúc trong bộ gen adenovirus. Do vector cho phép trị liệu bằng gen, vector adenovirus có các ưu điểm sau 1) có khả năng đóng gói tương đối lớn đối với gen ngoại sinh, do đó có thể cài xen mảnh lớn của gen ngoại sinh, lên đến chiều dài 35kb; 2) có hiệu ứng gây nhiễm cao, do đó có thể biến nạp một cách hiệu quả nhiều dạng tế bào khác nhau trong mô của người với hiệu quả biến nạp thử nghiệm *in vitro* khoảng 100%; 3) có thể biến nạp các tế bào không phân chia; 4) thu được virus tái tổ hợp với hiệu giá cao trong môi trường nuôi cấy tế bào; 5) đi vào tế bào vật chủ mà không xâm nhập vào bộ gen của tế bào vật chủ và chỉ được biểu hiện tạm thời, do đó có tính an toàn tương đối cao. Dạng vector adenovirus mới nhất hiện có tất cả (vector không virus) hoặc hầu hết gen adenovirus (vector adenovirus nhỏ) bị khuyết đoạn, và chỉ có đoạn lặp đầu tận đầu và trình tự tín hiệu đóng gói được giữ lại, vì vậy gen có chiều dài lên đến 35kb có thể được cài xen vào vector, sinh ra đáp ứng miễn dịch tế bào yếu hơn bởi vector, vùng gắn kết cơ chất nhân được đưa vào vector có thể cho phép gen ngoại sinh được biểu hiện trong thời gian dài và làm tăng độ ổn định của vector.

Sáng chế cũng đề xuất vật chủ, trong đó vật chủ này bao gồm vector tái tổ hợp theo sáng chế. Một mặt, sự biến nạp của vật chủ với vector tái tổ hợp chứa gen mã hóa thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế có thể được sử dụng để nghiên cứu mối quan hệ giữa thể đột biến glucokinase của người và sự chuyển hóa glyco cũng như sự tiết insulin, mặt khác có thể được sử dụng để điều chế thể đột biến glucokinase có hoạt tính. Sẽ tốt hơn nếu vật chủ được chọn từ một hoặc nhiều *E. coli*, tế bào 239, tế bào min-6, và tế bào beta tiểu đảo của người. Trong số đó, *E. coli* là chủng được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền có thể bao gồm cả vector tách dòng vô tính tái tổ hợp theo sáng chế để thực hiện khuếch đại gen mã hóa thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế và bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế để thực hiện biểu hiện của thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế với lượng lớn. Khi vector tái tổ hợp là vector adenovirus tái tổ hợp, vector có thể được khuếch đại trong tế bào 239. Tế bào min-6 là chủng tế bào beta tiểu đảo của chuột nhắt có khả năng tiết insulin tương đối mạnh, và có thể đóng vai trò làm vật chủ cho vector biểu hiện tế bào nhân chuẩn theo sáng chế tạo ra thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế và hoạt tính GK thử nghiệm của chúng. Tế bào beta tiểu đảo của người có thể là dòng tế bào có bán trên thị trường và cũng là tế bào beta tiểu đảo của người của đối tượng, ví dụ, bệnh nhân bị bệnh đái tháo đường. Trong quá trình trị liệu bằng gen, sẽ tốt hơn nếu tế bào beta tiểu đảo của người từ chính đối tượng được cấy lại vào đối tượng sau khi được tải nạp bằng gen mã hóa thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế, để tránh sự đào thải miễn dịch sau đó.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa tá dược được dùng và một hoặc nhiều gen được chọn từ gen mã hóa thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinase của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế.

Tá dược được dùng dùng để chỉ chất độn không độc dạng rắn, bán rắn, hoặc lỏng, chất pha loãng, chất phủ hoặc các chất phụ trợ khác cho chế phẩm, ví dụ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước muối, dung dịch nước muối đậm, glucoza, nước, glyxerol, etanol, và hỗn hợp của chúng. Dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa, dưới lưỡi, trong khoang dịch não tủy, trong âm đạo, trong màng bụng, trong trực tràng, trong khoang miệng, hoặc qua biểu bì.

Đường dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm tiêm và truyền trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, trong ngực, dưới da, trong khớp. Dược phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm các dung dịch vô trùng dạng nước hoặc không nước, dạng phân tán, huyền phù hoặc nhũ tương, và bột được bào chế dưới dạng dược phẩm tiêm vô trùng hoặc phân tán ngay trước khi sử dụng. Chất mang nước hoặc không nước, chất pha loãng, dung môi hoặc các tá dược thích hợp bao gồm nước, etanol, glyxerol, propylen glycol, polyetylen glycol, carboxymetyl xenluloza, dầu thực vật và các este hữu cơ tiêm được như etyl oleat. Các chế phẩm này cũng có thể bao gồm chất bảo quản, chất thẩm ướt, chất nhũ hóa, các chất bảo vệ da và chất trợ phân tán, ví dụ, inositol, sorbitol, và sucroza. Tốt hơn là, bổ sung chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu như cacbon hydrat, natri clorua, và kali clorua.

Đường dùng qua biểu bì bao gồm đường dùng trên da, niêm mạc, và bề mặt của phổi và mắt. Dược phẩm này chứa bột tán nhỏ, thuốc mỡ, thuốc nhỏ, cao dán da, dụng cụ điện chuyển ion, dạng xông hít, v.v. Tốt hơn, nếu chế phẩm để dùng trong trực tràng hoặc trong âm đạo là viên thuốc đạn, có thể được bào chế bằng cách trộn vectơ tái tổ hợp theo sáng chế với các tá dược không kích thích thích hợp như bơ cacao, polyetylen glycol, hoặc nền sáp viên thuốc đạn, trong đó tá dược hoặc chất mang duy trì trạng thái rắn ở nhiệt độ trong phòng, và trở thành dạng lỏng ở nhiệt độ cơ thể, do đó tan chảy trong trực tràng hoặc âm đạo và giải phóng hoạt chất.

Tốt hơn, nếu dược phẩm là chế phẩm tiêm chứa tá dược được dùng và một hoặc nhiều gen được chọn từ gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế và vectơ tái tổ hợp theo sáng chế.

Tá dược được dùng này là dung dịch đậm phosphat với giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0; và trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} bản sao gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người hoặc trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} bản sao vectơ tái tổ hợp chứa trong một mililit dược phẩm tiêm.

Dược phẩm tiêm còn chứa chất bảo vệ và/hoặc chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu; chất bảo vệ chứa lượng trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng tính theo dược phẩm tiêm, chất bảo vệ là một hoặc nhiều chất được chọn từ inositol, sorbitol, và sucroza; hàm lượng chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu cho phép áp suất thẩm thấu của dược phẩm tiêm nằm trong khoảng từ 200 đến 700 mOsm/kg với chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu là natri clorua và/hoặc kali clorua.

Khi dược phẩm được dùng bằng cách tiêm, đối tượng được dùng dược phẩm tiêm chứa trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} bản sao, tốt hơn là trong khoảng

từ 10^5 đến 10^8 bản sao, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10^6 đến 10^8 bản sao của gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người; hoặc chứa trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} bản sao, tốt hơn là trong khoảng từ 10^5 đến 10^{10} bản sao, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10^6 đến 10^{10} bản sao vector tái tổ hợp; tốt hơn nữa nếu vector tái tổ hợp là vector adenovirut tái tổ hợp được dùng với lượng nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^{10} đơn vị tạo vết tan (plaque forming unit - pfu), tốt hơn là trong khoảng từ 10^5 đến 10^{10} pfu, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ 10^6 đến 10^{10} pfu. Khi được phẩm theo sáng chế được tiêm, liều lượng được phẩm tiêm có thể là liều lượng thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này, tối đa 500 μ l, thông thường là trong khoảng từ 1 đến 200 μ l, tốt hơn là trong khoảng từ 1 đến 10 μ l; tuy nhiên, liều lượng lên đến 10 ml cũng có thể được sử dụng tùy thuộc vào vị trí tiêm. Do người có hiểu biết trong lĩnh vực này có khả năng xác định một cách dễ dàng đường dùng thuốc và liều lượng tối ưu, các đường dùng và liều lượng trên đây chỉ nhằm tham khảo. Liều dùng có thể được xác định theo nhiều thông số khác nhau, đặc biệt là độ tuổi, thể trọng của người bệnh cần được điều trị, cũng như mức trầm trọng của bệnh, rối loạn, hoặc căn bệnh và đường dùng thuốc. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được tiêm nội hấp, và được phẩm theo sáng chế cũng có thể được tiêm vào vị trí khu trú (ví dụ, vào cơ xương).

Sáng chế cũng mô tả việc dùng gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế để bào chế thuốc kiểm soát mức glucoza huyết hoặc thuốc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat.

Sáng chế cũng mô tả việc dùng gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế để bào chế thuốc ngăn ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp kiểm soát mức glucoza huyết hoặc ngăn ngừa và điều trị chứng rối loạn chuyển hóa cacbon hydrat, trong đó tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế, được dùng cho bệnh nhân cần điều trị bệnh này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh đái tháo đường, trong đó tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, vector tái tổ hợp theo sáng chế, và vật chủ theo sáng chế, được dùng cho bệnh nhân cần điều trị bệnh này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau sẽ minh họa tiếp phần mô tả theo sáng chế, và không giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Tất cả các cải biến hoặc thay thế có thể được thực hiện với các phương pháp, các bước, hoặc các điều kiện theo

sáng chế mà không vượt quá phạm vi và bản chất của sáng chế, tất cả đều nằm trong phạm vi của sáng chế. Phương tiện kỹ thuật được sử dụng trong các ví dụ là các phương tiện thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, trừ khi có quy định khác. Tất cả các chất phản ứng và môi trường nuôi cấy được sử dụng trong sáng chế là các sản phẩm có bán trên thị trường, trừ khi có quy định khác.

Ví dụ 1: Tổng hợp hóa học gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người (G262) theo sáng chế

Gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, có chiều dài đầy đủ là 2748 bps. Sau khi phân tích trình tự, đã thấy rằng có ba vị trí giới hạn khác thường, *HindIII*, *SacI*, và *BamHI*, nằm lần lượt ở các vị trí 2443, 1327, và 2250 của SEQ ID NO: 2. Phương pháp tổng hợp như sau: tổng hợp một phần các mảnh ADN tương ứng bằng cách sử dụng phương pháp phosphoramidit trieste pha rắn, nối các mảnh đã được tổng hợp, giải trình tự và kiểm tra gen đã được nối, và sửa chữa vị trí nối đã bị lỗi, trong đó các bước chi tiết như sau:

1. Một mảnh A có tổng chiều dài 1360 bps nằm trong khoảng từ đầu tận 5' đến vị trí giới hạn *Sac I* của gen được tổng hợp;
2. Từ việc giải trình tự và nhận diện đã cho thấy toàn bộ mảnh A thu được từ bước 1, toàn bộ mảnh này được tiến hành cải biến cuối và sau đó nối giữa các vị trí *HindIII/SacI* của vector PCR2. 1 (Invitrogen, Co.);
3. Mảnh B có tổng chiều dài 939 bps nằm trong khoảng từ vị trí giới hạn *SacI* đến vị trí giới hạn *BamHI* của gen được tổng hợp;
4. Từ việc giải trình tự và nhận diện đã cho thấy toàn bộ mảnh B thu được từ bước 3, toàn bộ mảnh này được tiến hành cải biến cuối và sau đó nối giữa các vị trí *BamHI/SacI* của vector PCR2. 1;
5. Mảnh C có tổng chiều dài 551 bps nằm trong khoảng từ vị trí giới hạn *BamHI* đến đầu tận 3' của gen được tổng hợp;
6. Từ việc giải trình tự và nhận diện đã cho thấy toàn bộ mảnh C thu được từ bước 5, toàn bộ mảnh này được nối vào vector chứa mảnh B, dẫn đến việc thu được mảnh D có tổng chiều dài 1457 bps.
7. Từ việc giải trình tự và nhận diện đã cho thấy toàn bộ mảnh D thu được từ bước 6. Các mảnh A và D đã nối được cắt bằng enzym giới hạn *SacI* để thu được các mảnh ADN có đầu dính liền, phản ứng nối ADN được thực hiện trong đó bao gồm T4 ADN polymeaza. Cuối cùng, thu được gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2. Tất cả các enzym và dung dịch đệm được sử dụng được mua từ Clontech, Co. và việc nối và cắt giới hạn được thực hiện theo quy trình do Clontech, Co cung cấp.

Do có một số trình tự bảo vệ ở tất cả các đầu tận của các mảnh đã được tổng hợp để tạo điều kiện thuận lợi cải biến cuối của mảnh sau khi được tổng hợp, do đó độ dài của trình tự đã được tổng hợp dài hơn một chút so với chiều dài thực tế. Trình tự bảo vệ dùng để chỉ trình tự bảo vệ có từ 8 đến 20 bazơ được bổ sung nhân tạo vào phía vị trí giới hạn đầu tận có mặt ở phần cuối của

ADN để loại trừ việc mất khả năng của enzym giới hạn để gắn kết thông thường và phân cắt ADN ở vị trí giới hạn khi có cản trở về mặt không gian, trình tự bazơ bảo vệ do Clontech Co., nhà sản xuất các enzym giới hạn, cung cấp. Đối với các sợi ADN sẽ bị suy biến trước tiên từ vị trí đầu tận của nó, sự có mặt của các bazơ bảo vệ có thể bảo vệ vị trí giới hạn tránh bị phá hủy trong quá trình thực hiện thao tác. Sự cải biến dùng để chỉ quy trình trong đó mảnh ADN được cắt bằng enzym bằng enzym giới hạn để loại bỏ các bazơ bảo vệ. Enzym giới hạn và T4 ligaza đã sử dụng cũng như các dung dịch đệm phản ứng và hệ thử nghiệm được sử dụng đều do Clontech Co cung cấp, việc hướng dẫn về các sản phẩm tương ứng và quy trình vận hành chuẩn của chúng được cung cấp tại website của công ty.

Trình tự gen được nối đúng ở bước 7 được khuếch đại bằng PCR, và giải trình tự dẫn đến gen có trình tự phù hợp với SEQ ID NO: 2. Gen thu được được bảo quản ở -20°C để nối vào vector biểu hiện.

Ví dụ so sánh 1: Tạo ra gen mã hóa glucokinaza dạng đại của người (G261)

Gen mã hóa glucokinaza dạng đại của người được tạo ra theo trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 dựa vào quy trình trong Ví dụ 1.

Ví dụ 2: Cấu trúc của vector biểu hiện

1-1) tuyển tính hóa vector plasmit pIRES2-EGFP

Plasmit pIRES2-EGFP là cấu trúc vòng (xem trong Fig. 3) và cần được tuyển tính hóa trước khi chuyển nhiễm vào các tế bào. Enzym giới hạn BstBI (TTCGAA) (New England Biolabs, NEB Co.) được chọn, do enzym này có giới hạn duy nhất ở plasmit và do đó việc cắt giới hạn không gây ảnh hưởng đến sự biểu hiện protein. IRSE nghĩa là vị trí đi vào ribosom bên trong khác biệt ở chỗ, khi IRSE có mặt sau ORF, trình tự ghi mã khác tiếp theo IRSE được dịch mã sau khi dịch mã ORF đã được kết thúc. Do đó, hai gen mã hóa protein riêng biệt có ORF độc lập được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp.

ADN plasmit pIRES2-EGFP	10 µg
Dung dịch đệm cắt giới hạn	5 µl
Enzym giới hạn	10 đơn vị
Nước đã được khử ion	bổ sung vào hệ đến 50µl

được ủ ở 37°C trong 3 giờ, được đưa vào chiết phenol/clorofom để thu được ADN tổng, kết tủa bằng etanol khan để thu được viên ADN. Viên ADN này được rửa bằng etanol 70% và được hòa tan lại trong nước đã được khử ion. Thực hiện điện di gel agarosa 1,2% để dò khối lượng phân tử của plasmit và tính chế vector plasmit pIRES2-EGFP đã được tuyển tính hóa. Plasmit đã được tính chế được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

1-2) Nối plasmit pIRES2-EGFP đã được tuyển tính hóa và gen đang quan tâm

Vector plasmit pIRES2-EGFP tuyển tính đã được thu hồi	0,3µg
ADN của gen đang quan tâm	3µg
(trong Ví dụ 1 hoặc Ví dụ so sánh 1)	

T4 ligaza	10 đơn vị
Dung dịch đệm nối	1,0 µl
Nước đã được khử ion	bổ sung vào hệ đến 10 µl

được ủ ở 14°C trong 12 giờ, được đưa vào chiết phenol/clorofom để thu được ADN tổng, được kết tủa bằng etanol khan để thu được viên ADN. Viên ADN được rửa bằng etanol 70% và được hòa tan lại trong nước đã được khử ion. Khối lượng phân tử của plasmit được nhận diện bằng điện di (xem Fig. 1 về kết quả điện di của Ví dụ 1, trong đó dải 1 là kết quả điện di cho ADN tổng đã được nối của Ví dụ 1, dải 2 là gen đánh dấu kích thước khối lượng phân tử, và dải có khối lượng phân tử lớn hơn 5000 trong dải 1 là dải đã nối thành công) và vector plasmit pIRES2-EGFP mang gen đang quan tâm (trong Ví dụ 1 hoặc Ví dụ so sánh) được tinh chế riêng rẽ và được thu hồi. Plasmit đã được tinh chế được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Enzym giới hạn và T4 ligaza được sử dụng cũng như phản ứng dung dịch đệm và hệ thử nghiệm được sử dụng đều do NEB Co cung cấp, và thao tác vận hành theo hướng dẫn về các sản phẩm tương ứng và quy trình vận hành chuẩn của chúng.

2) Cấu trúc của vector adenovirut biểu hiện

2-1) Serotyp adenovirut của người 5 và adenovirut bị khuyết E1/E3 được chọn trong Ví dụ để cấu trúc vector plasmit con thoi tái tổ hợp theo các bước sau:

- a) cung cấp plasmit con thoi pShuttle2-CMV (BD Co.) (CMV biểu thị virut xytomegalo);
- b) cắt hai lần plasmit ở bước a) bằng các enzym giới hạn *EcoRV* + *NotI*;
- c) khử phosphoryl hoá cuối bằng kiềm phosphataza ruột bê (CIP);
- d) thu hồi mảnh vector có chiều dài 3,4kb;
- e) cắt hai lần vector plasmit pIRES2-EGFP thu được trong các bước 1-2 trên đây bằng các enzym giới hạn *EcoRV*+*NotI*, và G262-IRES2-EGFP hoặc thu được G261-IRES2-EGFP bằng cách cắt giới hạn được nối lần lượt vào mảnh vector con thoi plasmit thu được ở bước d) khi có mặt T4 ligaza, do đó sinh ra plasmit con thoi dạng vòng tái tổ hợp pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP hoặc plasmit con thoi dạng vòng tái tổ hợp pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP;
- f) cắt các plasmit con thoi thu được ở bước e) bằng enzym giới hạn *NheI*,
- g) nạp vào các đầu tận được phân giải bằng enzym ở bước f) mảnh Klenow của ADN polymeaza I;
- h) thu hồi mảnh có chiều dài 4,1 kb (mảnh này là mảnh ADN mà gen ngoại sinh được cài xen vào và có một phần trình tự từ vector được nằm ở cả hai đầu tận).

2-2) nhận diện plasmit con thoi dạng vòng pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP hoặc plasmit con thoi dạng vòng pShuttle2-CMV-G261-IRES2-

EGFP thu được.

Plasmit con thoi dạng vòng pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP hoặc pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP được phân giải bằng enzym *EcoRI*. Sản phẩm thu được bằng việc cắt bằng enzym giới hạn được nhận diện bằng điện di gel agarosa 1,2%; Dòng vô tính dương thu được hai dải có khối lượng phân tử lần lượt là 4,7kb và 2,8kb, trong khi dòng vô tính âm thu được một dải chỉ có khối lượng phân tử là 3,4kb. Kết quả nhận diện được thể hiện trên Fig. 6, trong đó M là gen đánh dấu kích cỡ khối lượng phân tử (các dải trong thang 1kb ADN từ đỉnh đến đáy lần lượt là 8kb, 7kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1,6kb, 1kb, 517bp, 396bp, và 230bp), các dải 1-4 (hai mẫu của pShuttle2-CMV-G261-IRES2-EGFP và hai mẫu của pShuttle2-CMV-G262-IRES2-EGFP) đều đại diện cho dòng vô tính dương.

2-3) CMV-GFP-IRES-GFP được chuyển nhiễm từ pShuttleGFP-CMV-TrkC vào vector adenovirut pAd, sinh ra plasmit adenovirut tái tổ hợp pAd-GFP-G261 hoặc pAd-GFP-G262. Tất cả các plasmit trống được sử dụng trên đây là các vector có bán thị trường được mua từ Clontech Co. (<http://www.Clontech.com>), và các điều kiện thử nghiệm và kit được sử dụng đều là kit có bán trên thị trường. Kit được sử dụng trong sự chuyển nhiễm là hệ biểu hiện Adeno-X 1 từ Clontech (Clontech 631513), và sự chuyển nhiễm được thực hiện theo quy trình thử nghiệm do Clontech Co cung cấp.

2-4) Nhận diện các plasmit adenovirut tái tổ hợp pAd-GFP-G261 và pAd-GFP-G262

Việc cắt giới hạn bằng *XhoI* được thực hiện lần lượt trên các plasmit adenovirut tái tổ hợp pAd-GFP-G261 và pAd-GFP-G262. Sản phẩm thu được bằng cắt giới hạn được nhận diện trên điện di gel agarosa 1,2%; dòng vô tính dương thu được các dải có lần lượt khối lượng phân tử 14kb, 11,8kb, 4,9kb, 2,6kb, 2,47kb, 1,45kb, và 0,6kb, trong khi dòng vô tính âm thu được các dải có lần lượt khối lượng phân tử 14kb, 11,8kb, 4kb, 2,47kb, 1,45kb, và 0,6kb. Kết quả nhận diện được thể hiện trên Fig. 7, trong đó M là gen đánh dấu kích thước khối lượng phân tử (các dải trong thang 1kb ADN từ đỉnh đến đáy lần lượt là 8kb, 7kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1,6kb, 1kb, 517bp, 396bp, và 230bp), các dải 1-5 (hai mẫu của adenovirut tái tổ hợp plasmit pAd-GFP-G261 và ba mẫu của adenovirut tái tổ hợp plasmit pAd-GFP-G262) đều đại diện cho dòng vô tính dương.

2-5) Đóng gói, khuếch đại, thu hoạch và tinh chế adenovirut tái tổ hợp

ADN adenovirut tái tổ hợp được nhận diện chính xác ở bước 2-4) được chuyển nhiễm vào tế bào 239 được đóng gói và sau đó virus gốc được bảo quản. Adenovirut đã được đóng gói, được khuếch đại và sau đó virus gốc được bảo quản (virus gốc thứ cấp). Ngoài ra, virus gốc thứ cấp đã được khuếch đại được khuếch đại thành hai vòng quy mô lớn. Sau khi hoàn thành khuếch đại, virus được thu hoạch và được ly tâm gradien-tỷ trọng CsCl để tinh chế, và CsCl cần trong dung dịch virus được loại bỏ bằng cách thẩm tách.

Thao tác thực hiện chi tiết như sau:

a) gieo mầm 293 tế bào (tế bào thận của phôi người được biến nạp

E1) vào một hoặc hai đĩa môi trường nuôi cấy tế bào (60mm) 24 h trước khi chuyển nhiễm, và sinh trưởng đến tốc độ hợp lưu nằm trong khoảng từ 50 đến 70% khi được chuyển nhiễm;

b) trước khi chuyển nhiễm, phân giải plasmit đang quan tâm bằng enzym bằng Pac I (6µg ADN cho mỗi 60 mm đĩa môi trường nuôi cấy). Plasmit được phân giải bằng enzym được kết tủa bằng etanol và được hòa tan lại trong 20 µl nước vô trùng.

c) chuyển nhiễm các tế bào bằng 6 µg plasmit được xử lý bằng *PacI* nhờ sử dụng PEI hoặc các tác nhân chuyển nhiễm khác.

d) sau 8 giờ chuyển nhiễm, loại bỏ lỏng được phối trộn khi chuyển nhiễm và bổ sung 4 ml môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh DMEM (chứa 10% CBS và 1% Pen/Strep);

e) sau từ 7 đến 10 ngày chuyển nhiễm, cọ sạch các tế bào khỏi đĩa nuôi cấy và được chuyển vào ống hình nón dung tích 50ml. Sau khi được ly tâm, các tế bào được tạo huyền phù lại trong 2,0 ml PBS hoặc môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh. Huyền phù được làm đông lạnh trong nitơ lỏng và được làm tan ở bể nước 37°C kết hợp lắc mạnh. Bước này được lặp lại bốn lần. Sau khi ly tâm, dịch nổi thu được được bảo quản ở -20°C.

f) gieo mầm 293 tế bào vào đĩa môi trường nuôi cấy tế bào 60 mm, được nuôi cấy đến tốc độ hợp lưu nằm trong khoảng từ 50 đến 70%, và được cấy dịch nổi chứa virus với tỷ lệ phần trăm thể tích nằm trong khoảng từ 30 đến 50%. Hiện tượng phân giải tế bào biểu kiến và hiệu ứng bệnh lý (CPE) quan sát được 3 ngày sau gây nhiễm;

g) khi 1/3 đến 1/2 tế bào được tách ra và nổi lên, thường là từ 3 đến 5 ngày sau gây nhiễm, thu gom virus. Sự có mặt của adenovirus tái tổ hợp có thể được khẳng định tiếp bằng nhuộm Tây hoặc PCR (5 µl dịch nổi chứa virus được bổ sung vào 10 µl proteaza K tiêu chuẩn PCR và được ủ ở 55°C trong 1 giờ; tiếp theo mẫu đã được trộn được đun sôi trong 5 phút và được ly tâm; từ 1 đến 2 µl dịch nổi thu được được sử dụng trong phản ứng PCR).

h) thu gom dịch nổi chứa virus theo quy trình ở bước f). Trong trường hợp này, virus gốc với hiệu giá virus là ít nhất 10^7 virion/ml (các hạt có thể gây nhiễm/ml) có thể thường được thu gom. Mỗi chu trình khuếch đại được tăng hiệu giá virus một mức phóng đại.

i) để khuếch đại tiếp, cấy tiếp dịch nổi chứa virus thu được ở bước h) vào các tế bào trong đĩa môi trường nuôi cấy tế bào 100 mm, virus thu được được thu gom theo quy trình ở bước f) và được cấy vào 293 tế bào trong đĩa môi trường nuôi cấy tế bào 150 mm để thu được đủ lượng virus thế hệ con.

j) bổ sung liên tục cc dung dịch 15% CsCl và 40% CsCl vào ống ly tâm Beckman để thu được dung dịch gradien CsCl.

k) giỏ dịch nổi chứa virus với các virion được làm giàu cuối cùng vào dung dịch gradien CsCl.

l) siêu ly tâm ở tốc độ 30000 vòng/phút ở 4°C trong 16 h.

m) thu được hai dải sau khi ly tâm. Dải trên có màu nhạt chứa chủ yếu

là capsit adenovirut rỗng không có khả năng gây nhiễm; trong khi dải dưới có màu sáng hơn chứa các virion sống cần được thu gom. Dải dưới được thu gom bằng kim 16 cỡ.

n) thẩm tách mẫu thu gom bằng TBS (10mM Tris, 0,9% NaCl, pH8,1) trong 1 giờ và tiếp theo với TBS chứa 10% glyxerol hai lần (một giờ mỗi lần) để loại bỏ CsCl;

o) chia adenovirut đã được tinh chế thành lượng nhỏ vào ống EP.

p) xác định việc định lượng protein tổng trong chất thẩm tách bằng máy quang phổ Eppendorf (Eppendorf Biophotometer) với 1 μ g protein virut tương ứng với 4×10^9 virion,

q) để bảo quản lâu dài thì bảo quản ở nhiệt độ -70°C , để bảo quản trong thời gian ngắn thì bảo quản ở nhiệt độ 4°C ; lượng bảo quản dự trữ không thấp hơn $1 \text{E}+11$ VP đơn vị/đồ chứa phần chia nhỏ sau khi chia thành lượng nhỏ; sự khuếch đại quy mô lớn được mô tả trên đây nghĩa là thu được lượng virut trên $1 \text{E}+12$ VP đơn vị/đồ chứa phần chia nhỏ.

r) do có sự khác nhau về hiệu ứng gây nhiễm của adenovirut đối với các dòng tế bào khác nhau và hiệu ứng gây độc tế bào của virion được tính đến, cần xác định liều lượng virut bằng phương pháp pha loãng gradien theo chuỗi. Các tế bào đích được gây nhiễm virion với lượng tương đối với số tế bào 1: 1, 10: 1, 100: 1, và 1000: 1; Polybrene (1,5-đimetyl-1,5-điazaundecametylen polymetobromua) được bổ sung với thể tích tương đối vào môi trường 1: 1000. Đĩa được ly tâm ở 37°C trong 30 phút.

s) thay thế môi trường 8-12 h sau khi gây nhiễm và thu gom virut.

2-6) Kiểm soát định tính đối với đóng gói adenovirut tái tổ hợp .

Tổng lượng virut gây nhiễm $= 1,05 \times 10^{12}$ PFU/3ml

2-7) Bảo quản adenovirut tái tổ hợp

Dung dịch đệm bảo quản: 4% sucroza, 2mM MgCl_2 , 10mM Tris, độ pH 8,0

Nhiệt độ bảo quản: -80°C

Ví dụ 3: Chuyển nhiễm tế bào min-6

1. Môi trường cơ bản cho tế bào min-6

DMEM (Gibco 11995) 830ml

FBS (Gibco. US) 150ml

P/S 10ml

Hepes (1M) 10ml

β -mercaptoetanol 10 μ l

Các đĩa petri có bề mặt của chúng không được xử lý để nuôi cấy tế bào và tất cả đều là bình cầu ficol.

Các điều kiện ủ: 37°C ; CO_2 5%; độ ẩm tương đối 95%

Vectơ plasmit pIRES2-EGFPs được điều chế trong Ví dụ 2 mang gen đang quan tâm (Ví dụ 1 hoặc Ví dụ so sánh1) được chuyển nhiễm vào amin6 dòng tế bào theo Lipofectmine 2000 (invitrogen) quy trình. Các bước chi tiết như sau:

Ngày 1: Các tế bào được làm đông lạnh trong nitơ lỏng được hồi sinh

và được gieo trong bình cầu nuôi cấy 25 cm².

Ngày 2: Môi trường nuôi cấy được thay thế.

Ngày 3: Các tế bào được cắt bằng dung dịch trypsin 0,2% (Gibco) khi sinh trưởng đến tốc độ hợp lưu là 90% và được gieo vào đĩa 6 lỗ ở tỷ lệ 2×10^5 tế bào/ml (rút chất kháng sinh tại thời điểm này).

Ngày 4: 4 µg vectơ đã được tuyến tính hóa, 10 µl Lipofectmine, và Opti-M lên đến 100 µl được trộn và để một mình ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút. Tất cả các hỗn hợp được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đối với tế bào min6 và được trộn mạnh đến đồng nhất. Hỗn hợp thu được để một mình ở 37°C trong CO₂ 5% ở độ ẩm tương đối 95% trong 24 h. Đồng thời, thiết lập kiểm chứng âm.

Ngày 5: Môi trường nuôi cấy được thay thế. (Môi trường nuôi cấy chứa chất kháng sinh có thể được sử dụng Theo cách khác).

Ngày 6: Môi trường nuôi cấy được thay thế và có bổ sung chất kháng sinh G418 (400 µg/ml) để sàng lọc các dòng tế bào đã được chuyển nhiễm ổn định (xem trong Fig. 5, quan sát thấy rằng trong trường tối protein huỳnh quang xanh lá cây đã được biểu hiện) trong 8 ngày liên tiếp.

Sau khi dòng tế bào biểu hiện ổn định protein GCK ngoại sinh được sàng lọc, nó được nhận diện ở mức bộ gen của nó bằng PCR. Nhằm mục đích này, tác giả sáng chế đã thiết kế cặp đoạn mồi đặc hiệu cho trình tự vectơ (đoạn mồi xuôi: 5'-GCGGAGAAGCCTTGGATATT-3'; đoạn mồi ngược: 5'-TTTGATAGCGTCTCGCAGAA-3'), và đã xác nhận bằng các thử nghiệm và sắp xếp thẳng hàng rằng các đoạn mồi không thể khơi mào sự khuếch đại từ bộ gen của dòng tế bào min-6, nhưng có thể tạo ra sản phẩm khuếch đại có kích thước 653bp từ vectơ đã được đưa vào. Tác giả sáng chế cũng thiết kế cặp đoạn mồi đặc hiệu cho bộ gen min-6 (đoạn mồi xuôi: 5'-CAAGCCCTGTAAGAAGCCACT-3'; đoạn mồi ngược: 5'-TGCTTCCAGCTA CTTGAGGTC -3'), và cũng đã xác nhận bằng các thử nghiệm và sắp xếp thẳng hàng rằng các đoạn mồi không thể khuếch đại sản phẩm đặc hiệu bất kỳ từ vectơ đã được đưa vào và có thể tạo ra sản phẩm có kích thước 956 bp từ bộ gen của dòng tế bào min-6.

Vì vậy, hai sản phẩm đã được khuếch đại với kích thước khác nhau có thể quan sát được sau khi khuếch đại bộ gen min-6 mang ngoại sinh ADN (xem trong Fig. 4).

Chiết ADN bộ gen của tế bào min-6

Điều chế các chất phản ứng cần thiết

Dung dịch đệm phân giải proteinaza K (dung dịch đệm Proteinaza K SNET)

20mmol/L Tris-Cl (pH8,0)

5mmol/L EDTA (pH8,0)

400mmol/L NaCl

1% (m/v) SDS

400µg/ml Proteinaza K

Các tế bào được cắt bằng proteinaza tụy trước khi chiết ADN bộ gen

theo các bước sau:

- A Bổ sung proteinaza và ủ ở 56°C qua đêm.
- B Bổ sung etanol khan trong hai lần thể tích và lắc đều đến đồng nhất.
- C Để hỗn hợp thu được một mình ở -80°C trong tủ lạnh.
- D Ly tâm ở tốc độ 12000g trong 15 phút
- E Loại bỏ dịch nổi.
- F Rửa viên ADN bằng etanol 75%.
- G Ly tâm ở tốc độ 12000g trong 10 phút.
- H Rửa viên ADN bằng etanol 75%.
- I Ly tâm ở tốc độ 12000g trong 10 phút.
- J Sấy khô viên ADN.
- K Hòa tan viên ADN trong nước tinh khiết.

ADN được định lượng bằng máy quang phổ UV và được pha loãng bằng nước tinh khiết theo nồng độ ADN để thu được nồng độ ADN cuối là 50 ng/μl cho dung dịch hoạt động. Dung dịch gốc được bảo quản trong tủ lạnh -20°C cho đến khi sử dụng, và dung dịch pha loãng của nó được bảo quản trong tủ lạnh -4°C và hoạt động như khuôn mẫu PCR hữu ích trong phản ứng PCR.

Hệ phản ứng PCR	10 μl
10x dung dịch đệm PCR (không chứa Mg ²⁺)	1,0 μl
dNTP (25 mM)	0,2 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 μl
Đoạn mồi 1(Xuôi/ngược)	1,0 pmol
Đoạn mồi 2(Xuôi/ngược)	1,0 pmol
DMSO (đimetyl sulfoxit)	0,5 μl
ADN polymeaza AmpliTaq Gold	0,05 μl (5 U/μl)
Bộ gen ADN khuôn mẫu (50 ng/μl)	2,0 μl
H ₂ O	Bổ sung lên đến 10,0 μl của tổng hệ

Chương trình phản ứng PCR TouchDown

- 1= 95°C kéo dài 8 phút
- 2= 94°C kéo dài 30 giây
- 3= 68°C kéo dài 1 phút
- 1,0°C cho mỗi chu trình
- 4= 72°C kéo dài 45 giây
- 5= quay trở về 2, 12 chu trình
- 6= 95°C kéo dài 30 giây
- 7= 54°C 1 kéo dài 5 giây
- +1 s cho mỗi chu trình
- 8= 72°C kéo dài 45 giây
- 9= quay trở về 6, 30 chu trình
- 10= 72°C kéo dài 60 phút
- 11= 4°C duy trì kéo dài (liên tục)

Sản phẩm được khuếch đại bằng PCR được nhận diện bằng điện di gel agarosa 1,2%. Kết quả nhận diện được thể hiện trên Fig. 4, trong đó Dải 0 là: Plasmid G262, Dải 1: Bộ gen G261min-6, Dải 2: Bộ gen G261min-6, Dải 3: Bộ gen G262min-6, Dải 4: Bộ gen G262min-6, Dải 5: Plasmid G261, Dải 6: Plasmid G261, Dải 7: bộ gen min-6 dạng đại, Dải 8: kiểm chứng âm (nước), Dải 9: kiểm chứng âm (nước), Dải 10: Plasmid G262, Dải 11: bộ gen min-6 dạng đại, Dải 12: Bộ gen G261min-6, Dải 13: Bộ gen G262min-6, và Dải M: AND đánh dấu kích cỡ khối lượng phân tử.

2. Tế bào min-6 được gieo đồng đều vào đĩa 12 lỗ với mức độ sao chép trong bốn giếng cho mỗi mẫu. Các tế bào được xác định mức đồng bộ bằng huyết thanh nghèo: dịch nổi môi trường nuôi cấy được hút nhỏ giọt ra, các tế bào được rửa hai lần với dung dịch đệm Krebs-Ringer bicarbonat không chứa đường (KRBB) và được xử lý sơ bộ bằng KRBB không chứa đường+ 0,1 % BSA trong 2 h. Chế phẩm cho môi trường KRBB không chứa đường+ 0,1 % BSA là như sau:

KRBB	1L
NaCl	6,9496 g
KCl	354 mg
NaHCO ₃	420 mg
MgSO ₄	144,4 mg
KH ₂ PO ₄	160,6 mg
HEPES	4,766 g
CaCl ₂ khan	281,915 mg
PH7,4	
BSA	0,1% (nồng độ cuối)

3. Dịch nổi môi trường nuôi cấy được hút nhỏ giọt ra, và sau đó các tế bào được xử lý bằng KRBB G2.8 + BSA 0,1% hoặc KRBB G25 + BSA 0,01% trong 1 giờ, trong đó G2.8 cho biết nồng độ glucoza là 504,448mg/L và G25 cho biết nồng độ glucoza là 4,504g/L.

4. Dịch nổi được thu gom từ 3 giếng và bảo quản ở -20°C cho đến khi được thử nghiệm.

5. Các tế bào trong đĩa thứ tư được cắt và được đếm trong thiết bị đếm hồng cầu để tính toán theo thống kê số tế bào trong mỗi mẫu.

6. Cường độ tiết insulin từ tế bào min-6 trong điều kiện nồng độ glucoza cao được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ.

Trong thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, có quan hệ hàm giữa lượng insulin trong mẫu và số lượng ¹²⁵I cpm trong mẫu. Vì vậy, đường cong chuẩn phải được dựng đồ thị trong mỗi thử nghiệm để tính toán quan hệ hàm giữa lượng insulin và số lượng ¹²⁵I cpm.

Tạo ra đường cong chuẩn và đo các mẫu

Bảng 1: Lượng insulin và số lượng ¹²⁵I cpm trong các mẫu chuẩn

	μU/ml	CPM
Chuẩn 1	2	9692
Chuẩn 2	4	8191

Chuẩn 3	15	6471
Chuẩn 4	40	3636
Chuẩn 5	175	2151
Chuẩn 6	300	1519

Như được thể hiện trên Fig. 2, dựa trên cơ sở lượng insulin và số lượng ^{125}I cpm trong các mẫu chuẩn, quan hệ hàm giữa đơn vị insulin (μ đơn vị/ml) X và số lượng ^{125}I Y được thiết lập như sau:

$$y = -1649,8 \ln(x) + 10590 \quad \text{Công thức 1}$$

Do đó

$$x = \exp[(10590 - y)/1649,8] \quad \text{Công thức 2}$$

Số lượng ^{125}I cpm trong dịch nổi từ môi trường nuôi cấy dạng đại, G261min-6, và G262min-6 được xác định thực tế và sau đó được chuyển thành lượng insulin đã được tiết bằng cách tính toán theo Công thức 2.

Bảng 2: Lượng insulin đã tiết

	$\mu\text{U}/\text{ml} (x)$	CPM (y)
Dạng đại	53,0261	4045
G261	54,79043	3991
G262	64,065	3733

Từ Bảng 2 có thể thấy rằng G262 có tác dụng tăng tiết insulin đáng kể, điều đó cho thấy hoạt tính glucokinaza của G262 cao hơn đáng kể so với hoạt tính này của dạng đại.

Ví dụ 4: Thử nghiệm *in vivo* adenovirut tái tổ hợp trên động vật

1. Nuôi động vật thử nghiệm (Chuột GK)

Chuột GK dùng làm động vật thử nghiệm được mua từ Phòng thí nghiệm động vật gặm nhấm quốc gia, chi nhánh Thượng Hải, Trung Quốc. Động vật thử nghiệm, chuột GK, chuột SLAC/GK mắc bệnh đái tháo đường typ 2, được nuôi năm 1975 tại Tohoku University. Chúng được thiết lập bằng cách sàng lọc ra các cá thể có mức glucoza huyết tăng ra khỏi các con chuột WISTAR đã được giao phối cùng giống. Các con chuột cái đạt sự thành thục về giới tính ở 8 đến 10 tuần tuổi và các con chuột đực ở 10 đến 12 tuần tuổi. Giai đoạn mang thai kéo dài từ 21 đến 23 ngày, số lứa đẻ nằm trong khoảng từ 7 đến 9, tỷ lệ thụ thai là 60%, và thời kỳ tiết sữa kéo dài trong 28 ngày. Chuột GK được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu về bệnh đái tháo đường phụ thuộc không insulin (NIDDM, type II bệnh đái tháo đường). Sau khi bị bệnh đái tháo đường tấn công, glucoza huyết tăng, tiết insulin suy giảm, v.v. xuất hiện nhanh ở chuột GK, bị các biến chứng như bệnh vông mạc, bệnh mao mạch, bệnh thần kinh, bệnh thận trong các giai đoạn muộn hơn. Trái với các mô hình loài động vật gặm nhấm khác mắc bệnh đái tháo đường typ II, chuột GK là kiểu không béo. 20 con chuột GK 10 tuần tuổi được chọn trong ví dụ này và được cho tiếp cận tùy thích với thức ăn và nước trong một tuần.

2. Đường dùng adenovirut tái tổ hợp từ Ví dụ 2

(1) Bào chế được phẩm tiêm

Nhóm dung dịch đệm phosphat được điều chế tương ứng với các liều dùng được thể hiện trong Bảng 3, và sau đó được khử trùng ở 121°C trong 60 phút. Trong điều kiện vô trùng, adenovirut tái tổ hợp gốc từ các bước từ 2 đến 6 trong Ví dụ 2 được lọc bằng màng lọc Millipore 0,45 µm. Các mảnh vụn tế bào được loại bỏ. Phần lọc được thu gom vào ống ly tâm vô trùng và được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 1 giờ. Dịch nổi được bỏ đi. Viên virus thu được được phân tán vào trong dung dịch đệm phosphat đã được hấp trên đây dựa trên cơ sở hiệu giá được thể hiện trong Bảng 3, thu được được phẩm tiêm theo sáng chế.

Bảng 3

Thuốc	Công thức pha chế 1	Công thức pha chế 2	Công thức pha chế 3	Công thức pha chế 4	Công thức pha chế 5
Dung dịch đệm phosphat (% khối lượng)	99	95	90	85	80
Inositol (% khối lượng)	1	0	0	10	15
Sorbitol (% khối lượng)	0	5	0	5	0
Sucroza (% khối lượng)	0	0	10	0	5
Chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu và nồng độ (mol/L)	natri clorua 0,9	kali clorua 0,5	natri clorua 0,9	kali clorua 0,5	natri clorua 0,9
Áp suất thẩm thấu (mOsm/kg)	200	300	400	450	500
Hiệu giá virus (pfu/ml)	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰

Adenovirut tái tổ hợp pAd-GFP-G261 hoặc pAd-GFP -G262 từ Ví dụ 2 được tiêm lần lượt q.d. ở liều lượng là 10¹⁰ pfu/Kg thể trọng qua tĩnh mạch não trong 3 ngày liên tiếp. Mỗi chế phẩm được tiêm vào hai con chuột.

(2) Phương pháp thử nghiệm glucoza huyết

Thử nghiệm glucoza huyết được thực hiện trên 0,5ml mẫu máu được thu gom từ tĩnh mạch góc mắt của chuột, bằng cách sử dụng máy theo dõi glucoza huyết HEA-214 của hãng OMRON theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

(3) Kết quả về việc xác định glucoza huyết ở chuột

Các con chuột được tiêm vector virus tái tổ hợp biểu hiện glucokinaza dạng đại (G261) được đánh số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, và 10. Các con chuột được tiêm vector virus tái tổ hợp biểu hiện glucokinaza thể đột biến (G262) được đánh số 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, và 20. Máu trắng được thu gom từ tất cả các con chuột và được thử nghiệm về mức glucoza huyết trước khi tiêm. Các mẫu máu sau khi tiêm được thu gom 8 lần ở các giai đoạn khác nhau và được thử nghiệm về mức glucoza huyết. Các thời điểm lấy mẫu và các kết quả đã xác định được thể hiện trong các Bảng 4 và 5.

Bảng 4. Mô tả về glucoza huyết (GLUmmol/L) đối với G261

Nhóm Ngày		2008-12-17 trước khi tiêm	2008-12-27 sau khi tiêm	2008-12-29 sau khi tiêm	2009-1-8 sau khi tiêm	2009-1-14 sau khi tiêm	2009-1-20 sau khi tiêm	2009-1-27 sau khi tiêm	2009-2-5 sau khi tiêm	2009-2-11 sau khi tiêm
G261	1	17,4	11,2	13,8	15,2	16,1	17,1	17,5	17,6	17,5
	2	16,9	10,8	14	14,9	15,5	16,5	11,8	16,8	16,7
	3	14,2	10,6	11,8	15,2	15,1	14,1	14	14,1	14,3
	4	17,5	13,4	13,2	14,2	15,3	16,9	17,4	17,3	17,2
	5	17,8	13,2	13,8	15,1	15,2	17,1	17,6	17,4	17,6
	6	18,5	12,1	13,7	14,9	15,2	17,9	18,1	18,3	18,3
	7	19,5	11,8	12,9	14,1	15,8	18,1	18,8	19,6	19,1
	8	18,3	11,5	13,2	15,1	14,9	18,2	18,1	18,2	18,4
	9	16,8	10,8	12,9	13,2	14,2	16,1	16,5	16,5	16,9
	10	18,6	11,2	12,6	14,3	15,2	16,8	18,3	18,4	18,3
Giá trị trung bình		17,55	11,66	13,19	14,62	15,25	16,88	16,74	17,42	17,43

Bảng 5: Mô tả về glucoza huyết (GLUmmol/L) đối với G262

Nhóm Ngày		2008-12-17 trước khi tiêm	2008-12-27 sau khi tiêm	2008-12-29 sau khi tiêm	2009-1-8 sau khi tiêm	2009-1-14 sau khi tiêm	2009-1-20 sau khi tiêm	2009-1-27 sau khi tiêm	2009-2-5 sau khi tiêm	2009-2-11 sau khi tiêm
G262	1	13,4	6,9	7,7	8,5	7,2	7,6	7,0	6,8	6,9
	2	19,7	12,5	11,0	6,8	8,7	8,1	8,9	7,4	6,8
	3	19,0	7,8	8,4	8,3	8,5	8,7	7,7	7,2	9,2
	4	15,7	10,4	10,0	8,1	9,8	9,9	10,2	10,3	8,8
	5	19,5	8,0	10,3	8,5	8,5	7,4	7,2	7,9	9,7
	6	14,4	6,8	8,2	12,4	1,3	9,6	8,9	8,8	8,2
	7	18,4	5,8	9,8	7,9	10,8	10,2	9,9	9,7	8,9
	8	18,0	12,2	10,8	10,2	9,3	7,9	7,6	7,2	7,1
	9	13,8	8,8	8,2	7,9	8,5	8,8	8,2	7,8	6,3
	10	17,8	9,9	11,2	10,1	8,5	7,7	8,4	8,8	7,5
Giá trị trung bình		16,97	8,91	9,56	8,87	8,11	8,59	8,4	8,19	7,94

Từ dữ liệu được ghi lại trong các Bảng 4 và 5 có thể thấy rằng hoạt tính in vivo của thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế làm giảm mức glucoza huyết và độ ổn định của nó tốt hơn nhiều so với glucokinaza dạng đại của người. Mức glucoza huyết ở mô hình chuột mắc bệnh đái tháo đường typ II có thể được kiểm soát một cách hiệu quả bằng cách tiêm vào cơ thể động vật adenovirut tái tổ hợp chứa gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người theo sáng chế, do đó có thể điều trị bệnh đái tháo đường nhờ tăng tiết insulin một

cách hiệu quả.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Yiyuan (Shenzhen) Biotech Limited

<120> GEN MÃ HÓA THỂ ĐỘT BIẾN GLUCOKINAZA CỦA NGƯỜI, THỂ ĐỘT BIẾN GLUCOKINAZA CỦA NGƯỜI, VECTƠ TÁI TỔ HỢP, VẬT CHỦ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ ĐỘT BIẾN GLUCOKINAZA CỦA NGƯỜI VÀ VECTƠ TÁI TỔ HỢP NÀY

<130> PCT090008

<150> 200910000087.1

<151> 2009-01-07

<160> 2

<170> PatentIn Phiên bản 3.4

<210> 1

<211> 2749

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
actccacacc tggctggagc aggaaatgcc gagcggcgcc tgagccccag ggaagcaggc      60
taggatgtga gagacacagt cacctgcagc ctaattactc aaaagctgtc cccagggtcac      120
agaagggaga ggacatttcc cactgaatct gtctgaagga cactaagccc cacagctcaa      180
cacaaccagg agagaaagcg ctgaggacgc cacccaagcg cccagcaatg gccttgccctg      240
gagaacatcc aggtcagtg aggaagggtc cagaaggga tgcttgccga ctcggtggag      300
aacaatgaaa aggaggaaac tgtgactgaa cctcaaacc caaaccagcc cgaggagaac      360
cacattctcc cagggaccca gggcgggccc tgaccctgc ggcggagaag ccttgatat      420
ttccacttca gaagcctact ggggaaggct gaggggtccc agtccccac gctggctgct      480
gtgcagatgc tggacgacag agccaggatg gagggcccca agaaggagaa ggtagagcag      540
atcctggcag agttccagct gcaggaggag gacctgaaga aggtgatgag acggatgcag      600
aaggagatgg accgcggcct gaggttgag acccatgaag aggccagtgt gaagatgctg      660
cccacctacg tgcgctccac cccagaaggg tcagaagtcg gggacttctt ctccctggac      720
ctgggtggca ctaacttcag ggtgatgctg gtgaagggtg gagaagggtg ggaggggcag      780
tggagcgtga agaccaaaca ccagatgtac tccatccccg aggacgcat gaccggcact      840
gctgagatgc tcttcgacta catctctgag tgcattctcg acttcttgga caagcatcag      900
atgaaacaca agaagctgcc cctgggcttc accttctctt ttctgtgag gcacgaagac      960
atcgataagg gcatccttct caactggacc aagggttca aggcctcagg agcagaaggg     1020
aacaatgtcg tggggcttct gcgagacgct atcaaacgga gaggggactt tgaaatggat     1080
gtggtggcaa tggatgaatga cacggtggcc acgatgatct cctgctacta cgaagacat     1140
cagtgcgagg tcggcatgat cgtgggcacg ggctgcaatg cctgctacat ggaggagatg     1200
```

cagaatgtgg agctggtgga gggggacgag ggccgcatgt gcgtcaatac cgagtggggc 1260
 gccttcgggg actccggcga gctggacgag ttctgtctgg agtatgaccg cctggtggac 1320
 gagagctctg caaaccocgg tcagcagctg tatgagaagc tcataggtgg caagtacatg 1380
 ggcgagctgg tgcggcttgt gctgctcagg ctctgtggacg aaaacctgct cttccacggg 1440
 gaggcctccg agcagctgcg cacacgcgga gccttcgaga cgcgcttcgt gtcgcagggtg 1500
 gagagcgaca cgggcgaccg caagcagatc tacaacatcc tgagcacgct ggggctgcga 1560
 ccctcgacca ccgactgcga catcgtgcgc cgcgcctgcg agagcgtgtc tacgcgcgct 1620
 gcgcacatgt gctcggcggg gctggcgggc gtcacaaacc gcatgcgcga gagccgcagc 1680
 gaggacgtaa tgcgcatcac tgtgggcgtg gatggctccg tgtacaagct gcacccacagc 1740
 ttcaaggagc ggttccatgc cagcgtgcgc aggctgacgc ccagctgcga gatcaccttc 1800
 atcgagtcgg aggagggcag tggccggggc gcggccctgg tctcggcggg ggctgtgaag 1860
 aaggcctgta tgctgggcca gtgagagcag tggccgcaag cgcagggagg atgccacagc 1920
 cccacagcac ccaggctcca tggggaagtg cttcccacac gtgctgcgag cctggcgggg 1980
 caggaggcct ggccttgtca ggaccagggc cgcctgccat accgctgggg aacagagcgg 2040
 gcctcttccc tcagtttttc ggtgggacag cccaggggc ctaacggggg tgcggcagga 2100
 gcaggaaacag agactctgga agccccccac ctttctcgct ggaatcaatt tcccagaagg 2160
 gagttgtca ctcaggactt tgatgcattt ccacactgtc agagctgttg gcctgcgctg 2220
 ggcccaggct ctgggaaggg gtgccctctg gatcctgctg tggcctcact tccctgggaa 2280
 ctcatcctgt gtggggaggc agctccaaca gcttgaccag acctagacct gggccaaaag 2340
 ggcagccagg ggctgctcat caccagtc cggccatttt cttgcctgag gctcaagagg 2400
 cccagggagc aatgggaggg ggctccatgg aggaggtgtc ccaagctttg aataccccca 2460
 gagacctttt ctctcccata ccactactga gtggcttgtg attctgggat ggaccctcgc 2520
 agcaggtgca agagacagag cccccaagcc tctgccccaa ggggcccaca aaggggagaa 2580
 gggccagccc tacatcttca gctcccatag cgctggctca ggaagaaacc ccaagcagca 2640
 ttcagcacac cccaagggac aaccccatca tatgacatgc caccctctcc atgcccacac 2700
 taagattgtg tgggtttttt aattaaaaat gttaaaagtt ttaaaccatg 2749

<210> 2
 <211> 2748
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Thẻ đột biến glucokinaza mã hóa gen tổng hợp của người

<400> 2

actccacacc tggctggagc aggaaatgcc gagcggcgcc tgagccccag ggaagcaggc 60

taggatgtga gagacacagt cacctgcagc ctaattactc aaaagctgtc cccaggtcac	120
agaaggggaga ggacatttcc cactgaatct gtctgaagga cactaagccc cacagctcaa	180
cacaaccagg agagaaagcg ctgaggacgc caccgaagcg cccagcaatg gccctgcctg	240
gagaacatcc aggctcagt aggaagggtc cagaaggga tgcttgccga ctctgttgag	300
aacaatgaaa aggaggaaac tgtgactgaa cctcaaacc caaaccagcc cgaggagaa	360
cacattctcc cagggaacca gggcgggccg tgaccctgc ggcggagaag ccttgatat	420
ttccacttca gaagcctact ggggaaggct gaggggtccc agctccccac gctggctgct	480
gtgcagatgc tggacgacag agccaggatg gaggcgcca agaaggagaa ggtagagcag	540
atcctggcag agttccagct gcaggaggag gacctgaaga aggtgatgag acggatgcag	600
aaggagatgg accgcggcct gaggtgtgag acctatgaag aggccagtgt gaagatgctg	660
cccacctacg tgcgctccac ccagaaggc tcagaagtcg gggacttct ctccctggac	720
ctgggtggca ctaacttcag ggtgatgctg gtgaagggtg gagaagggtg ggaggggcag	780
tggagcgtga agaccaaaca ccagatgtac tccatccccg aggacgcat gaccggcact	840
gctgagatgc tcttcgacta catctctgag tgcattctcg acttcctgga caagcatcag	900
atgaaacaca agaagctgcc cctgggcttc accttctct ttcctgtgag gcacgaagac	960
atcgataagg gcatccttct caactggacc aagggttca aggcctcagg agcagaagg	1020
aacaatgtcg tggggcttct gcgagacgt atcaaacgga gaggggactt tgaaatggat	1080
gtggtggcaa tggatgaatga cacggtggcc acgatgatct cctgctacta cgaagacat	1140
cagtgcgagg tcggcatgat cgtgggcacg ggctgcaatg cctgctacat ggaggagatg	1200
cagaatgtgg agctggtgga gggggacgag ggccgcatgt gcgtcaatac cgagtggggc	1260
gccttcgggg actccggcga gctggacgag ttctgtctgg agtatgaccg cctggtggac	1320
gagagctctg caaaccgccg tcagcagctg tatgagaagc tcataggtgg caagtacatg	1380
ggcgagctgg tgcggcttgt gctgtcagg ctctgtgacg aaaacctgct ctccacggg	1440
gaggcctccg agcagctgcg cacacgcgga gccttcgaga cgcgcttcgt gtcgcaggtg	1500
gagagcgaca cgggcgaccg caagcagatc tacaacatcc tgagcacgct ggggctgcga	1560
ccctcgacca ccgactgcga catcgtgcgc cgcgcctgcg agagcgtgtc tacgcgcgt	1620
gcgcacatgt gctcggcggg gctggcgggc gtcattcaacc gcatgcgcga gagccgcagc	1680
gaggacgtaa tgcgcatcac tgtgggcgtg gatggctccg tgtacaagct gcacccagc	1740
ttcaaggagc ggttccatgc cagcgtgcgc aggtgacgc ccagctgcga gatcaccttc	1800
atcgagtcgg aggagggcag tggccggggc gcggccctgg tctcggcggg gcctgtaag	1860
aaggcctgta tgctgggcca gtgagagcag tggccgcaag cgcagggagg atgccacagc	1920
cccacagcac ccaggctcca tggggaagtg cccccacac gtgctcgag cctggcgggg	1980

caggaggcct ggccttgta ggacccagga cgctgcca accgctggg aacagagcgg 2040
 gcctcttccc tcagtttttc ggtgggacag cccagggcc ctaacggggg tgcggcagga 2100
 gcaggaacag agactctgga agccccccac ctttctcgct ggaatcaatt tcccagaagg 2160
 gagttgctca ctcaggactt tgatgcattt ccacactgtc agagctgttg gcctcgctg 2220
 ggcccaggct ctgggaaggg gtgccctctg gatcctgctg tggcctcact tccctgggaa 2280
 ctcatcctgt gtggggagga agctccaaca gcttgaccag acctagacct gggccaaaag 2340
 ggcagccagg ggctgctcat caccagtc cggccatttt cttgcctgag gctcaagagg 2400
 cccagggagc aatgggaggg ggctccatgg aggaggtgtc ccaagctttg aataccccca 2460
 gagacctttt ctctccata ccactactga gtggcttggt attctgggat ggacctcgc 2520
 agcaggtgca agagacagag cccccaagcc tctgcccga gggggccaca aaggggagaa 2580
 gggccagccc tacatcttca gctcccatag cgctggctca ggaagaaacc ccaagcagca 2640
 ttagcacacc ccaagggaca accccatcat atgacatgcc accctctcca tgcccaacct 2700
 aagattgtgt gggtttttta attaaaaatg ttaaaagttt taaacatg 2748

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người, khác biệt ở chỗ, gen này có:
 - (1) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2; hoặc
 - (2) trình tự nucleotit đồng nhất với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 chỉ khác là khung đọc mở (open reading frame - ORF) nằm trong khoảng từ vị trí 487 đến 1884 của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, và có ORF mã hóa trình tự axit amin giống như trình tự đã được mã hóa bởi ORF của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2.
2. Thể đột biến glucokinaza của người, khác biệt ở chỗ, gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người là gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người như được xác định trong điểm 1.
3. Vector tái tổ hợp bao gồm vector và gen đang quan tâm chứa trong đó, khác biệt ở chỗ, gen đang quan tâm là gen mã hóa thể đột biến glucokinaza của người như được xác định trong điểm 1.
4. Vector tái tổ hợp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, vector được chọn từ nhóm bao gồm vector tách dòng vô tính, vector biểu hiện nhân chuẩn, vector biểu hiện nhân sơ, và vector con thoi.
5. Vector tái tổ hợp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, vector được chọn từ nhóm bao gồm pIRES2-EGFP, pCMVp-NEO.BAN, pEGFT-Actin, và vector adenovirut.
6. Vật chủ, khác biệt ở chỗ, vật chủ này chứa vector tái tổ hợp như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5.
7. Vật chủ theo điểm 6, khác biệt ở chỗ, vật chủ này được chọn từ một hoặc nhiều *Escherichia coli*, tế bào 239, tế bào min-6 và tế bào beta tiểu đảo của người.
8. Dược phẩm, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này chứa tá dược được dụng và một hoặc nhiều chất được chọn từ thể đột biến glucokinaza của người như được xác định trong điểm 2 và vector tái tổ hợp như được xác định trong các điểm từ 3 đến 5.
9. Dược phẩm theo điểm 8, trong đó dược phẩm này là dược phẩm tiêm chứa tá dược được dụng và một hoặc nhiều chất được chọn từ vector tái tổ hợp như được xác định trong các điểm từ 3 đến 5.
10. Dược phẩm theo điểm 9, trong đó tá dược được dụng là dung dịch đệm phosphat với giá trị pH nằm trong khoảng từ 4,0 đến 9,0; và từ 10^2 đến 10^{10} bản sao vector tái tổ hợp chứa trong một mililit dược phẩm tiêm.
11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm tiêm này còn chứa chất bảo vệ và/hoặc chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu; lượng chất bảo vệ này nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30% khối lượng dược phẩm tiêm, chất bảo vệ là một hoặc nhiều chất được chọn từ inositol, sorbitol, và sucroza; lượng chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu cho phép áp suất thẩm thấu của dược phẩm tiêm nằm trong khoảng từ 200 đến 700 mOsm/kg với chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu là natri clorua và/hoặc kali clorua.

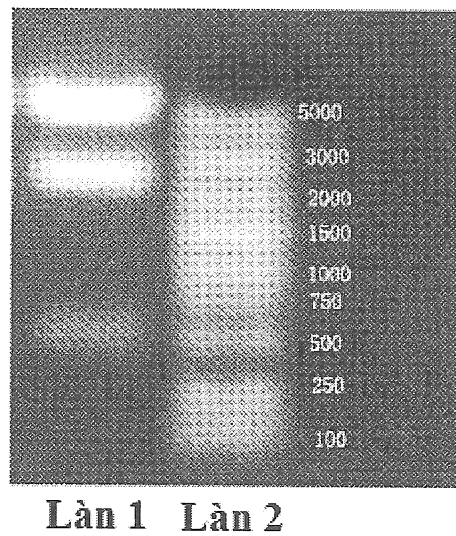


Fig. 1

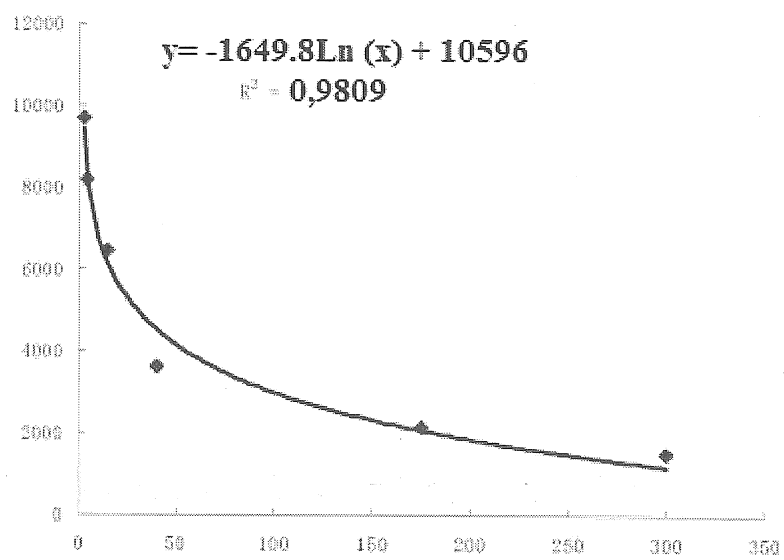


Fig. 2

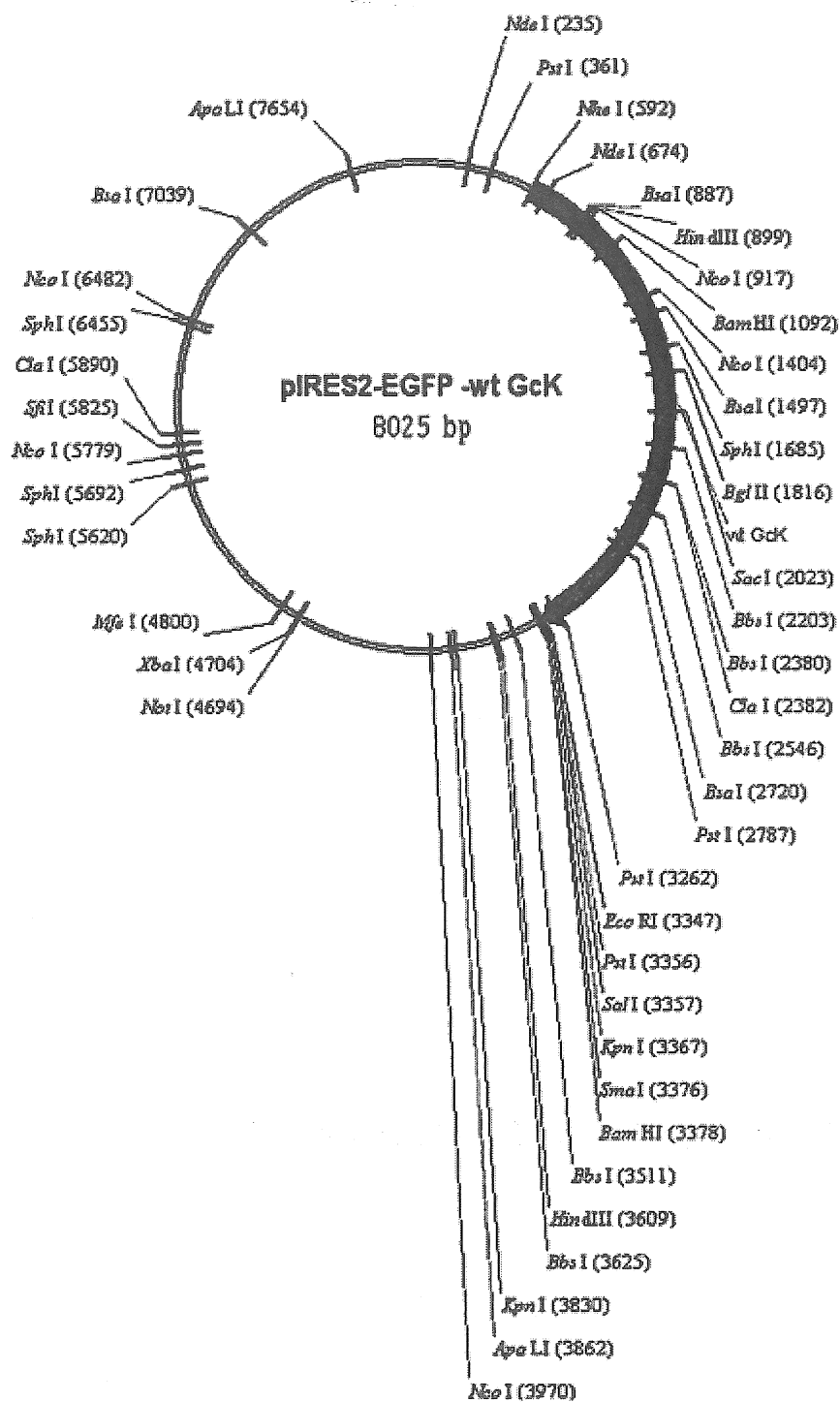


Fig. 3

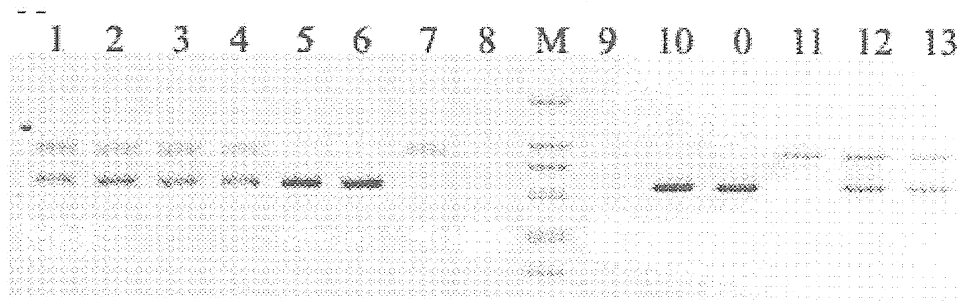


Fig. 4

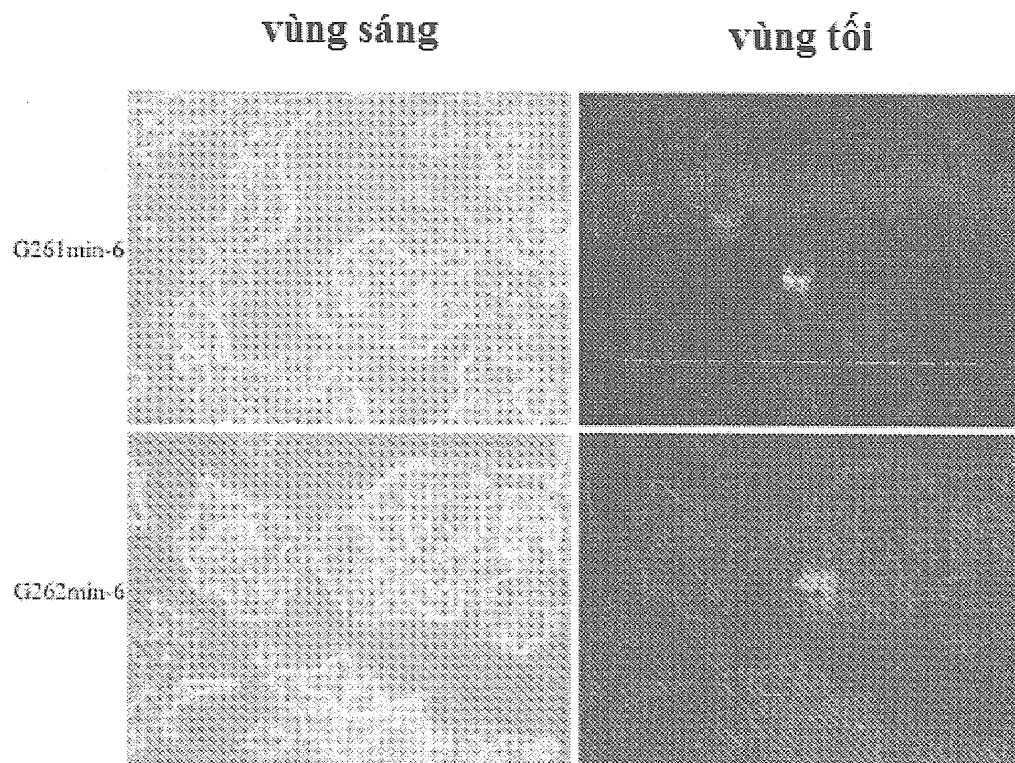


Fig. 5

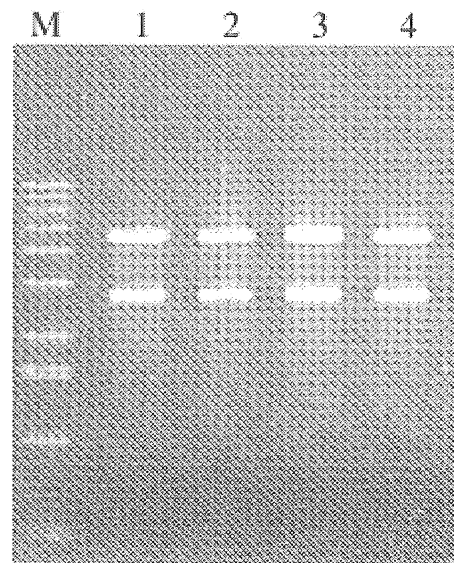


Fig. 6

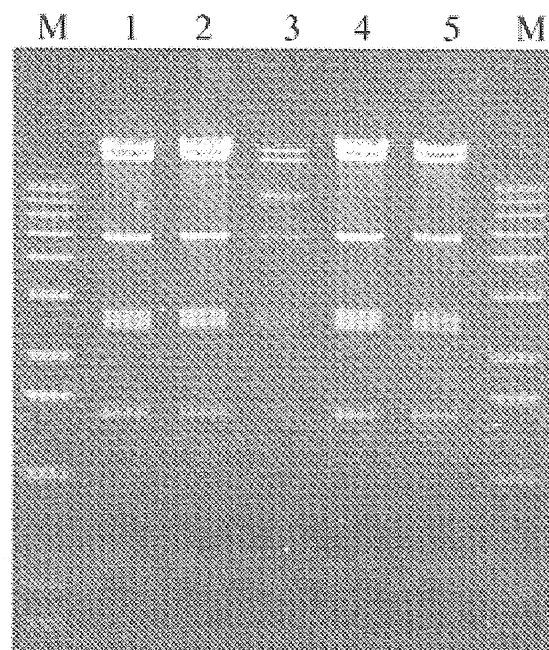


Fig. 7