



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

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



1-0048138

(51)^{2020.01} C07K 14/74; C12N 5/074; C12N 5/0735 (13) B

(21) 1-2021-01837

(22) 07/09/2019

(86) PCT/IB2019/057555 07/09/2019

(87) WO2020/049535 12/03/2020

(30) 62/728,529 07/09/2018 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/01/2022 406A

(73) CRISPR THERAPEUTICS AG (CH)

Baarerstrasse 14, 6300 Zug, Switzerland

(72) Alireza REZANIA (US); Tony W. HO (US); Rebeca RAMOS-ZAYAS (US).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

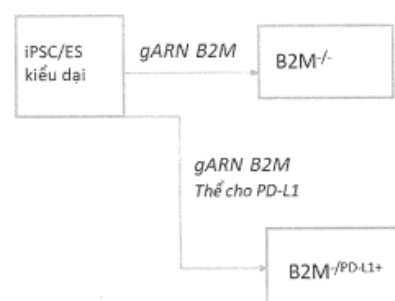
(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA TẾ BÀO CHO VẠN NĂNG

(21) 1-2021-01837

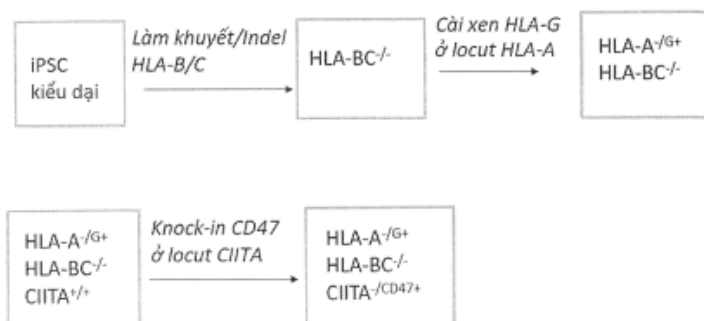
(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vận năng. Tế bào cho vận năng chứa ít nhất là một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng mức độ biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp, và tùy ý ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót.

	Tế bào neuron	Tế bào tuyến tụy	Các dòng khác
Các ví dụ về đích	Knock-out B2M Knock-in thể dung hợp B2M/HLA-G	Knock-out B2M Knock-out CIITA Knock-in PD-L1 Knock-in CTLA4-Ig	Knock-out HLA-ABC Knock-in HLA-G Knock-out CIITA Knock-in CD47
Các đích/vùng khởi động khác	Các gen quyết định sự sống sót tế bào Các công tắc tự sát: HSV-tk, iCaspase9 Các vùng khởi động: vùng khởi động cơ định, vùng khởi động đặc hiệu tế bào, vùng khởi động nội sinh		

HÌNH 1A



HÌNH 1B



HÌNH 1C

Đơn liên quan

[0001] Đơn này hưởng quyền lợi của Đơn Tạm Thời Mỹ Số 62/728,529 nộp ngày 7 tháng 9 năm 2018, phần bộc lộ của nó được kết hợp ở đây nhằm mục đích tham khảo.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[0002] Sáng chế đề cập đến lĩnh vực biên tập gen và, theo một số phương án, đề cập đến sự cải biến di truyền nhằm mục đích tạo ra tế bào mà tương thích với nhiều đối tượng, ví dụ như, tế bào cho vạn năng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[0003] Nhiều phương pháp đã được đưa ra để khắc phục sự thải bỏ dị thân của tế bào được cấy hoặc được ghép bao gồm phù hợp HLA, các con đường phong bế mà kích hoạt sự hoạt hóa tế bào T bằng kháng thể, sử dụng hỗn hợp của các thuốc kìm hãm miễn dịch, và liệu pháp tế bào tự thân. Chiến lược khác để làm tiêu tan sự thải bỏ mảnh ghép gồm sự làm giảm thiểu sự khác biệt dị thân giữa tế bào được cấy hoặc được ghép và thể nhận. Kháng nguyên tế bào bạch cầu người được biểu hiện trên bề mặt tế bào (HLA), các phân tử được mã hóa bởi các gen nằm trong phức hệ tương thích mô chủ yếu của người trên nhiễm sắc thể 6, là các chất điều biến chính của sự thải bỏ miễn dịch. Sự bắt cặp nhầm của gen HLA đơn lẻ giữa thể cho và đối tượng có thể gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ (Fleischhauer K. et al. "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44," N Engl J Med., 1990, 323:1818–1822). Các gen HLA được chia thành MHC lớp I (MHC-I) và MHC lớp II (MHC-II). Các gen MHC-I (HLA-A, HLA-B, và HLA-C) được biểu hiện ở hầu hết tất cả các loại tế bào mô, trình diện peptit được xử lý bằng kháng nguyên "không tự thân" với tế bào T CD8+, nhờ đó thúc đẩy sự hoạt hóa của chúng thành tế bào T CD8+ dung giải tế bào. Tế bào được cấy hoặc được ghép biểu hiện các phân tử MHC-I "không tự thân" sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh được định hướng ở các tế bào này và cuối cùng dẫn đến sự chết đi của chúng do tế bào T CD8+ dung giải tế bào đã được hoạt hóa. Protein MHC-I ban đầu được kết hợp với beta-2-microglobulin (B2M) trong lưới nội chất, mà thiết yếu để tạo thành các phân tử MHC-I chức năng trên bề mặt tế bào.

[0004] Trái ngược với sự biểu hiện tế bào rộng của các gen MHC-I, sự biểu hiện của gen MHC-II bị giới hạn ở tế bào trình diện kháng nguyên chẳng hạn như tế bào phân nhánh, đại thực bào, và tế bào B. Gen kháng nguyên HLA là gen đa hình nhất được quan sát thấy trong hệ gen người (Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow transplantation--how much is enough?" *N Engl J Med.*, 2001, 345:1842–1844). Sự tạo ra của tế bào "cho vụn năng" mà tương thích với kiểu gen HLA bất kỳ tạo ra chiến lược thay thế mà có thể giải quyết vấn đề về sự thải bỏ miễn dịch và chi phí kinh tế liên quan của các phương pháp hiện nay đối với sự xâm nhập miễn dịch.

[0005] Để tạo ra dòng tế bào cho vụn năng này, một phương pháp trước đây là phá vỡ về mặt chức năng sự biểu hiện của các gen lớp MHC-I và MHC-II. Điều này có thể đạt được thông qua sự phá vỡ di truyền, ví dụ như, của cả hai alen di truyền mã hóa cho chuỗi nhẹ MHC-I, B2M. Dòng tế bào KO B2M thu được và dẫn xuất của nó sẽ được mong đợi là thể hiện MHC-I bề mặt giảm mạnh và do đó, khả năng sinh miễn dịch giảm đối với tế bào T CD8+ dị thân. Phương pháp nhắm đích nucleaza tác động giống chất hoạt hóa phiên mã (transcription activator-like effector nuclease - TALEN) đã được sử dụng để tạo ra dòng hESC thiếu hụt B2M bằng cách làm khuyết một ít nucleotit trong exon 2 của gen B2M (Lu, P. et al., "Generating hypoinmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin," *Stem Cell Rev.* 2013, 9:806–813). Mặc dù dòng hESC được nhắm đích B2M dường như là thiếu hụt HLA-I bề mặt, chúng được phát hiện là vẫn chứa mARN đặc hiệu đối với B2M và MHC-I. Các mARN B2M và MHC-I được biểu hiện ở các cấp độ tương đương với các mARN của hESC không được nhắm đích (cả cơ định và được gây cảm ứng bởi IFN- γ IFN- γ). Do đó, có sự quan tâm về các dòng hESC được nhắm đích B2M TALEN có thể biểu hiện MHC-I bề mặt tế bào còn lại mà đủ để gây ra sự thải bỏ miễn dịch, chẳng hạn như đã được quan sát thấy với tế bào chuột nhắt B2M2/2 mà cũng biểu hiện mARN B2M (Gross, R. and Rappuoli, R. "Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation," *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90:3913–3917). Mặc dù dòng hESC được nhắm đích B2M TALEN không được đánh giá về các sự kiện phân cắt lệch đích, sự xảy ra của sự phân cắt không đặc hiệu khi sử dụng TALEN vẫn là vấn đề đáng chú ý mà đặt ra mối quan tâm chính về độ an toàn khi sử dụng lâm sàng chúng (Grau, J. et al. "TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction," *Bioinformatics*, 2013, 29:2931–2932; Guilinger J.P. et al. "Broad specificity profiling of

TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity," *Nat Methods* 2014, 11:429–435). Hơn nữa, một báo cáo khác tạo ra tế bào IPS mà trốn thoát khỏi sự nhận diện dị thân bằng cách knock out (làm bất hoạt) alen B2M thứ nhất và knock in (sự thay thế một-một) gen HLA-E ở alen B2M thứ hai, mà dẫn đến sự biểu hiện bề mặt của dime hoặc trime HLA-E khi không có sự biểu hiện bề mặt của HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C (Gornalusse, G.G. et al., "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells," *Nature Biotechnology*, 2017, 35, 765-773).

[0006] Giới hạn có thể có của một số chiến lược nêu trên là tế bào âm tính MHC lớp I dễ bị dung giải bởi tế bào giết tự nhiên (NK) vì các phân tử HLA đóng vai trò làm các chất ức chế phối tử chính đối với tế bào giết tự nhiên (NK). Tế bào NK của vật chủ đã được chứng minh là loại bỏ tế bào cho B2M^{-/-} được cấy hoặc được ghép, và hiện tượng tương tự xảy ra *in vitro* với các dòng bạch cầu người âm tính MHC lớp-I (Bix, M. et al., "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice," *Nature*, 1991, 349, 329–331; Zarcone, D. et al., "Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity," *Cancer Res.* 1987, 47, 2674–2682). Do đó, có nhu cầu cải thiện dựa trên các phương pháp trước đây để tạo ra tế bào cho vạn năng mà có thể tránh khỏi đáp ứng miễn dịch cũng như là nhu cầu tạo ra tế bào mà có thể sống sót sau cấy ghép. Như mô tả trong bản mô tả này, tế bào sống sót sau cấy ghép có thể được dàn xếp bởi vật chủ bằng các con đường khác không phụ thuộc vào sự thải bỏ dị thân ví dụ như, sự giảm oxy huyết, các loại oxy phản ứng, sự mất đi chất dinh dưỡng, và căng thẳng oxy hóa. Cũng được mô tả trong bản mô tả này là, sự đưa vào theo cách di truyền của các yếu tố sống sót (gen và/hoặc protein) có thể giúp cho tế bào sống sót sau cấy ghép. Như mô tả trong bản mô tả này, dòng tế bào cho vạn năng có thể kết hợp các tính chất mà nhắm đến cả sự thải bỏ dị thân và sự sống sót sau cấy ghép.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

[0007] Theo một số khía cạnh, sáng chế bao hàm phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng. Phương pháp thứ nhất bao gồm bước cải biến di truyền tế bào bằng cách (i) đưa vào xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ trong hệ gen của tế bào tại vị trí ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của

phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) đưa vào trong hệ gen của tế bào cài xen ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp, tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của (i), nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng. Phương pháp thứ hai bao gồm bước cải biến di truyền tế bào bằng cách (i) đưa vào xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ trong hệ gen của tế bào tại vị trí ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) đưa vào trong hệ gen của tế bào cài xen ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp vào locut ẩn chứa an toàn, nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng làm tăng khả năng tránh miễn dịch và/hoặc mức sống sót của tế bào so với tế bào không được cải biến.

[0008] Theo một số phương án, ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là gen MHC-I được chọn từ HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C, gen MHC-II được chọn từ HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, hoặc HLA-DR, hoặc gen được chọn từ B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, hoặc RFXANK.

[0009] Theo một số phương án, ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp là một hoặc nhiều polynucleotit mà mã hóa cho một hoặc nhiều trong số PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47. Theo một số phương án, ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh. Theo một số phương án, gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc kiểu tế bào, trong đó tùy ý gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CMV, EF1a, PGK, CAG, hoặc UBC.

[00010] Theo một số phương án, xóa bỏ và/hoặc sự cài xen của (i) nằm ở trong hoặc ở gần B2M, và sự cài xen của (ii) là polynucleotit mã hóa cho PD-L1 hoặc HLA-E.

[00011] Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là yếu tố sống sót là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho MANF, mà làm tăng mức độ

biểu hiện của MANF tương quan với tế bào không được cải biến; hoặc xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ ở trong hoặc ở gần gen mà mã hóa cho ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK, mà hạ thấp hoặc loại bỏ sự biểu hiện của ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, polynucleotit mà mã hóa cho MANF được cài xen vào locut ẩn chứa an toàn hoặc vào gen thuộc về MHC-I, MHC-II, hoặc chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II.

[00012] Theo một số phương án, việc cải biến di truyền tế bào bao gồm việc phân phối ít nhất là một hệ thống endonucleaza được dẫn bằng ARN vào tế bào. Theo một số phương án, ít nhất là một hệ thống endonucleaza được dẫn bằng ARN là hệ thống CRISPR chứa CRISPR nucleaza và ARN dẫn. Theo một số phương án, CRISPR nucleaza là Cas9, Cpf1, chất tương đồng của chúng, phiên bản cải biến của chúng, phiên bản được tối ưu hóa codon của chúng, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo một số phương án, CRISPR nucleaza là Cas9 *S. pyogenes*. Theo một số phương án, CRISPR nucleaza chứa tín hiệu định vị nhân (nuclear localization signal - NLS) đầu tận cùng N và/hoặc NLS đầu tận cùng C. Theo một số phương án, CRISPR nucleaza và ARN dẫn có mặt theo tỉ lệ khối lượng bằng 1:1.

[00013] Theo một số phương án, xóa bỏ và/hoặc sự cài xen của (i) nằm ở trong hoặc ở gần locut gen B2M, và sự cài xen của (ii) là polynucleotit mã hóa cho PD-L1. Theo một số phương án, ARN dẫn dùng cho (i) và (ii) chứa trình tự nucleotit chứa ít nhất là một trong số các SEQ ID NO: 1-3 hoặc các SEQ ID NO: 35-44. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được kẹp hai bên bởi (a) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng nằm bên trái của vị trí trong (i) và (b) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng nằm bên phải của vị trí trong (i). Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được cài xen vào locut gen B2M ở trong vòng 50 cặp bazơ của vị trí trong (i). Theo một số phương án, (a) trong polynucleotit chủ yếu gồm có trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 13, và (b) trong polynucleotit chủ yếu gồm có trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 19. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh, trong đó tùy ý gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.

[00014] Theo một số phương án, tế bào là tế bào động vật có vú, trong đó tùy ý tế bào là tế bào người. Theo một số phương án, tế bào là tế bào gốc, trong đó tùy ý tế bào gốc

là tế bào gốc đa năng (PSC), tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC). Theo một số phương án, tế bào là tế bào biệt hóa hoặc tế bào sinh dưỡng.

[00015] Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn. Theo một số phương án, tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng là tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, hoặc tế bào tiền thân thần kinh. Theo một số phương án, tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết chẳng hạn như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào của hệ miễn dịch.

[00016] Theo khía cạnh khác, sáng chế bao hàm một số lượng các tế bào cho vạn năng được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, một số lượng các tế bào cho vạn năng có thể được duy trì trong một khoảng thời gian và trong điều kiện đủ để tế bào trải qua sự biệt hóa.

[00017] Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất hợp phần của tế bào mà chứa (i) ít nhất là một xóa bỏ ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) ít nhất là một sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của xóa bỏ di truyền của (i).

[00018] Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp dùng tế bào cho vạn năng bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này cho đối tượng cần điều trị. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước thu lấy hoặc đã thu được một số lượng các tế bào cho vạn năng như được bộc lộ trong bản mô tả này sau khi biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn; và dùng tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn cho đối tượng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp thu lấy tế bào để dùng cho đối tượng cần chúng. Phương pháp này bao gồm bước (i) thu lấy hoặc đã thu được tế bào cho vạn năng bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này, và (ii) duy trì tế bào cho vạn năng trong một khoảng thời gian và trong điều kiện đủ để tế bào biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn. Theo một số phương án, tế bào tiền thân bị giới hạn

theo dòng là tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, hoặc tế bào tiền thân thần kinh. Theo một số phương án, tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết chẳng hạn như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào của hệ miễn dịch. Theo một số phương án, đối tượng là người mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh, trong đó bệnh có thể là bệnh có khả năng di truyền.

[00019] Mặc dù bản bộc lộ này có thể có các cải biến và các dạng thay thế khác nhau, các phương án cụ thể của chúng được thể hiện bằng cách lấy ví dụ trong các hình vẽ và sẽ được mô tả chi tiết trong bản mô tả này. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các hình vẽ và phần mô tả chi tiết được thể hiện ở đây không được dự định là làm giới hạn sáng chế ở các phương án cụ thể được bộc lộ, mà ngược lại, dự định là bao hàm tất cả các cải biến, dạng tương đương, và dạng thay thế nằm trong tinh thần và phạm vi của bản bộc lộ này như được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

[00020] Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng trong phần mô tả chi tiết sau đây của các phương án được ưu tiên của sáng chế này, có tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[00021] Hình 1A-1C nêu các chiến lược biên tập gen cụ thể đối với sự xâm nhập miễn dịch. Hình 1A là bảng mà mô tả các cải biến ví dụ đối với sự xâm nhập miễn dịch trong các loại tế bào xác định. Hình 1B nêu các chiến lược ví dụ để cải biến locut B2M. Hình 1C nêu các chiến lược ví dụ để cải biến các locut HLA-A, HLA-B/C, và CIITA.

[00022] Hình 2 minh họa một phần của gen B2M (SEQ ID NO: 6) và các vị trí của gARN (B2M-1, B2M-2, và B2M-3) để nhắm đích exon 1. Cũng được thể hiện là các vị trí của các đoạn mồi PCR (B2MF2 và B2MR2).

[00023] Hình 3A-3C thể hiện kết quả từ việc sàng lọc gARN B2M trong dòng tế bào TC-1133 iPSC. Hình 3A là biểu đồ thể hiện tần suất indel (sự cài xen+xóa bỏ) của mỗi gARN B2M. gARN B2M-1 tạo ra tần suất indel bằng $2,5\% \pm 1,1\%$ (n=2). gARN B2M-2 tạo ra tần suất indel bằng $87,6\% \pm 14,1\%$ (n=2). gARN B2M-3 tạo ra tần suất indel

bằng $63,9\% \pm 0,9\%$ ($n=2$). Hình 3B và Hình 3C là các biểu đồ thể hiện tóm tắt của sự phân bố của kết quả indel đối với gARN B2M-2 (Hình 3B) và gARN B2M-3 (Hình 3C).

[00024] Hình 4A-4B thể hiện kết quả của sự knock-out (KO) B2M ở iPSC bằng cách sử dụng gARN B2M-2. Hình 4A là biểu đồ thể hiện tóm tắt của sự phân bố của kết quả indel đối với gARN B2M-2 ở iPSC. Hình 4B thể hiện các dòng đồng hợp tử ("Homo") đối với sự knock-out (KO) B2M và các dòng dị hợp tử ("Hets") đối với KO B2M.

[00025] Hình 5 thể hiện sự đánh giá của các dòng iPSC KO B2M. Cả ba dòng KO B2M được thử nghiệm đều thể hiện sự biểu hiện mRNA giảm đi của B2M tương quan với tế bào kiểu đại, hoặc không được cải biến.

[00026] Hình 6A-6D thể hiện sự biểu hiện của B2M và HLA-ABC ở các dòng iPSC KO B2M sau khi xử lý 47 giờ bằng interferon-gamma. Hình 6A thể hiện sự biểu hiện ở tế bào kiểu đại. Hình 6B thể hiện sự biểu hiện ở dòng KO B2M C4. Hình 6C thể hiện sự biểu hiện ở dòng KO B2M C9. Hình 6D thể hiện sự biểu hiện ở dòng KO B2M C12.

[00027] Hình 7A-7D chứng minh sự đa năng của các dòng iPSC KO B2M thông qua sự đánh giá của mức độ biểu hiện của SSEA-4 và TRA-1-60. Hình 7A thể hiện sự biểu hiện ở tế bào kiểu đại. Hình 7B thể hiện sự biểu hiện ở dòng KO B2M C4. Hình 7C thể hiện sự biểu hiện ở dòng KO B2M C9. Hình 7D thể hiện sự biểu hiện ở dòng KO B2M C12.

[00028] Hình 8 thể hiện phân tích TIDE của việc cắt gARN B2M trong tế bào CyT49. gARN B2M -1, -2, hoặc -3 được thử nghiệm.

[00029] Hình 9A-9B thể hiện đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện B2M có và không có IFN- γ trong tế bào WT CyT49 (Hình 9A) và tế bào CyT49 đã được biên tập (Hình 9B).

[00030] Hình 10 thể hiện bản đồ plasmit của vector cho B2M-CAGGS-PD-L1 đối với HDR.

[00031] Hình 11 thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự đa năng của tế bào gốc KO B2M + KI PD-L1 CyT49. Các dòng được tạo dẫn xuất có >99% dương tính kép đối với OCT4 và SOX2, hai yếu tố phiên mã sống còn đối với sự đa năng. IgG được sử dụng làm đối chứng âm.

[00032] Hình 12A-12B thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng của các dòng tế bào gốc có nguồn gốc từ WT CyT49 (Hình 12A) và KO B2M/KI PD-L1 (Hình 12B). Tế bào WT điều hòa tăng sự biểu hiện B2M khi đáp ứng với IFN γ . Các dòng KO B2M/KI PD-L1 biểu hiện đầy đủ PD-L1 và không biểu hiện B2M có hoặc không có sự xử lý IFN γ . NT-1= không xử lý. INTG-1= tế bào đã được xử lý 48 giờ bằng 50 ng/ml IFN γ .

[00033] Hình 13 thể hiện bản đồ plasmit của vector cho B2M-CAGGS-HLA-E đối với HDR.

[00034] Hình 14 thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự đa năng của tế bào gốc KO B2M/KI HLA-E CyT49. Các dòng được tạo dẫn xuất có >99% dương tính kép đối với OCT4 và SOX2, hai yếu tố phiên mã sống còn đối với sự đa năng. IgG được sử dụng làm đối chứng âm.

[00035] Hình 15 thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng của WT CyT49 và dòng tế bào gốc KO B2M/KI HLA-E CyT49. Tế bào WT điều hòa tăng sự biểu hiện HLA-A,B,C khi đáp ứng với IFN γ . Dòng KO B2M/KI HLA-E không biểu hiện HLA-A,B,C có hoặc không có sự xử lý IFN γ . IFN γ = 50 ng/ml. Tế bào được xử lý bằng IFN γ trong thời gian 48 giờ.

[00036] Hình 16 thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự biểu hiện HLA-E của dòng tế bào gốc KO B2M/KI HLA-E CyT49. Dòng không được biên tập được sử dụng làm đối chứng đối với sự biểu hiện của HLA-E.

[00037] Hình 17 thể hiện sự đếm tế bào theo dòng đối với FOXA2 và SOX17 ở tế bào Giai đoạn 1 (Nội Bì Chính Thức) đã biệt hóa từ hESC kiểu đại, KI PD-L1/KO B2M, hoặc B2MKO.

[00038] Hình 18 thể hiện tỉ lệ phần trăm định lượng của sự biểu hiện FOXA2 và SOX17 ở tế bào Giai đoạn 1 (Nội Bì Chính Thức) đã biệt hóa từ tế bào kiểu đại, KI PD-L1/KO B2M, hoặc KO B2M.

[00039] Hình 19 thể hiện tỉ lệ phần trăm định lượng của sự biểu hiện CHGA, PDX1, và NKX6.1 ở tế bào Giai đoạn 4 (PEC) đã biệt hóa từ tế bào kiểu đại, KO B2M, KI PD-L1/KO B2M (V1A), hoặc KI HLA-E/KO B2M (V2A).

[00040] Hình 20 thể hiện quần thể dị thể của tế bào ở Giai đoạn 4 (PEC).

[00041] Hình 21A-21B thể hiện sự biểu hiện gen được chọn trong khoảng thời gian biệt hóa ở tế bào đã biệt hóa từ tế bào kiểu dại, PD-L1KI/B2MKO, hoặc B2MKO (Hình 21A) và tế bào đã biệt hóa từ tế bào KO B2M/KI HLA-E (V2A) (Hình 21B).

[00042] Hình 22A-22F thể hiện sự biểu hiện B2M và PD-L1 ở giai đoạn PEC ở tế bào đã biệt hóa từ tế bào kiểu dại, KI PD-L1/KO B2M, hoặc KO B2M. Hình 22A thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào kiểu dại. Hình 22B thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào KO B2M. Hình 22C thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào KI PD-L1/KO B2M. Hình 22D thể hiện sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào kiểu dại. Hình 22E thể hiện sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào KO B2M. Hình 22F thể hiện sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào KI PD-L1/KO B2M.

[00043] Hình 23A-23F thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I và lớp II ở giai đoạn PEC ở tế bào đã biệt hóa từ tế bào kiểu dại, KI PD-L1/KO B2M, hoặc KO B2M. Hình 23A thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I ở tế bào kiểu dại. Hình 23B thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I ở tế bào KO B2M. Hình 23C thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I ở tế bào KI PD-L1/KO B2M. Hình 23D thể hiện sự biểu hiện PD-L1 MHC lớp II ở tế bào kiểu dại. Hình 23E thể hiện sự biểu hiện MHC lớp II ở tế bào KO B2M. Hình 23F thể hiện sự biểu hiện MHC lớp II ở tế bào KI PD-L1/KO B2M.

[00044] Hình 24A-24D thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự hoạt hóa tế bào T bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh CFSE. Tế bào T CD3+ sơ cấp ở người được đồng ủ với PEC có nguồn gốc từ các dòng CyT49 WT, KO B2M, hoặc KO B2M/KI PD-L1. Hình 24A thể hiện sự hoạt hóa ở tế bào kiểu dại. Hình 24B thể hiện sự hoạt hóa ở tế bào KI PD-L1/KO B2M. Hình 24C thể hiện sự hoạt hóa ở tế bào KO B2M. Hình 24D tóm tắt sự hoạt hóa tế bào T ở các tế bào khác nhau. ANOVA một chiều ($\alpha = 0,05$ với kiểm định so sánh nhiều thành phần Dunnett) với "một mình CFSE-T" được đặt làm đối chứng. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. n.s. = không đáng kể.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

[00045] **Xóa bỏ:** Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "xóa bỏ", mà có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với các thuật ngữ "xóa bỏ di truyền" hoặc "knock-out", thường dùng để chỉ cải biến di truyền trong đó vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen được loại bỏ

bằng phương pháp sinh học phân tử bất kỳ, ví dụ như, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, bằng cách phân phối đến vị trí của ADN hệ gen endonucleaza và ít nhất là một gARN. Số lượng bất kỳ của nucleotit có thể được làm khuyết. Theo một số phương án, xóa bỏ gồm sự loại bỏ của ít nhất là một, ít nhất là hai, ít nhất là ba, ít nhất là bốn, ít nhất là năm, ít nhất là mười, ít nhất là mười lăm, ít nhất là hai mươi, hoặc ít nhất là 25 nucleotit. Theo một số phương án, xóa bỏ gồm sự loại bỏ của 10-50, 25-75, 50-100, 50-200, hoặc nhiều hơn 100 nucleotit. Theo một số phương án, xóa bỏ gồm sự loại bỏ của toàn bộ gen đích, ví dụ như, gen B2M. Theo một số phương án, xóa bỏ gồm sự loại bỏ của một phần của gen đích, ví dụ như, tất cả hoặc một phần của gen khởi đầu và/hoặc trình tự mã hóa của gen B2M. Theo một số phương án, xóa bỏ gồm sự loại bỏ của chất điều hòa phiên mã, ví dụ như, gen khởi đầu, của gen đích. Theo một số phương án, xóa bỏ gồm sự loại bỏ của tất cả hoặc một phần của vùng mã hóa nhờ đó sản phẩm được biểu hiện bình thường bởi vùng mã hóa không còn được biểu hiện nữa, được biểu hiện dưới dạng bị cắt cụt, hoặc được biểu hiện ở mức độ giảm. Theo một số phương án, xóa bỏ dẫn đến sự giảm đi của sự biểu hiện của gen tương quan với tế bào không được cải biến.

[00046] *Endonucleaza:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "endonucleaza" thường dùng để chỉ enzym mà phân cắt liên kết phosphodiester ở trong polynucleotit. Theo một số phương án, endonucleaza phân cắt đặc hiệu liên kết phosphodiester ở trong polynucleotit ADN. Theo một số phương án, endonucleaza là nucleaza ngón tay kẽm (ZFN), nucleaza tác động giống chất hoạt hóa phiên mã (TALEN), endonucleaza về nhà (HE), meganucleaza, MegaTAL, hoặc endonucleaza kết hợp CRISPR. Theo một số phương án, endonucleaza là endonucleaza được dẫn bằng ARN. Theo các khía cạnh nhất định, endonucleaza được dẫn bằng ARN là CRISPR nucleaza, ví dụ như, CRISPR Cas9 endonucleaza Kiểu II hoặc CRISPR Cpf1 endonucleaza Kiểu V. Theo một số phương án, endonucleaza là Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (also known as Csn1 và Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, hoặc Cpf1 endonucleaza, hoặc chất tương đồng của chúng, sự tái tổ hợp của phân tử có trong tự nhiên của chúng, phiên bản được tối ưu hóa codon của chúng, hoặc phiên bản

cải biến của chúng, hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo một số phương án, endonucleaza có thể đưa vào một hoặc nhiều chỗ đứt sợi đơn (SSB) và/hoặc một hoặc nhiều chỗ đứt sợi kép (DSB).

[00047] *Cải biến di truyền:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cải biến di truyền" thường dùng để chỉ vị trí của ADN hệ gen mà đã được biên tập hoặc thao tác di truyền bằng cách sử dụng phương pháp sinh học phân tử bất kỳ, ví dụ như, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, bằng cách phân phối đến vị trí của ADN hệ gen endonucleaza và ít nhất là một gARN. Sự cải biến di truyền ví dụ bao gồm sự cài xen, xóa bỏ, sự nhân đôi, sự đảo, và sự chuyển vị, và dạng kết hợp của chúng. Theo một số phương án, cải biến di truyền là xóa bỏ. Theo một số phương án, cải biến di truyền là sự cài xen. Theo phương án khác, cải biến di truyền là đột biến cài xen-làm khuyết (hay indel), nhờ đó khung đọc của gen đích được dịch chuyển dẫn đến sản phẩm gen được thay đổi hoặc không có sản phẩm gen.

[00048] *ARN dẫn (gARN):* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ARN dẫn" hoặc "gARN" thường dùng để chỉ axit ribonucleic ngắn mà có thể tương tác với, ví dụ như, liên kết với, endonucleaza và liên kết, hoặc lai hóa với vị trí hoặc vùng hệ gen đích. Theo một số phương án, gARN là ARN dẫn đơn phân tử (sgARN). Theo một số phương án, gARN có thể chứa vùng mở rộng đoạn đệm. Theo một số phương án, gARN có thể chứa vùng mở rộng tracrARN. Theo một số phương án, gARN là sợi đơn. Theo một số phương án, gARN chứa nucleotit có trong tự nhiên. Theo một số phương án, gARN là gARN được cải biến hóa học. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học là gARN mà chứa ít nhất là một nucleotit có sự cải biến hóa học, ví dụ như, sự cải biến đường 2'-O-metyl. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học chứa khung axit nucleic được cải biến. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học chứa gốc 2'-O-methyl-phosphorothioat. Theo một số phương án, gARN có thể được tạo phức hợp từ trước với ADN endonucleaza.

[00049] *Cài xen:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cài xen" mà có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với các thuật ngữ "cài xen di truyền" hoặc "knock-in", thường dùng để chỉ cải biến di truyền trong đó polynucleotit được đưa vào hoặc được bổ sung vào vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen bằng phương pháp sinh học phân tử bất kỳ, ví dụ như, phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, bằng cách phân phối đến

vị trí của ADN hệ gen endonucleaza và ít nhất là một gARN. Theo một số phương án, sự cài xen có thể xảy ra ở trong hoặc ở gần vị trí của ADN hệ gen mà đã là vị trí của sự cải biến di truyền trước đó, ví dụ như, xóa bỏ hoặc đột biến cài xen-làm khuyết. Theo một số phương án, sự cài xen xảy ra tại vị trí của ADN hệ gen mà gổì lên một phần, gổì lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong vị trí của sự cải biến di truyền trước đó, ví dụ như, xóa bỏ hoặc đột biến cài xen-làm khuyết. Theo một số phương án, sự cài xen xảy ra ở locut ẩn chứa an toàn. Theo một số phương án, sự cài xen gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa cho protein được quan tâm. Theo một số phương án, sự cài xen gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp. Theo một số phương án, sự cài xen gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa yếu tố sống sót. Theo một số phương án, sự cài xen gồm sự đưa vào của gen khởi đầu ngoại sinh, ví dụ như, gen khởi đầu cơ định, ví dụ như, gen khởi đầu CAG. Theo một số phương án, sự cài xen gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa cho gen không mã hóa. Nhìn chung, polynucleotit cần được cài xen được kẹp hai bên bởi các trình tự (ví dụ như, các nhánh tương đồng) có độ tương đồng trình tự đáng kể với ADN hệ gen ở hoặc ở gần vị trí của sự cài xen.

[00050] *Phức hệ tương thích mô chủ yếu lớp I (MHC-I)*: Như dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "phức hệ tương thích mô chủ yếu lớp I" hoặc "MHC-I" thường dùng để chỉ lớp của các phân tử sinh học mà được phát hiện trên bề mặt tế bào của tất cả các tế bào có nhân ở động vật có xương sống, bao gồm động vật có vú, ví dụ như, người; và có chức năng thể hiện peptit của kháng nguyên không tự thân hoặc lạ, ví dụ như, protein, từ trong tế bào (*tức là* bào tương) cho tế bào T gây độc tế bào, ví dụ như, tế bào T CD8+, để kích thích đáp ứng miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử sinh học MHC-I là gen MHC-I hoặc protein MHC-I. Sự tạo phức của protein MHC-I với protein beta-2 microglobulin (B2M) là cần thiết đối với sự biểu hiện bề mặt tế bào của tất cả các protein MHC-I. Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu MHC-I người (HLA) tương quan với tế bào không được cải biến gồm sự giảm đi (hay sự hạ thấp) của sự biểu hiện của gen MHC-I. Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu MHC-I người (HLA) tương quan với tế bào không được cải biến gồm sự giảm đi (hay sự hạ thấp) của sự biểu hiện bề mặt tế bào của protein MHC-I. Theo một số phương án, phân tử sinh học MHC-I là HLA-A (ID Gen

NCBI Số: 3105), HLA-B (ID Gen NCBI Số: 3106), HLA-C (ID Gen NCBI Số: 3107), hoặc B2M (ID Gen NCBI Số: 567).

[00051] *Phức hệ tương thích mô chủ yếu lớp II (MHC-II)*: Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phức hệ tương thích mô chủ yếu lớp II" hoặc "MHC-II" thường dùng để chỉ lớp của các phân tử sinh học mà thường được tìm thấy trên bề mặt tế bào của tế bào trình diện kháng nguyên ở động vật có xương sống, bao gồm động vật có vú, ví dụ như, người; và có chức năng thể hiện peptit của kháng nguyên không tự thân hoặc lạ, ví dụ như, protein, từ bên ngoài của tế bào (ngoại bào) cho tế bào T gây độc tế bào, ví dụ như, tế bào T CD8+, để kích thích đáp ứng miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào trình diện kháng nguyên là tế bào phân nhánh, đại thực bào, hoặc tế bào B. Theo một số phương án, phân tử sinh học MHC-II là gen MHC-II hoặc protein MHC-II. Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu MHC-II người (HLA) tương quan với tế bào không được cải biến gồm sự giảm đi (hay sự hạ thấp) của sự biểu hiện của gen MHC-II. Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu MHC-II người (HLA) tương quan với tế bào không được cải biến gồm sự giảm đi (hay sự hạ thấp) của sự biểu hiện bề mặt tế bào của protein MHC-II. Theo một số phương án, phân tử sinh học MHC-II là HLA-DPA (ID Gen NCBI Số: 3113), HLA-DPB (ID Gen NCBI Số: 3115), HLA-DMA (ID Gen NCBI Số: 3108), HLA-DMB (ID Gen NCBI Số: 3109), HLA-DOA (ID Gen NCBI Số: 3111), HLA-DOB (ID Gen NCBI Số: 3112), HLA-DQA (ID Gen NCBI Số: 3117), HLA-DQB (ID Gen NCBI Số: 3119), HLA-DRA (ID Gen NCBI Số: 3122), hoặc HLA-DRB (ID Gen NCBI Số: 3123).

[00052] *Polynucleotit*: Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polynucleotit", mà có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ "axit nucleic" thường dùng để chỉ phân tử sinh học mà chứa hai hoặc hơn hai nucleotit. Theo một số phương án, polynucleotit chứa ít nhất là hai, ít nhất là năm ít nhất là mười, ít nhất là hai mươi, ít nhất là 30, ít nhất là 40, ít nhất là 50, ít nhất là 100, ít nhất là 200, ít nhất là 250, ít nhất là 500, hoặc số lượng bất kỳ của nucleotit. Polynucleotit có thể là phân tử ADN hoặc ARN hoặc phân tử ADN/ARN lai. Polynucleotit có thể là sợi đơn hoặc sợi kép. Theo một số phương án, polynucleotit là vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen. Theo một số phương án, polynucleotit là gen nội sinh mà được chứa ở trong hệ gen của tế bào không được cải

biến hoặc tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, polynucleotit là polynucleotit ngoại sinh mà không được tích hợp vào trong ADN hệ gen. Theo một số phương án, polynucleotit là polynucleotit ngoại sinh mà được tích hợp vào trong ADN hệ gen. Theo một số phương án, polynucleotit là plasmid hoặc vector virus kết hợp adeno. Theo một số phương án, polynucleotit là phân tử mạch vòng hoặc mạch thẳng.

[00053] *Locut ẩn chứa an toàn:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "locut ẩn chứa an toàn" thường dùng để chỉ địa điểm, vị trí, hoặc vùng bất kỳ của ADN hệ gen mà có thể có khả năng điều tiết sự cài xen di truyền vào địa điểm, vị trí, hoặc vùng này mà không có ảnh hưởng có hại lên tế bào. Theo một số phương án, locut ẩn chứa an toàn là vùng trong gen hoặc ngoài gen. Theo một số phương án, locut ẩn chứa an toàn là vùng của ADN hệ gen mà thường là câm về mặt phiên mã. Theo một số phương án, locut ẩn chứa an toàn là locut AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF, hoặc TTR. Theo một số phương án, locut ẩn chứa an toàn được mô tả trong Sadelain, M. et al., "Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome," Nature Reviews Cancer, 2012, Vol 12, pages 51-58.

[00054] *Công tắc an toàn:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "công tắc an toàn" thường dùng để chỉ phân tử sinh học mà dẫn tế bào trải qua sự chết theo chương trình. Theo một số phương án, công tắc an toàn là protein hoặc gen. Theo một số phương án, công tắc an toàn là gen tự sát. Theo một số phương án, công tắc an toàn, ví dụ như, tymidin kinaza virus herpes simplex (HSV-tk), dẫn tế bào trải qua sự chết theo chương trình bằng cách chuyển hóa tiền dược chất, ví dụ như, ganciclovir. Theo một số phương án, sự có mặt được biểu hiện quá mức của công tắc an toàn trên bản thân nó dẫn tế bào trải qua sự chết theo chương trình. Theo một số phương án, công tắc an toàn là phân tử dựa trên p53, HSV-tk, hoặc caspase-9 có thể cảm ứng.

[00055] *Đối tượng:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đối tượng" dùng để chỉ động vật có vú. Theo một số phương án, đối tượng là động vật linh trưởng không phải là người hoặc động vật gặm nhấm. Theo một số phương án, đối tượng là người. Theo một số phương án, đối tượng mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc, bệnh hoặc rối loạn. Theo một số phương án, đối tượng có một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn.

[00056] Yếu tố sống sót: Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "yếu tố sống sót" thường dùng để chỉ protein (ví dụ như, được biểu hiện bằng cách polynucleotit như mô tả trong bản mô tả này) mà, khi tăng lên hoặc giảm đi trong tế bào, làm cho tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng, sống sót sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ sống sót cao hơn tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là yếu tố sống sót của người. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là thành viên của con đường quan trọng tham gia vào sự sống sót tế bào. Theo một số phương án, con đường quan trọng tham gia vào sự sống sót tế bào có liên quan đến sự giảm oxy huyết, các loại oxy phản ứng, sự mất đi chất dinh dưỡng, và/hoặc căng thẳng oxy hóa. Theo một số phương án, cải biến di truyền, ví dụ như, xóa bỏ hoặc sự cài xen, của ít nhất là một yếu tố sống sót làm cho tế bào cho vạn năng sống sót trong khoảng thời gian dài hơn, ví dụ như, khoảng thời gian dài hơn ít nhất là 1,05, ít nhất là 1,1, ít nhất là 1,25, ít nhất là 1,5, ít nhất là 2, ít nhất là 3, ít nhất là 4, ít nhất là 5, ít nhất là 10, ít nhất là 20, hoặc ít nhất là 50 lần, so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là ZNF143 (ID Gen NCBI Số: 7702), TXNIP (ID Gen NCBI Số: 10628), FOXO1 (ID Gen NCBI Số: 2308), JNK (ID Gen NCBI Số: 5599), hoặc MANF (ID Gen NCBI Số: 7873). Theo một số phương án, yếu tố sống sót được cài xen vào trong tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, yếu tố sống sót được làm khuyết từ tế bào, tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho MANF làm cho tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng, sống sót sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ sống sót cao hơn tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, xóa bỏ hoặc đột biến cài xen làm khuyết ở trong hoặc ở gần gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK làm cho tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng, sống sót sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ sống sót cao hơn tương quan với tế bào không được cải biến.

[00057] Yếu tố dung nạp: Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "yếu tố dung nạp" thường dùng để chỉ protein (ví dụ như, được biểu hiện bằng cách polynucleotit như mô tả trong bản mô tả này) mà, khi tăng lên hoặc giảm đi tế bào, làm cho tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng, ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ cao hơn tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, yếu tố dung nạp là yếu tố dung nạp của người. Theo một số phương

án, cải biến di truyền của ít nhất là một yếu tố dung nạp (ví dụ như, sự cài xen hoặc xóa bỏ của ít nhất là một yếu tố dung nạp) làm cho tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng. ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch với tỉ lệ cao hơn ít nhất là 1,05, ít nhất là 1,1, ít nhất là 1,25, ít nhất là 1,5, ít nhất là 2, ít nhất là 3, ít nhất là 4, ít nhất là 5, ít nhất là 10, ít nhất là 20, hoặc ít nhất là 50 lần so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, yếu tố dung nạp là HLA-E (ID Gen NCBI Số: 3133), HLA-G (ID Gen NCBI Số: 3135), CTLA-4 (ID Gen NCBI Số: 1493), CD47 (ID Gen NCBI Số: 961), hoặc PD-L1 (ID Gen NCBI Số: 29126). Theo một số phương án, yếu tố dung nạp được cài xen vào trong tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, yếu tố dung nạp được làm khuyết từ tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, và/hoặc PD-L1 làm cho tế bào, ví dụ như, tế bào cho vạn năng, ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ.

[00058] *Chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II" thường dùng để chỉ phân tử sinh học mà điều biến, ví dụ như, làm tăng hoặc làm giảm, sự biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu người MHC-I và/hoặc MHC-II. Theo một số phương án, phân tử sinh học là polynucleotit, ví dụ như, gen, hoặc protein. Theo một số phương án, chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II sẽ làm tăng hoặc làm giảm sự biểu hiện bề mặt tế bào của ít nhất là một protein MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II sẽ làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, chất điều hòa phiên mã là CIITA (ID Gen NCBI Số: 4261) hoặc NLRC5 (ID Gen NCBI Số: 84166). Theo một số phương án, xóa bỏ hoặc sự hạ thấp của sự biểu hiện của CIITA hoặc NLRC5 làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen MHC-I hoặc MHC-II.

[00059] *Tế bào cho vạn năng:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào cho vạn năng" thường dùng để chỉ tế bào được cải biến di truyền mà ít khả năng bị thải bỏ dị thân hơn trong quá trình cấy tế bào và/hoặc chứng tỏ sự sống sót tăng lên sau khi cấy, tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào được cải biến di truyền như mô tả trong bản mô tả này là tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng làm tăng khả năng tránh miễn dịch và/hoặc mức sống sót của tế bào

so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng làm tăng sự sống sót tế bào so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC). Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào đã biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào sinh dưỡng (ví dụ như, tế bào của hệ miễn dịch). Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được dùng cho đối tượng. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được dùng cho đối tượng mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn. Theo một số phương án, tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng là tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, hoặc tế bào tiền thân thần kinh. Theo một số phương án, tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết chẳng hạn như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào của hệ miễn dịch.

[00060] Tế bào không được cải biến: Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tế bào không được cải biến" dùng để chỉ tế bào mà không được đưa đi cải biến di truyền gồm polynucleotit hoặc gen mà mã hóa cho MHC-I, MHC-II, chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II, yếu tố sống sót, và/hoặc yếu tố dung nạp. Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC). Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể là tế bào đã biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể được chọn từ tế bào sinh dưỡng (ví dụ như, tế bào của hệ miễn dịch, ví dụ như, tế bào T, ví dụ như, tế bào T CD8+). Nếu tế bào cho vạn năng được so sánh "tương quan với tế bào không được cải biến", tế bào cho vạn năng và tế bào không được cải biến là cùng một loại tế bào hoặc có dòng tế bào bố mẹ chung, ví dụ như, iPSC cho vạn năng được so sánh tương quan với iPSC không được cải biến.

[00061] *Ở trong hoặc ở gần gen:* Như dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ở trong hoặc ở gần gen" dùng để chỉ vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen mà là thành phần intron hoặc exon của gen đó hoặc nằm gần với gen đó. Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen là ở trong gen nếu nó chứa ít nhất là một phần của intron hoặc exon của gen đó. Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen nằm ở gần gen có thể là ở đầu 5' hoặc 3' của gen đó (ví dụ như, đầu 5' hoặc 3' của vùng mã hóa của gen đó). Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen nằm ở gần gen có thể là gen khởi đầu hoặc vùng kìm hãm mà điều biến sự biểu hiện của gen đó. Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen nằm ở gần gen có thể là ở trên cùng một nhiễm sắc thể như gen đó. Theo một số phương án, vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen là ở gần gen nếu nó ở trong 50Kb, 40Kb, 30Kb, 20Kb, 10Kb, 5Kb, 1Kb, hoặc gần hơn với đầu 5' hoặc 3' của gen đó (ví dụ như, đầu 5' hoặc 3' của vùng mã hóa của gen đó).

II. Phương pháp biên tập hệ gen

[00062] Biên tập hệ gen thường dùng để chỉ quy trình cải biến trình tự nucleotit của hệ gen, tốt hơn là theo phương thức định trước hoặc chính xác. Theo một số phương án, phương pháp biên tập hệ gen như mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, hệ thống CRISPR-endonucleaza, có thể được sử dụng để cải biến di truyền tế bào như mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, để tạo ra tế bào cho vượn năng. Theo một số phương án, phương pháp biên tập hệ gen như mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, hệ thống CRISPR-endonucleaza, có thể được sử dụng để cải biến di truyền tế bào như mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, để đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà làm giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và/hoặc MHC-II hoặc thành phần khác của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến; để đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng mức độ biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp tương quan với tế bào không được cải biến; và/hoặc để đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến.

[00063] Ví dụ về phương pháp biên tập hệ gen được mô tả trong bản mô tả này bao gồm phương pháp sử dụng nucleaza định hướng vị trí để cắt axit deoxyribonucleic (ADN) tại các vị trí đích chính xác trong hệ gen, bằng cách đó tạo ra sự đứt gãy ADN sợi đơn

hoặc sợi kép tại các vị trí cụ thể ở trong hệ gen. Sự đứt gãy này có thể và thường xuyên được sửa chữa bằng các quy trình tế bào nội sinh, tự nhiên, chẳng hạn như sự sửa chữa định hướng tương đồng (HDR) và sự kết hợp đầu không tương đồng (NHEJ), như đã mô tả trong Cox *et al.*, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges", *Nature Medicine*, 2015, 21(2), 121-31. Hai quy trình sửa chữa ADN chính này gồm có họ của các con đường thay thế. NHEJ kết hợp trực tiếp các đầu ADN tạo ra từ sự đứt gãy sợi kép, đôi khi với sự mất đi hoặc sự thêm vào trình tự nucleotit, mà có thể phá vỡ hoặc tăng cường sự biểu hiện gen. HDR sử dụng trình tự tương đồng, hoặc trình tự cho, làm khuôn để cài xen trình tự ADN xác định tại điểm đứt gãy. Trình tự tương đồng có thể ở trong hệ gen nội sinh, chẳng hạn như nhiễm sắc tử chị em. Theo cách khác, trình tự cho có thể là polynucleotit ngoại sinh, chẳng hạn như plasmit, oligonucleotit sợi đơn, oligonucleotit sợi kép, oligonucleotit bộ đôi hoặc virus, mà có các vùng (ví dụ như, các nhánh tương đồng bên trái và bên phải) có độ tương đồng cao với locut được phân cắt bằng nucleaza, nhưng mà cũng có thể chứa trình tự hoặc sự thay đổi trình tự bổ sung bao gồm xóa bỏ mà có thể được kết hợp vào locut đích đã được phân cắt. Cơ chế sửa chữa thứ ba là sự kết hợp đầu qua trung gian vi tương đồng (MMEJ), còn được gọi là "NHEJ luân phiên," trong đó kết quả di truyền tương tự với NHEJ trong đó xóa bỏ và sự cài xen nhỏ có thể xảy ra tại vị trí phân cắt. MMEJ có thể tạo ra việc sử dụng các trình tự tương đồng của một ít cặp bazơ kẹp hai bên vị trí đứt ADN để tạo ra kết quả sửa chữa kết hợp đầu ADN được ưa thích hơn, và các báo cáo gần đây làm sáng tỏ thêm cơ chế phân tử của quy trình này; xem, ví dụ như, Cho and Greenberg, *Nature*, 2015, 518, 174-76; Kent *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2015, 22(3):230-7; Mateos-Gomez *et al.*, *Nature*, 2015, 518, 254-57; Ceccaldi *et al.*, *Nature*, 2015, 528, 258-62. Trong một số trường hợp, có thể dự đoán được kết quả sửa chữa có thể xảy ra dựa trên phân tích của độ vi tương đồng tiềm năng tại vị trí của sự đứt gãy ADN.

[00064] Mỗi cơ chế biên tập hệ gen này có thể được sử dụng để tạo ra sự cải biến di truyền mong muốn. Một bước trong quy trình biên tập hệ gen có thể tạo ra một hoặc hai sự đứt gãy ADN, cái sau dưới dạng sự đứt gãy sợi kép hoặc dưới dạng hai sự đứt gãy sợi đơn, trong locut đích khi ở gần vị trí của đột biến dự kiến. Điều này có thể đạt được thông qua việc sử dụng endonucleaza, như được mô tả và được minh họa trong bản mô tả này.

Hệ thống endonucleaza CRISPR

[00065] Hệ thống CRISPR-endonucleaza là cơ chế bảo vệ có trong tự nhiên ở sinh vật nhân sơ mà được dùng cho mục đích mới làm nền tảng nhắm đích ADN được dẫn bằng ARN dùng cho biên tập gen. Hệ thống CRISPR bao gồm các hệ thống Loại I, II, III, IV, V, và VI. Theo một số khía cạnh, hệ thống CRISPR là hệ thống CRISPR/Cas9 Loại II. Theo khía cạnh khác, hệ thống CRISPR là hệ thống CRISPR/Cpf1 Loại V. Hệ thống CRISPR dựa trên ADN endonucleaza, ví dụ như, Cas9, và hai ARN không mã hóa - crARN (crARN) và ARN hoạt hóa trans (tracrARN) - để nhắm đích sự phân cắt của ADN.

[00066] crARN gây ra sự nhận diện trình tự và tính đặc hiệu của phức hợp CRISPR-endonucleaza thông qua sự bắt cặp bazơ Watson-Crick, thường là với trình tự ~20 nucleotit (nt) trong ADN đích. Việc làm thay đổi trình tự của 20 nt ở đầu 5' trong crARN cho phép sự nhắm đích của phức hợp CRISPR-endonucleaza đến locut đặc hiệu. Phức hợp CRISPR-endonucleaza chỉ liên kết các trình tự ADN mà chứa trình tự ăn khớp với 20 nt đầu tiên của ARN dẫn đơn lẻ (sgARN) nếu trình tự đích được theo sau bởi mô típ ADN ngắn đặc hiệu (với trình tự NGG) được đề cập đến dưới dạng mô típ liền kề tiền đoạn đệm (PAM).

[00067] tracrARN lai hóa với đầu 3' của crARN để tạo thành cấu trúc bộ đôi ARN mà được liên kết bằng endonucleaza để tạo thành phức hợp CRISPR-endonucleaza có hoạt tính xúc tác, mà sau đó có thể phân cắt ADN đích.

[00068] Ngay khi phức hợp CRISPR-endonucleaza được liên kết với ADN tại vị trí đích, mỗi trong số hai miền nucleaza độc lập ở trong endonucleaza phân cắt một trong số các sợi ADN ba bazơ ngược dòng của vị trí PAM, để lại chỗ đứt sợi kép (DSB) trong đó cả hai sợi của ADN kết thúc ở cặp bazơ (đầu cụt).

[00069] Theo một số phương án, endonucleaza là Cas9 (protein kết hợp CRISPR 9). Theo một số phương án, Cas9 endonucleaza là từ *Streptococcus pyogenes*, mặc dù các chất tương đồng Cas9 khác có thể được sử dụng, ví dụ như, Cas9 *S. aureus*, Cas9 *N. meningitidis*, CRISPR 1 Cas9 *S. thermophilus*, CRISPR 3 Cas9 *S. thermophilus*, hoặc Cas9 *T. denticola*. Trong các trường hợp khác, CRISPR endonucleaza là Cpf1, ví dụ như, ND2006 Cpf1 *L. bacterium* hoặc BV3L6 Cpf1 *Acidaminococcus sp.*. Theo một số phương án, endonucleaza là Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (còn gọi là Csn1 và Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2,

Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, hoặc Cpf1 endonucleaza. Theo một số phương án, các biến thể kiểu đại có thể được sử dụng. Theo một số phương án, các phiên bản cải biến (ví dụ như, chất tương đồng của chúng, sự tái tổ hợp của phân tử có trong tự nhiên của chúng, phiên bản được tối ưu hóa codon của chúng, hoặc các phiên bản cải biến của chúng) của các endonucleaza trước đây có thể được sử dụng.

[00070] CRISPR nucleaza có thể được liên kết với ít nhất là một tín hiệu định vị nhân (NLS). Ít nhất là một NLS có thể nằm ở hoặc ở trong 50 axit amin của đầu tận cùng amino của CRISPR nucleaza và/hoặc ít nhất là một NLS có thể nằm ở hoặc ở trong 50 axit amin của đầu tận cùng carboxy của CRISPR nucleaza.

[00071] Các polypeptit CRISPR/Cas ví dụ bao gồm các polypeptit Cas9 như công bố trong Fonfara *et al.*, "Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems," *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: 2577-2590. Hệ thống đặt tên gen CRISPR/Cas đã trải qua sự viết lại mở rộng vì gen Cas được phát hiện ra. Fonfara và cộng sự còn đề xuất các trình tự PAM đối với polypeptit Cas9 từ các loài khác nhau.

Nucleaza ngón tay kềm

[00072] Nucleaza ngón tay kềm (ZFN) là protein dạng mô đun chứa miền liên kết ADN ngón tay kềm được thiết kế được liên kết với miền xúc tác của endonucleaza tít II FokI. Vì FokI chỉ hoạt động dưới dạng dimer, cặp ZFN phải được thiết kế để liên kết với các trình tự "nửa vị trí" đích cùng nguồn trên sợi ADN đối diện và với khoảng cách chính xác giữa chúng để có thể tạo thành dimer FokI có hoạt tính xúc tác. Khi dimer hóa miền FokI, mà bản thân nó không có tính đặc hiệu trình tự thực chất, sự đứt gãy sợi kép ADN được tạo ra giữa các nửa vị trí ZFN như là bước khởi đầu trong việc biên tập hệ gen.

[00073] Miền liên kết ADN của mỗi ZFN thường gồm có 3-6 ngón tay kềm có kiến trúc Cys2-His2 dư thừa, với mỗi ngón tay chủ yếu nhận diện bộ ba của nucleotit trên một sợi của trình tự ADN đích, mặc dù sự tương tác chéo sợi với nucleotit thứ tư cũng có thể là điều quan trọng. Sự thay đổi của axit amin của ngón tay ở các vị trí mà tạo ra sự tiếp xúc then chốt với ADN làm thay đổi tính đặc hiệu trình tự của ngón tay nhất định. Do

đó, protein ngón tay kẽm có bốn ngón tay sẽ nhận diện chọn lọc trình tự đích 12 bp, nơi mà trình tự đích là đa hợp của sự ưu tiên bộ ba đóng góp bởi mỗi ngón tay, mặc dù sự ưu tiên bộ ba có thể bị ảnh hưởng đến mức độ khác nhau bởi các ngón tay lân cận. Khía cạnh quan trọng của ZFN là chúng có thể được nhắm đích lại dễ dàng đến hầu như là địa chỉ hệ gen bất kỳ đơn giản là bằng cách cải biến ngón tay cụ thể. Trong hầu hết các ứng dụng của ZFN, protein gồm 4-6 ngón tay được sử dụng, lần lượt nhận diện 12-18 bp. Do đó, cặp ZFN thường nhận diện trình tự đích được kết hợp gồm 24-36 bp, không bao gồm vùng đệm 5-7 bp thông thường giữa các nửa vị trí. Các vị trí liên kết có thể được phân tách thêm bằng vùng đệm lớn hơn, bao gồm 15-17 bp. Trình tự đích có chiều dài này có khả năng là độc nhất trong hệ gen người, giả sử các trình tự lặp lại hoặc chất đồng đẳng gen được loại trừ trong quy trình thiết kế. Tuy vậy, sự tương tác protein-ADN ZFN không phải là tuyệt đối ở tính đặc hiệu của chúng do đó các sự kiện liên kết và phân cắt lệch đích xảy ra, dưới dạng đime khác loại giữa hai ZFN, hoặc dưới dạng đime cùng loại của ZFN này hoặc ZFN kia. Khả năng sau được triệt tiêu hiệu quả bằng cách thiết kế mặt phân cách đime hóa của miền FokI để tạo ra biến thể “cộng” và “trừ”, cũng đã biết dưới dạng biến thể đime khác loại bắt buộc, mà có thể chỉ đime hóa với nhau, và không với bản thân chúng. Việc cưỡng ép đime khác loại bắt buộc ngăn chặn sự tạo thành của đime cùng loại. Điều này làm tăng cường đáng kể tính đặc hiệu của ZFN, cũng như là nucleaza khác bất kỳ mà tuân theo các biến thể FokI này.

[00074] Nhiều hệ thống dựa trên ZFN đã được mô tả trong lĩnh vực, các cải biến của chúng được báo cáo đều đặn, và nhiều tài liệu tham khảo mô tả các quy tắc và thông số mà được sử dụng để hướng dẫn thiết kế ZFN; xem, ví dụ như, Segal et al., Proc Natl Acad Sci, 1999 96(6):2758-63; Dreier B et al., J Mol Biol., 2000, 303(4):489-502; Liu Q et al., J Biol Chem., 2002, 277(6):3850-6; Dreier et al., J Biol Chem., 2005, 280(42):35588-97; và Dreier et al., J Biol Chem. 2001, 276(31):29466-78.

Nucleaza tác động giống chất hoạt hóa phiên mã (TALEN)

[00075] TALEN là dạng khác của nucleaza dạng mô đun nhờ đó, như với ZFN, miền liên kết ADN được thiết kế được liên kết với miền FokI nucleaza, và cặp TALEN hoạt động nối tiếp để đạt được sự phân cắt ADN được nhắm đích. Sự khác biệt chính từ các ZFN là bản chất của miền liên kết ADN và tính chất nhận diện trình tự ADN đích kết hợp. Miền liên kết ADN TALEN bắt nguồn từ protein TALE, mà ban đầu được mô tả

trong vi khuẩn gây bệnh ở thực vật *Xanthomonas* sp. ALE gồm có các mảng nối tiếp của đoạn lặp 33-35 axit amin, với mỗi đoạn lặp nhận diện cặp bazơ đơn lẻ trong trình tự ADN đích mà thường có chiều dài lên đến 20 bp, tạo ra tổng chiều dài trình tự đích lên đến 40 bp. Tính đặc hiệu nucleotit của mỗi đoạn lặp được xác định bằng hai gốc biến đổi lặp (RVD), mà bao gồm chỉ hai axit amin ở các vị trí 12 và 13. Các bazơ guanin, adenin, xytosin và tymin chủ yếu được nhận diện bằng bốn RVD: lần lượt là Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp và Asn-Gly. Điều này tạo thành mã nhận diện đơn giản hơn nhiều so với ngón tay kẽm, và do đó thể hiện ưu điểm hơn cái sau đối với thiết kế nucleaza. Tuy vậy, như với ZFN, sự tương tác protein-ADN của TALEN không phải là tuyệt đối ở tính đặc hiệu của chúng, và TALEN cũng có lợi từ việc sử dụng biến thể đime khác loại bắt buộc của miền FokI để làm giảm hoạt tính lệch đích.

[00076] Các biến thể khác của miền FokI đã được tạo ra mà bị làm bất hoạt ở chức năng xúc tác của chúng. Nếu một nửa của cặp TALEN hoặc ZFN chứa miền FokI bất hoạt, thì chỉ sự phân cắt ADN sợi đơn (khía) xảy ra ở vị trí đích, chứ không phải là DSB. Kết quả này có thể so sánh được việc sử dụng thể đột biến “nickaza” CRISPR/Cas9 hoặc CRISPR/Cpf1 trong đó một trong các miền phân cắt Cas9 đã được bất hoạt. Khía ADN có thể được sử dụng để làm cho biên tập hệ gen bằng HDR, nhưng ở hiệu quả thấp hơn so với bằng DSB. Lợi ích chính là khía lệch đích được sửa chữa nhanh và chính xác, không giống như DSB, mà thiên về sự sửa chữa sai qua trung gian NHEJ.

[00077] Nhiều hệ thống dựa trên TALEN đã được mô tả trong lĩnh vực, và các cải biến của chúng được báo cáo đều đặn; xem, ví dụ như, Boch, Science, 2009 326(5959):1509-12; Mak et al., Science, 2012, 335(6069):716-9; và Moscou et al., Science, 2009, 326(5959):1501. Việc sử dụng TALEN dựa trên nền tảng "Golden Gate", hoặc sơ đồ tách dòng, đã được mô tả bởi nhiều nhóm; xem, ví dụ như, Cermak et al., Nucleic Acids Res., 2011, 39(12):e82; Li et al., Nucleic Acids Res., 2011, 39(14):6315-25; Weber et al., PLoS One., 2011, 6(2):e16765; Wang et al., J Genet Genomics, 2014, 41(6):339-47.; và Cermak T et al., Methods Mol Biol., 2015 1239:133-59.

Endonucleaza về nhà

[00078] Endonucleaza về nhà (HE) là endonucleaza đặc hiệu trình tự mà có các trình tự nhận diện dài (14-44 cặp bazơ) và phân cắt ADN với độ đặc hiệu cao – thường là tại các vị trí độc nhất trong hệ gen. Có ít nhất là sáu họ đã biết của HE như được phân loại

theo cấu trúc của chúng, bao gồm GIY-YIG, hộp His-Cis, H-N-H, PD-(D/E)xK, và tương tự Vsr mà có nguồn gốc từ phạm vi vật chủ rộng, bao gồm sinh vật nhân chuẩn, sinh vật nguyên sinh, vi khuẩn, vi khuẩn cổ, vi khuẩn lam và phago. Như với ZFN và TALEN, HE có thể được sử dụng để tạo ra DSB tại locut đích dưới dạng bước ban đầu trong việc biên tập hệ gen. Ngoài ra, một số HE tự nhiên và được thiết kế chỉ cắt sợi đơn của ADN, bằng cách đó hoạt động như là nickaza đặc hiệu vị trí. Trình tự đích lớn của HE và tính đặc hiệu mà chúng mang lại làm cho chúng trở thành các ứng viên hấp dẫn để tạo ra DSB đặc hiệu vị trí.

[00079] Nhiều hệ thống dựa trên HE đã được mô tả trong lĩnh vực, và các cải biến của chúng được báo cáo đều đặn; xem, ví dụ như, các bài phê bình của Steentoft et al., *Glycobiology*, 2014, 24(8):663-80; Belfort and Bonocora, *Methods Mol Biol.*, 2014, 1123:1-26; và Hafez and Hausner, *Genome*, 2012, 55(8):553-69.

MegaTAL / Tev-mTALEN / MegaTev

[00080] Ví dụ khác về nucleaza lai là, nền tảng MegaTAL và nền tảng Tev-mTALEN sử dụng thể dung hợp của miền liên kết ADN TALE và HE có hoạt tính xúc tác, đòi hỏi cả việc liên kết ADN có thể điều chỉnh được và tính đặc hiệu của TALE, cũng như là tính đặc hiệu trình tự phân cắt của HE; xem, ví dụ như, Boissel et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42: 2591-2601; Kleinstiver et al., *G3*, 2014, 4:1155-65; và Boissel and Scharenberg, *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1239: 171-96.

[00081] Trong sự biến đổi khác, kiến trúc MegaTev là thể dung hợp của meganucleaza (Mega) với miền nucleaza có nguồn gốc từ endonucleaza về nhà GIY-YIG I-TevI (Tev). Hai vị trí hoạt tính được định vị cách nhau ~30 bp trên cơ chất ADN và tạo ra hai DSB với các đầu dính không tương tính; xem, ví dụ như, Wolfs et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 8816-29. Dự tính rằng dạng kết hợp khác của các phương pháp dựa trên nucleaza hiện tại sẽ phát triển và hữu dụng trong việc đạt được cải biến hệ gen được nhắm đích được mô tả trong bản mô tả này.

dCas9-FokI Hoặc dCpf1-FokI và các nucleaza khác

[00082] Việc kết hợp các tính chất cấu trúc và chức năng của các nền tảng nucleaza được mô tả ở trên mang lại phương pháp khác để biên tập hệ gen mà có thể có khả năng khác phục một số thiếu sót vốn có. ví dụ như, hệ thống biên tập hệ gen CRISPR thường

sử dụng Cas9 endonucleaza đơn lẻ để tạo ra DSB. Tính đặc hiệu của việc nhắm đích được tạo ra bởi trình tự có 20 hoặc 24 nucleotit trong ARN dẫn mà trải qua sự bắt cặp bazơ Watson-Crick với ADN đích (cộng với 2 bazơ bổ sung trong trình tự PAM NAG hoặc NGG liền kề trong trường hợp của Cas9 từ *S. pyogenes*). Trình tự này đủ dài để là độc nhất trong hệ gen người, tuy nhiên, tính đặc hiệu của sự tương tác ARN/ADN không phải là tuyệt đối, với sự pha tạp đáng kể đôi khi phải chịu, cụ thể là trong nửa 5' của trình tự đích, làm giảm một cách hiệu quả số lượng của bazơ mà mang lại tính đặc hiệu. Một giải pháp cho điều này là làm bất hoạt hoàn toàn chức năng xúc tác Cas9 hoặc Cpf1 – chỉ giữ lại chức năng liên kết ADN được dẫn bằng ARN – và thay vì thể dung hợp miền FokI vào Cas9 đã bất hoạt; xem, ví dụ như, Tsai et al., Nature Biotech, 2014, 32: 569-76; và Guilinger et al., Nature Biotech., 2014, 32: 577-82. Vì FokI phải đime hóa để trở nên có hoạt tính xúc tác, cần có hai ARN dẫn để buộc hai thể dung hợp FokI ở khoảng cách gần để tạo thành đime và phân cắt ADN. Điều này về cơ bản làm tăng gấp đôi số lượng bazơ trong các vị trí đích được kết hợp, bằng cách đó làm tăng độ nghiêm ngặt của việc nhắm đích vào bằng hệ thống dựa trên CRISPR.

[00083] Ví dụ khác nữa là, thể dung hợp của của miền liên kết ADN TALE với HE có hoạt tính xúc tác, chẳng hạn như I-TevI, đòi hỏi cả việc liên kết ADN có thể điều chỉnh được và tính đặc hiệu của TALE, cũng như là tính đặc hiệu trình tự phân cắt của I-TevI, với sự mong đợi rằng sự phân cắt lệch đích có thể được giảm thêm nữa.

Endonucleaza được dẫn bằng ARN

[00084] Hệ thống endonucleaza được dẫn bằng ARN như dùng trong bản mô tả này có thể chứa trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, ít nhất là 20%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 99%, hoặc 100% so với endonucleaza ví dụ kiểu đại, ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, US2014/0068797 Trình tự ID No. 8 hoặc Sapranaukas *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 39(21): 9275-9282 (2011). Endonucleaza có thể có độ tương đồng ít nhất là 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% so với endonucleaza kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) trên 10 axit amin liên tiếp. Endonucleaza có thể có độ tương đồng nhiều nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% so với endonucleaza kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) trên 10 axit amin liên tiếp. Endonucleaza có thể

có độ tương đồng ít nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% so với endonucleaza kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, *nêu trên*) trên 10 axit amin liên tiếp trong miền HNH nucleaza của endonucleaza. Endonucleaza có thể có độ tương đồng nhiều nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% so với endonucleaza kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, *nêu trên*) trên 10 axit amin liên tiếp trong miền HNH nucleaza của endonucleaza. Endonucleaza có thể có độ tương đồng ít nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% so với endonucleaza kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, *nêu trên*) trên 10 axit amin liên tiếp trong miền RuvC nucleaza của endonucleaza. Endonucleaza có thể có độ tương đồng nhiều nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% so với endonucleaza kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, *nêu trên*) trên 10 axit amin liên tiếp trong miền RuvC nucleaza của endonucleaza.

[00085] Endonucleaza có thể chứa dạng được cải biến của endonucleaza ví dụ kiểu đại. Dạng được cải biến của endonucleaza ví dụ kiểu đại có thể chứa đột biến mà hạ thấp hoạt tính phân cắt axit nucleic của endonucleaza. Dạng được cải biến của endonucleaza ví dụ kiểu đại có thể có ít hơn 90%, ít hơn 80%, ít hơn 70%, ít hơn 60%, ít hơn 50%, ít hơn 40%, ít hơn 30%, ít hơn 20%, ít hơn 10%, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1% của hoạt tính phân cắt axit nucleic của endonucleaza ví dụ kiểu đại (ví dụ như, Cas9 từ *S. pyogenes*, *nêu trên*). Dạng được cải biến của endonucleaza có thể không có hoạt tính phân cắt axit nucleic đáng kể. Khi endonucleaza là dạng được cải biến mà không có hoạt tính phân cắt axit nucleic đáng kể, trong bản mô tả này nó được đề cập đến dưới dạng “không có hoạt tính enzym.”

[00086] Các đột biến được dự tính có thể bao gồm sự thế, sự thêm, và xóa bỏ, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành alanin. Theo một số phương án, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành axit amin khác (ví dụ như, glyxin, serin, threonin, xystein, valin, loxin, isoloxin, methionin, prolin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, axit aspartic, axit glutamic, asparagin, glutamin, histidin, lysin, hoặc arginin). Theo một số phương án, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành axit amin không tự nhiên (ví dụ như, selenomethionin). Theo một số phương án, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành chất bắt chước axit amin (ví dụ như, phosphomimic). Đột biến có thể là đột biến bảo toàn. ví dụ như, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành axit amin mà giống với kích thước,

hình dạng, điện tích, độ phân cực, hình thể, và/hoặc đồng phân quay của axit amin được gây đột biến (ví dụ như, đột biến xystein/serin, đột biến lysin/asparagin, đột biến histidin/phenylalanin). Đột biến có thể gây ra sự dịch chuyển trong khung đọc và/hoặc sự tạo ra bộ ba kết thúc sớm. Các đột biến có thể gây ra sự thay đổi đối với vùng điều hòa của gen hoặc locut mà ảnh hưởng đến sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen.

Các ARN dẫn

[00087] Sáng chế đề xuất ARN dẫn (gARN) mà có thể định hướng hoạt tính của endonucleaza kết hợp đến vị trí đích đặc hiệu ở trong polynucleotit. ARN dẫn có thể chứa ít nhất là trình tự vùng đệm mà lai hóa với trình tự axit nucleic đích được quan tâm, và trình tự đoạn lặp CRISPR. Trong hệ thống CRISPR Loại II, gARN cũng chứa ARN thứ hai gọi là trình tự tracrARN. Trong ARN dẫn CRISPR Loại II (gARN), trình tự đoạn lặp CRISPR và trình tự tracrARN lai hóa với nhau để tạo thành bộ đôi. Trong hệ thống CRISPR Loại V, gARN chứa crARN mà tạo thành bộ đôi. Theo một số phương án, gARN có thể liên kết endonucleaza, nhờ đó gARN và endonucleaza tạo thành phức hợp. gARN có thể tạo ra tính đặc hiệu đích cho phức hợp nhờ sự kết hợp của nó với endonucleaza. Do đó axit nucleic nhắm đích hệ gen có thể định hướng hoạt tính của endonucleaza.

[00088] ARN dẫn ví dụ bao gồm các trình tự vùng đệm mà chứa 15-200 nucleotit trong đó gARN nhắm đích vị trí hệ gen dựa trên cụm hệ gen người GRCh38. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực hiểu rằng, mỗi gARN có thể được thiết kế để bao gồm trình tự vùng đệm bổ sung với vị trí hoặc vùng đích hệ gen của nó. Xem Jinek *et al.*, Science, 2012, 337, 816-821 và Deltcheva *et al.*, Nature, 2011, 471, 602-607.

[00089] gARN có thể là ARN dẫn phân tử kép. gARN có thể là ARN dẫn đơn phân tử.

[00090] ARN dẫn phân tử kép có thể chứa hai sợi của ARN. Sợi thứ nhất chứa theo chiều từ 5' đến 3', trình tự mở rộng vùng đệm tùy chọn, trình tự vùng đệm và trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất. Sợi thứ hai có thể chứa trình tự tracrARN nhỏ nhất (bổ sung với trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất), trình tự tracrARN 3' và trình tự mở rộng tracrARN tùy chọn.

[00091] ARN dẫn đơn phân tử (sgARN) có thể có chứa, theo chiều từ 5' đến 3', trình tự mở rộng vùng đệm tùy chọn, trình tự vùng đệm, trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất, cầu nối dẫn đơn phân tử, trình tự tracrARN nhỏ nhất, trình tự tracrARN 3' và trình tự mở

rộng tracrARN tùy chọn. Sự mở rộng tracrARN tùy chọn có thể chứa các thành phần mà đóng góp chức năng bổ sung (ví dụ như, tính ổn định) cho ARN dẫn. Cầu nối dẫn đơn phân tử có thể nối đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất và trình tự tracrARN nhỏ nhất để tạo thành cấu trúc kẹp tóc. Sự mở rộng tracrARN tùy chọn có thể chứa một hoặc nhiều kẹp tóc.

[00092] Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự vùng đệm có 20 nucleotit tại đầu 5' của trình tự sgARN. Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự vùng đệm có ít hơn 20 nucleotit tại đầu 5' của trình tự sgARN. Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự vùng đệm có nhiều hơn 20 nucleotit tại đầu 5' của trình tự sgARN. Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự vùng đệm có chiều dài thay đổi với 17-30 nucleotit tại đầu 5' của trình tự sgARN. Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự mở rộng vùng đệm có chiều dài lớn hơn 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, hoặc 200 nucleotit. Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự mở rộng vùng đệm có chiều dài nhỏ hơn 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100 nucleotit.

[00093] Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự mở rộng vùng đệm mà chứa gốc khác (ví dụ như, trình tự kiểm soát tính ổn định, trình tự liên kết endoribonucleaza, hoặc ribozym). Gốc này có thể làm giảm hoặc làm tăng độ ổn định của axit nucleic nhắm đích axit nucleic. Gốc này có thể là đoạn kết thúc phiên mã (*tức là*, trình tự kết thúc phiên mã). Gốc này có thể hoạt động trong tế bào nhân chuẩn. Gốc này có thể hoạt động trong tế bào nhân sơ. Gốc này có thể hoạt động trong cả tế bào nhân chuẩn và tế bào nhân sơ. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về các gốc thích hợp bao gồm: mũ 5' (ví dụ như, mũ 7-metylguanylat (m⁷ G)), trình tự công tắc ribo (ví dụ như, để cho phép độ ổn định được điều hòa và/hoặc khả năng tiếp cận được điều hòa bằng protein và phức hợp protein), trình tự mà tạo thành bộ đôi dsARN (*tức là*, kẹp tóc), trình tự mà nhắm đích ARN đến vị trí dưới tế bào (ví dụ như, nhân, ty thể, lục lạp, và dạng tương tự), sự cải biến hoặc trình tự mà mang lại sự theo dõi (ví dụ như, định hướng sự liên hợp với phân tử huỳnh quang, sự liên hợp với gốc mà làm thuận lợi cho sự phát hiện huỳnh quang, trình tự mà cho phép sự phát hiện huỳnh quang, v.v.), và/hoặc sự cải biến hoặc trình tự mà tạo ra vị trí liên kết cho protein (ví dụ như, protein mà tác động lên ADN, bao gồm chất hoạt hóa phiên mã, chất kìm hãm phiên mã, ADN metyltransferaza, ADN demetylaza, histon axetyltransferaza, histon deaxetylaza, và dạng tương tự).

[00094] Theo một số phương án, sgARN chứa trình tự vùng đệm mà lai hóa với trình tự trong polynucleotit đích. Vùng đệm của gARN có thể tương tác với polynucleotit đích theo phương thức đặc hiệu trình tự thông qua sự lai hóa (*tức là*, sự bắt cặp bazơ). Do đó trình tự nucleotit của vùng đệm có thể thay đổi tùy thuộc vào trình tự của axit nucleic đích được quan tâm.

[00095] Trong hệ thống CRISPR-endonucleaza, trình tự vùng đệm có thể được thiết kế để lai hóa với polynucleotit đích mà nằm ở 5' của PAM của endonucleaza dùng trong hệ thống này. Vùng đệm có thể ăn khớp hoàn hảo trình tự đích hoặc có thể có sự bắt cặp nhầm. Mỗi endonucleaza, ví dụ như, Cas9 nucleaza, có trình tự PAM cụ thể mà nó nhận ra trong ADN đích. ví dụ như, Cas9 *S. pyogenes* nhận ra PAM mà chứa trình tự 5'-NRG-3', nơi mà R chứa A hoặc G, nơi mà N là nucleotit bất kỳ và N ở ngay 3' của trình tự axit nucleic đích được nhắm đích bằng trình tự vùng đệm.

[00096] Trình tự polynucleotit đích có thể chứa 20 nucleotit. Polynucleotit đích có thể chứa ít hơn 20 nucleotit. Polynucleotit đích có thể chứa nhiều hơn 20 nucleotit. Polynucleotit đích có thể chứa ít nhất là: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 hoặc nhiều nucleotit hơn. Polynucleotit đích có thể chứa nhiều nhất là: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 nucleotit hoặc nhiều hơn. Trình tự polynucleotit đích có thể chứa 20 bazơ ở ngay 5' của nucleotit thứ nhất của PAM.

[00097] Trình tự vùng đệm mà lai hóa với polynucleotit đích có thể có chiều dài bằng ít nhất là khoảng 6 nucleotit (nt). Trình tự vùng đệm có thể có ít nhất là khoảng 6 nt, ít nhất là khoảng 10 nt, ít nhất là khoảng 15 nt, ít nhất là khoảng 18 nt, ít nhất là khoảng 19 nt, ít nhất là khoảng 20 nt, ít nhất là khoảng 25 nt, ít nhất là khoảng 30 nt, ít nhất là khoảng 35 nt hoặc ít nhất là khoảng 40 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 19 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 19 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 19 nt đến

khoảng 45 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 50 nt, hoặc từ khoảng 20 nt đến khoảng 60 nt. Trong một số ví dụ, trình tự vùng đệm có thể chứa 20 nucleotit. Trong một số ví dụ, vùng đệm có thể chứa 19 nucleotit. Trong một số ví dụ, vùng đệm có thể chứa 18 nucleotit. Trong một số ví dụ, vùng đệm có thể chứa 22 nucleotit.

[00098] Theo một số ví dụ, tỉ lệ phần trăm bổ sung giữa trình tự vùng đệm và axit nucleic đích là ít nhất là khoảng 30%, ít nhất là khoảng 40%, ít nhất là khoảng 50%, ít nhất là khoảng 60%, ít nhất là khoảng 65%, ít nhất là khoảng 70%, ít nhất là khoảng 75%, ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 95%, ít nhất là khoảng 97%, ít nhất là khoảng 98%, ít nhất là khoảng 99%, hoặc 100%. Theo một số ví dụ, tỉ lệ phần trăm bổ sung giữa trình tự vùng đệm và axit nucleic đích nhiều nhất là khoảng 30%, nhiều nhất là khoảng 40%, nhiều nhất là khoảng 50%, nhiều nhất là khoảng 60%, nhiều nhất là khoảng 65%, nhiều nhất là khoảng 70%, nhiều nhất là khoảng 75%, nhiều nhất là khoảng 80%, nhiều nhất là khoảng 85%, nhiều nhất là khoảng 90%, nhiều nhất là khoảng 95%, nhiều nhất là khoảng 97%, nhiều nhất là khoảng 98%, nhiều nhất là khoảng 99%, hoặc 100%. Trong một số ví dụ, tỉ lệ phần trăm bổ sung giữa trình tự vùng đệm và axit nucleic đích là 100% trên sáu nucleotit ở tận cùng 5' liên tục của trình tự đích của sợi bổ sung của axit nucleic đích. Tỉ lệ phần trăm bổ sung giữa trình tự vùng đệm và axit nucleic đích có thể là ít nhất là 60% trên khoảng 20 nucleotit liên tục. Chiều dài của trình tự vùng đệm và axit nucleic đích có thể khác nhau ở từ 1 đến 6 nucleotit, mà có thể được cho là ở dạng phần phình hoặc các phần phình.

[00099] Trình tự tracrARN có thể chứa các nucleotit mà lai hóa với trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất trong tế bào. Trình tự tracrARN nhỏ nhất và trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất có thể tạo thành bộ đôi, *tức là* cấu trúc sợi kép bắt cặp bazơ. Cùng nhau, trình tự tracrARN nhỏ nhất và đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất có thể liên kết với endonucleaza được dẫn bằng ARN. Ít nhất là một phần của trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể lai hóa với trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất. Trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể có độ bổ sung ít nhất là khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng

70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc 100% với trình tự đoạn lặp CRISPR nhỏ nhất.

[000100] Trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể có chiều dài từ khoảng 7 nucleotit đến khoảng 100 nucleotit. ví dụ như, trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể dài từ khoảng 7 nucleotit (nt) đến khoảng 50 nt, từ khoảng 7 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 7 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 7 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 7 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 7 nt đến khoảng 15 nt, từ khoảng 8 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 8 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 8 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 8 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 8 nt đến khoảng 15 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 100 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 30 nt hoặc từ khoảng 15 nt đến khoảng 25 nt. Trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể có chiều dài xấp xỉ 9 nucleotit. Trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể là xấp xỉ 12 nucleotit. TracrARN nhỏ nhất có thể gồm có tracrARN nt 23-48 được mô tả trong Jinek *et al.*, nêu trên.

[000101] Trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể tương đồng ít nhất là khoảng 60% với trình tự tracrARN nhỏ nhất tham chiếu (ví dụ như, kiểu đại, tracrARN từ *S. pyogenes*) trên đoạn giãn dài gồm ít nhất là 6, 7, hoặc 8 nucleotit liên tục. ví dụ như, trình tự tracrARN nhỏ nhất có thể tương đồng ít nhất là khoảng 65%, tương đồng khoảng 70%, tương đồng khoảng 75%, tương đồng khoảng 80%, tương đồng khoảng 85%, tương đồng khoảng 90%, tương đồng khoảng 95%, tương đồng khoảng 98%, tương đồng khoảng 99% hoặc tương đồng 100% so với trình tự tracrARN tham chiếu nhỏ nhất trên đoạn giãn dài gồm ít nhất là 6, 7, hoặc 8 nucleotit liên tục.

[000102] Bộ đôi giữa ARN CRISPR nhỏ nhất và tracrARN nhỏ nhất có thể chứa xoắn kép. Bộ đôi giữa ARN CRISPR nhỏ nhất và tracrARN nhỏ nhất có thể chứa ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit hoặc nhiều hơn. Bộ đôi giữa ARN CRISPR nhỏ nhất và tracrARN nhỏ nhất có thể chứa nhiều nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit hoặc nhiều hơn.

[000103] Bộ đôi có thể chứa sự bắt cặp nhầm (*tức là*, hai sợi của bộ đôi không bổ sung 100%). Bộ đôi có thể chứa ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, hoặc 5 hoặc sự bắt cặp nhầm. Bộ đôi có thể chứa nhiều nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, hoặc 5 hoặc sự bắt cặp nhầm. Bộ đôi có thể chứa không nhiều hơn 2 sự bắt cặp nhầm.

[000104] Theo một số phương án, tracrARN có thể là tracrARN 3'. Theo một số phương án, trình tự tracrARN 3' có thể chứa trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc 100% so với trình tự tracrARN tham chiếu (ví dụ như, tracrARN từ *S. pyogenes*).

[000105] Theo một số phương án, gARN có thể chứa trình tự mở rộng tracrARN. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài từ khoảng 1 nucleotit đến khoảng 400 nucleotit. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài lớn hơn 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, hoặc 200 nucleotit. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài từ khoảng 20 đến khoảng 5000 nucleotit hoặc nhiều hơn. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài nhỏ hơn 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, hoặc 100 nucleotit. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài nhỏ hơn 10 nucleotit. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài 10-30 nucleotit. Trình tự mở rộng tracrARN có thể có chiều dài 30-70 nucleotit.

[000106] Trình tự mở rộng tracrARN có thể chứa gốc chức năng (ví dụ như, trình tự kiểm soát tính ổn định, ribozym, trình tự liên kết endoribonucleaza). Gốc chức năng có thể chứa đoạn t thúc phiên mã (*tức là*, trình tự kết thúc phiên mã). Gốc chức năng có thể có tổng chiều dài từ khoảng 10 nucleotit (nt) đến khoảng 100 nucleotit, từ khoảng 10 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 30 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 40 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 50 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 60 nt đến khoảng 70 nt, từ khoảng 70 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 80 nt đến khoảng 90 nt, hoặc từ khoảng 90 nt đến khoảng 100 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 30 nt, hoặc từ khoảng 15 nt đến khoảng 25 nt.

[000107] Theo một số phương án, sgARN có thể chứa trình tự cầu nối có chiều dài từ khoảng 3 nucleotit đến khoảng 100 nucleotit. Trong Jinek *et al.*, *nêu trên*, ví dụ như, "tetraloop" 4 nucleotit đơn giản (-GAAA-) được sử dụng (Jinek *et al.*, Science, 2012, 337(6096):816-821). Cầu nối để minh họa có chiều dài từ khoảng 3 nucleotit (nt) đến khoảng 90 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 70 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 20 nt, từ

khoảng 3 nt đến khoảng 10 nt. ví dụ như, cầu nối có thể có chiều dài từ khoảng 3 nt đến khoảng 5 nt, từ khoảng 5 nt đến khoảng 10 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 15 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 25 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 30 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 35 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 40 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 50 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 60 nt đến khoảng 70 nt, từ khoảng 70 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 80 nt đến khoảng 90 nt, hoặc từ khoảng 90 nt đến khoảng 100 nt. Cầu nối của axit nucleic dẫn đơn phân tử có thể có từ 4 đến 40 nucleotit. Cầu nối có thể có ít nhất là khoảng 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, hoặc 7000 nucleotit hoặc nhiều hơn. Cầu nối có thể có nhiều nhất là khoảng 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, hoặc 7000 nucleotit hoặc nhiều hơn.

[000108] Cầu nối có thể chứa trình tự bất kỳ trong số nhiều trình tự, mặc dù trong một số ví dụ cầu nối không chứa các trình tự mà có vùng mở rộng tương đồng với phần khác của ARN dẫn, mà có thể gây ra sự liên kết nội phân tử mà có thể gây trở ngại đối với các vùng chức năng khác của đoạn dẫn. Trong Jinek *et al.*, nêu trên, trình tự 4 nucleotit đơn giản -GAAA- được sử dụng (Jinek *et al.*, Science, 2012, 337(6096):816-821), nhưng nhiều trình tự khác, bao gồm các trình tự dài hơn có thể có khả năng được sử dụng.

[000109] Trình tự cầu nối có thể chứa gốc chức năng. ví dụ như, trình tự cầu nối có thể chứa một hoặc nhiều đặc điểm, bao gồm aptamer, ribozym, kẹp tóc tương tác protein, vị trí liên kết protein, mảng CRISPR, intron, hoặc exon. Trình tự cầu nối có thể chứa ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, hoặc 5 hoặc hơn 5 gốc chức năng. Trong một số ví dụ, trình tự cầu nối có thể chứa nhiều nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, hoặc 5 hoặc hơn 5 gốc chức năng.

[000110] Theo một số phương án, sgARN không chứa uraxin, ví dụ như, ở đầu 3' của trình tự sgARN. Theo một số phương án, sgARN chứa một hoặc nhiều uraxin, ví dụ như, ở đầu 3' của trình tự sgARN. Theo một số phương án, sgARN chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 uraxin (U) ở đầu 3' của trình tự sgARN.

[000111] sgARN có thể được cải biến hóa học. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học là gARN mà chứa ít nhất là một nucleotit có sự cải biến hóa học, ví dụ như, sự cải biến đường 2'-O-metyl. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học chứa khung axit nucleic được cải biến. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học chứa gốc 2'-O-metyl-phosphorothioat. Theo một số phương án, các cải biến hóa học

làm tăng cường độ ổn định, làm giảm khả năng xảy ra hoặc mức độ của đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, và/hoặc làm tăng cường các thuộc tính khác, như được mô tả trong lĩnh vực.

[000112] Theo một số phương án, gARN được cải biến có thể chứa khung được cải biến, ví dụ như, phosphorothioat, phosphotrieste, morpholino, methyl phosphonat, liên kết giữa các gốc đường alkyl hoặc xycloalkyl mạch ngắn hoặc liên kết giữa các gốc đường dị nguyên tử hoặc dị vòng mạch ngắn.

[000113] Hợp chất dựa trên morpholino được mô tả trong Braasch and David Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14): 4503-4510; Genesis, 2001, Volume 30, Issue 3; Heasman, *Dev. Biol.*, 2002, 243: 209-214; Nasevicius *et al.*, *Nat. Genet.*, 2000, 26:216-220; Lacerra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97: 9591-9596.; và patent Mỹ số 5,034,506, cấp ngày 23 tháng 7 năm 1991.

[000114] Chất bắt chước oligonucleotit xyclohexenyl axit nucleic được mô tả trong Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 8595-8602.

[000115] Theo một số phương án, gARN được cải biến có thể chứa một hoặc nhiều gốc đường được thế, ví dụ như, một trong số các gốc sau đây tại vị trí 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂, hoặc O(CH₂)_n CH₃, trong đó n nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 10; từ C1 đến C10 alkyl bậc thấp, alkoxyalkoxy, alkyl bậc thấp được thế, alkaryl hoặc aralkyl; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, hoặc N-alkyl; O-, S-, hoặc N-alkenyl; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocycloalkyl; heterocycloalkaryl; aminoalkylamino; polyalkylamino; silyl được thế; nhóm dimer chuyển ARN; nhóm báo cáo; chất xen giữa; 2'-O-(2-metoxyletyl); 2'-metoxy (2'-O-CH₃); 2'-propoxy (2'-OCH₂ CH₂CH₃); và 2'-flo (2'-F). Các cải biến tương tự cũng có thể được tạo ra ở các vị trí khác trên gARN, cụ thể là vị trí 3' của đường trên nucleotit ở đầu tận cùng 3' và vị trí 5' của nucleotit ở đầu tận cùng 5'. Trong một số ví dụ, cả đường và liên kết giữa các nucleosit, tức là, khung, của các đơn vị nucleotit có thể được thay thế bằng nhóm mới.

[000116] Các ARN dẫn cũng có thể bao gồm, ngoài ra hoặc theo cách khác, sự cải biến hoặc sự thế nucleobazơ (thường được đề cập đến trong lĩnh vực đơn giản là "bazơ"). Như dùng trong bản mô tả này, các nucleobazơ "không được cải biến" hoặc "tự nhiên" bao

gồm adenin (A), guanin (G), tymin (T), xytosin (C), và uraxin (U). Các nucleobazơ được cải biến bao gồm các nucleobazơ chỉ được tìm thấy hiếm khi hoặc nhất thời trong axit nucleic tự nhiên, ví dụ như, hypoxanthin, 6-metyladenin, 5-Me pyrimidin, cụ thể là 5-metylxytosin (còn được gọi là 5-metyl-2' deoxyxytosin và thường được đề cập đến trong lĩnh vực dưới dạng 5-Me-C), 5-hydroxymetylxytosin (HMC), glycosyl HMC và gentobiosyl HMC, cũng như là các nucleobazơ tổng hợp, ví dụ như, 2-aminoadenin, 2-(metylamino)adenin, 2-(imidazolylalkyl)adenin, 2-(aminoalkylamino)adenin hoặc các alkyladenin được thể khác loại khác, 2-thiouraxin, 2-thiotymin, 5-bromouraxin, 5-hydroxymetyluraxin, 8-azaguanin, 7-deazaguanin, N6 (6-aminohexyl)adenin, và 2,6-diaminopurin. Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp75-77, 1980; Gebeyehu *et al.*, Nucl. Acids Res. 1997, 15:4513. Bazơ "vạn năng" đã biết trong lĩnh vực, ví dụ như, inosin, cũng có thể được bao gồm. Sự thể 5-Me-C đã được thể hiện là làm tăng độ ổn định bộ đôi axit nucleic lên 0,6-1,2 °C. ((Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) và là các khía cạnh của sự thể bazơ.

[000117] Các nucleobazơ được cải biến có thể chứa các nucleobazơ tổng hợp và tự nhiên khác, chẳng hạn như 5-metylxytosin (5-me-C), 5-hydroxymetyl xytosin, xanthin, hypoxanthin, 2-aminoadenin, 6-metyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-propyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-thiouraxin, 2-thiotymin và 2-thioxytosin, 5-halouraxin và xytosin, 5-propynyl uraxin và xytosin, 6-azo uraxin, xytosin và tymin, 5-uraxin (giả-uraxin), 4-thiouraxin, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl và adenin và guanin được thể 8 khác, 5-halo cụ thể là 5-bromo, 5-triflometyl và uraxin và xytosin được thể 5 khác, 7-metylquanin và 7-metyladenin, 8-azaguanin và 8-azaadenin, 7-deazaguanin và 7-deazaadenin, và 3-deazaguanin và 3-deazaadenin.

Phức hợp của axit nucleic nhắm đích vào hệ gen và endonucleaza

[000118] gARN tương tác với endonucleaza (ví dụ như, nucleaza được dẫn bằng ARN chẳng hạn như Cas9), nhờ đó tạo thành phức hợp. gARN dẫn endonucleaza đến polynucleotit đích.

[000119] Mỗi endonucleaza và gARN có thể được dùng riêng rẽ cho tế bào hoặc đối tượng. Theo một số phương án, endonucleaza có thể được tạo phức hợp từ trước với một

hoặc nhiều ARN dẫn, hoặc một hoặc nhiều crARN cùng với tracrARN. Sau đó nguyên liệu đã được tạo phức hợp từ trước này có thể được dùng cho tế bào hoặc đối tượng. Nguyên liệu đã được tạo phức hợp từ trước này đã được biết đến dưới dạng hạt ribonucleoprotein (RNP). Endonucleaza trong RNP có thể là, ví dụ như, Cas9 endonucleaza hoặc Cpf1 endonucleaza. Endonucleaza có thể được kẹp hai bên ở đầu tận cùng N, đầu tận cùng C, hoặc cả đầu tận cùng N và đầu tận cùng C bằng một hoặc nhiều tín hiệu định vị nhân (NLS). ví dụ như, Cas9 endonucleaza có thể được kẹp hai bên bằng hai NLS, một NLS nằm ở đầu tận cùng N và NLS thứ hai nằm ở đầu tận cùng C. NLS có thể là NLS bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như NLS SV40. Tỷ lệ khối lượng của axit nucleic nhắm đích hệ gen với endonucleaza trong RNP có thể là 1:1. ví dụ như, tỷ lệ khối lượng của sgARN với Cas9 endonucleaza trong RNP có thể là 1:1.

Axit Nucleic Mã Hóa Cho Các Thành Phần Hệ Thống

[000120] Sáng chế đề xuất axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa cho axit nucleic nhắm đích vào hệ gen theo sáng chế, endonucleaza theo sáng chế, và/hoặc phân tử axit nucleic hoặc protein bất kỳ cần để thực hiện khía cạnh của phương pháp theo sáng chế. Axit nucleic mã hóa có thể là ARN, ADN, hoặc dạng kết hợp của chúng.

[000121] Axit nucleic mã hóa cho axit nucleic nhắm đích vào hệ gen theo sáng chế, endonucleaza theo sáng chế, và/hoặc phân tử axit nucleic hoặc protein bất kỳ cần để thực hiện khía cạnh của phương pháp theo sáng chế có thể chứa vector (ví dụ như, vector biểu hiện tái tổ hợp).

[000122] Thuật ngữ "vector" dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Một loại vector là "plasmid", mà dùng để chỉ vòng ADN sợi kép mạch vòng mà các đoạn axit nucleic khác có thể được nối vào đó. Một loại vector khác là vector virus, trong đó mảnh axit nucleic khác có thể được nối vào hệ gen virus. Các vector nhất định có khả năng tự sao chép ở tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn có điểm mở đầu sao chép vi khuẩn và vector động vật có vú thể bổ sung). Các vector khác (ví dụ, các vector động vật có vú không thuộc thể bổ sung) được hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ và do đó được sao chép cùng với hệ gen của vật chủ.

[000123] Trong một số ví dụ, các vector nhất định có thể có khả năng định hướng sự biểu hiện của axit nucleic mà chúng được liên kết khi hoạt động với. Các vector này được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng "vector biểu hiện tái tổ hợp", hoặc đơn giản hơn là "vector biểu hiện", mà thực hiện chức năng tương đương.

[000124] Thuật ngữ "được liên kết khi hoạt động" có nghĩa là trình tự nucleotit được quan tâm được liên kết với (các) trình tự điều hòa theo phương thức cho phép sự biểu hiện của trình tự nucleotit. Thuật ngữ "trình tự điều hòa" được dự định là bao gồm, ví dụ như, gen khởi đầu, vùng tăng cường và các thành phần kiểm soát biểu hiện khác (ví dụ như, tín hiệu polyadenyl hóa). Các trình tự điều hòa này đã được biết rõ trong lĩnh vực và được mô tả, ví dụ như, trong Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 1990, 185, Academic Press, San Diego, CA. Các trình tự điều hòa bao gồm các trình tự mà định hướng sự biểu hiện cấu trúc của trình tự nucleotit trong nhiều loại tế bào chủ, và các trình tự mà định hướng sự biểu hiện của trình tự nucleotit chỉ ở tế bào chủ nhất định (ví dụ như, các trình tự điều hòa đặc hiệu mô). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng thiết kế của vector biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố chẳng hạn như sự lựa chọn tế bào đích, mức độ biểu hiện mong muốn, và dạng tương tự.

[000125] Vector biểu hiện được dự tính bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vector virus dựa trên virus đậu mùa, virus bại liệt, adenovirus, virus kết hợp adeno, SV40, virus herpes simplex, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, retrovirus (ví dụ như, Virus Gây Bệnh Bạch Cầu Ở Chuột Nhắt, virus gây hoại tử lách, và vector có nguồn gốc từ retrovirus chẳng hạn như Virus Ung Thư Mô Liên Kết Rous, Virus Ung Thư Mô Liên Kết Harvey, virus gây bệnh bạch cầu ở gia cầm, lentivirus, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus gây ung thư mô liên kết tăng sinh tủy xương, và virus khối u vú) và các vector tái tổ hợp khác. Các vector khác được dự tính đối với tế bào đích nhân chuẩn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vector pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG, và pSVLSV40 (Pharmacia). Vector khác có thể được sử dụng miễn là chúng tương thích với tế bào chủ.

[000126] Trong một số ví dụ, vector có thể chứa một hoặc nhiều thành phần kiểm soát phiên mã và/hoặc dịch mã. Tùy thuộc vào hệ vật chủ/vector được sử dụng, thành phần kiểm soát phiên mã và dịch mã bất kỳ trong số một số lượng các thành phần kiểm soát phiên mã và dịch mã thích hợp, bao gồm gen khởi đầu cấu trúc và cảm ứng, thành phần

tăng cường phiên mã, vùng kết thúc phiên mã, v.v. có thể được sử dụng trong vector biểu hiện. Vector có thể là vector tự bất hoạt mà làm bất hoạt các trình tự virus hoặc các thành phần của bộ máy CRISPR hoặc các thành phần khác.

[000127] Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về gen khởi đầu sinh vật nhân chuẩn thích hợp (*tức là*, gen khởi đầu hoạt động chức năng trong tế bào nhân chuẩn) bao gồm gen khởi đầu sớm tức thì từ cytomegalovirus (CMV), tymidin kinaza của virus herpes simplex (HSV), SV40 sớm và muộn, đoạn lặp đầu tận cùng dài (LTR) từ retrovirus, gen khởi đầu yếu tố kéo dài-1 của người (EF1), gen khởi đầu beta-actin của gà (CBA), gen khởi đầu ubiquitin C (UBC), cấu trúc lai chứa vùng tăng cường cytomegalovirus dung hợp với gen khởi đầu beta-actin của gà (CAG), cấu trúc lai chứa vùng tăng cường cytomegalovirus dung hợp với gen khởi đầu, exon thứ nhất, và intron thứ nhất của gen beta-actin gà (CAG hoặc CAGGS), gen khởi đầu virus tế bào gốc chuột (MSCV), gen khởi đầu locut phosphoglycerat kinaza-1 (PGK), và gen khởi đầu metallothionein-I chuột.

[000128] Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu cảm ứng (ví dụ như, gen khởi đầu sốc nhiệt, gen khởi đầu được điều hòa bằng tetracyclin, gen khởi đầu được điều hòa bằng steroid, gen khởi đầu được điều hòa bằng kim loại, gen khởi đầu được điều hòa bằng thụ thể estrogen, v.v.). Gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu cơ định (ví dụ như, gen khởi đầu CMV, gen khởi đầu UBC, gen khởi đầu CAG). Theo một số phương án, gen khởi đầu có thể là gen khởi đầu giới hạn không gian và/hoặc giới hạn thời gian (ví dụ như, gen khởi đầu đặc hiệu mô, gen khởi đầu đặc hiệu loại tế bào, v.v.).

[000129] Việc đưa phức hợp, polypeptit, và axit nucleic theo sáng chế vào trong tế bào có thể xảy ra bằng cách gây nhiễm virus hoặc thể thực khuẩn, chuyển nạp, sự liên hợp, dung hợp tế bào trần, chuyển nhiễm liposom, đục lỗ điện, chuyển nạp vào nhân, kết tủa canxi photphat, chuyển nạp qua trung gian polyetylenimin (PEI), chuyển nạp qua trung gian DEAE-dextran, chuyển nạp qua trung gian liposom, công nghệ súng bắn hạt, kết tủa canxi photphat, định hướng vi tiêm, phân phối axit nucleic qua trung gian hạt nano, và dạng tương tự.

III. Các chiến lược để tránh đáp ứng miễn dịch và làm tăng sự sống sót

[000130] Được mô tả trong bản mô tả này là các chiến lược để làm cho tế bào được cải biến di truyền, *tức là*, tế bào cho vạn năng, tránh đáp ứng miễn dịch và/hoặc làm tăng sự sống sót của chúng, hoặc khả năng sống sau khi ghép vào đối tượng. Theo một số phương án, các chiến lược này làm cho tế bào cho vạn năng tránh khỏi đáp ứng miễn dịch và/hoặc sống sót ở tỉ lệ thành công cao hơn so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào được cải biến di truyền chứa sự đưa vào của ít nhất là một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà làm giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến; ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng mức độ biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp tương quan với tế bào không được cải biến; và/hoặc ít nhất là một cải biến di truyền mà làm thay đổi sự biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào được cải biến di truyền chứa sự đưa vào của ít nhất là một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà làm giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến; ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng mức độ biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp tương quan với tế bào không được cải biến; và ít nhất là một cải biến di truyền mà làm thay đổi sự biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến. Theo phương án khác, tế bào được cải biến di truyền chứa ít nhất là một xóa bỏ hoặc đột biến cài xen-làm khuyết ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà làm thay đổi sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến; và ít nhất là một sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của xóa bỏ của gen mà làm thay đổi sự biểu hiện của một hoặc nhiều HLA MHC-I và MHC-II. Theo phương án khác nữa, tế bào được cải biến di truyền chứa ít nhất là một cải biến di truyền mà làm thay đổi sự biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến.

[000131] Các gen mà mã hóa cho phức hệ tương thích mô chủ yếu (MHC) nằm trên Chr. 6P21 của người. Các protein thu được được mã hóa bởi các gen MHC là loạt protein bề

mặt mà thiết yếu trong khả năng tương thích thể cho trong quá trình cấy tế bào. Các gen MHC được chia thành MHC lớp I (MHC-I) và MHC lớp II (MHC-II). Các gen MHC-I (HLA-A, HLA-B, và HLA-C) được biểu hiện ở hầu hết tất cả các loại tế bào mô, trình diện peptit được xử lý bằng kháng nguyên “không tự thân” với tế bào T CD8+, nhờ đó thúc đẩy sự hoạt hóa của chúng thành tế bào T CD8+ dung giải tế bào. Tế bào được cấy hoặc được ghép biểu hiện các phân tử MHC-I “không tự thân” sẽ gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh được định hướng ở các tế bào này và cuối cùng dẫn đến sự chết đi của chúng do tế bào T CD8+ dung giải tế bào đã được hoạt hóa. Protein MHC-I ban đầu được kết hợp với beta-2-microglobulin (B2M) trong lưới nội chất, mà thiết yếu để tạo thành các phân tử MHC-I chức năng trên bề mặt tế bào. Ngoài ra, có ba phân tử MHC-Ib không cổ điển (HLA-E, HLA-F, và HLA-G), mà có chức năng điều hòa miễn dịch. Phân tử sinh học MHC-II bao gồm HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, và HLA-DR. Do chức năng cơ bản của chúng trong đáp ứng miễn dịch, các phân tử sinh học MHC-I và MHC-II đóng góp vào sự thải bỏ miễn dịch sau khi ghép tế bào của tế bào không phải của vật chủ, ví dụ như, ghép tế bào nhằm mục đích làm thuốc tái tạo.

[000132] Các phân tử bề mặt tế bào MHC-I được tạo thành từ các chuỗi nặng được mã hóa bằng MHC (HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C) và tiểu đơn vị không biến đổi beta-2-microglobulin (B2M). Do đó, sự làm giảm của nồng độ của B2M ở trong tế bào cho phép có phương pháp hữu hiệu để làm giảm sự biểu hiện bề mặt tế bào của các phân tử bề mặt tế bào MHC-I.

[000133] Theo một số phương án, tế bào chứa sự cải biến hệ gen của một hoặc nhiều gen MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, tế bào chứa sự cải biến hệ gen của một hoặc nhiều trình tự polynucleotit mà điều hòa sự biểu hiện của MHC-I và/hoặc MHC-II. Theo một số phương án, cải biến di truyền theo sáng chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp biên tập gen bất kỳ bao gồm nhưng không giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

[000134] Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến được thực hiện bằng cách nhắm đích, ví dụ như, để làm khuyết và/hoặc cài xen di truyền của ít nhất là một cặp bazơ, trong gen MHC-I và/hoặc MHC-II một cách trực tiếp. Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều

kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến được thực hiện bằng cách nhắm đích, ví dụ như, để làm khuyết di truyền, gen CIITA. Theo một số phương án, việc làm giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II tương quan với tế bào không được cải biến được thực hiện bằng cách nhắm đích, ví dụ như, để làm khuyết di truyền, ít nhất là một chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II là gen NLRC5, hoặc CIITA. Theo một số phương án, chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II là gen RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF-1, và/hoặc TAP1.

[000135] Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen HLA-A, HLA-B, và/hoặc HLA-C. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen khởi đầu của gen HLA-A, HLA-B, và/hoặc HLA-C. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen mà mã hóa cho chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen khởi đầu của gen mà mã hóa cho chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II.

[000136] Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm giảm mức độ biểu hiện của beta-2-microglobulin (B2M). B2M là gen không đa hình mà mã hóa cho tiểu đơn vị protein chung cần thiết cho sự biểu hiện bề mặt của tất cả các chuỗi nặng MHC lớp I đa hình. Protein HLA-I ban đầu được kết hợp với B2M trong lưới nội chất, mà thiết yếu để tạo thành các phân tử HLA-I được biểu hiện ở bề mặt tế bào, có chức năng. Theo một số phương án, gARN nhắm đích vị trí ở trong gen B2M chứa trình tự 5' GCTACTCTCTCTTTCTGGCC 3' (SEQ ID NO: 1). Theo một số phương án, gARN nhắm đích vị trí ở trong gen B2M chứa trình tự 5' GGCCGAGATGTCTCGCTCCG 3' (SEQ ID NO: 2). Theo một số phương án, gARN nhắm đích vị trí ở trong gen B2M chứa trình tự 5' CGCGAGCACAGCTAAGGCCA 3' (SEQ ID NO: 3). Theo phương án khác, gARN nhắm đích vị trí ở trong gen B2M chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự sau đây: 5'-TATAAGTGGAGGCGTCGCGC-3' (SEQ ID NO: 35), 5'-GAGTAGCGCGAGCACAGCTA-3' (SEQ ID NO: 36), 5'-ACTGGACGCGTCGCGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 37), 5'-

AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG-3' (SEQ ID NO: 38), 5'-
 GGCCACGGAGCGAGACATCT -3' (SEQ ID NO: 39), 5'-
 GCCCGAATGCTGTCAGCTTC-3' (SEQ ID NO: 40), 5'-
 CTCGCGCTACTCTCTTTTC-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-
 TCCTGAAGCTGACAGCATTC-3' (SEQ ID NO: 42), 5'-
 TTCCTGAAGCTGACAGCATT-3' (SEQ ID NO: 43), hoặc 5'-
 ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 44), Theo một số phương án, gARN
 chứa trình tự polynucleotit có trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2,
 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ
 ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, hoặc
 SEQ ID NO: 44. Phức hợp gARN/CRISPR nucleaza nhắm đích và phân cắt vị trí đích
 trong locut B2M. Việc sửa chữa chỗ đứt sợi kép bằng cách NHEJ có thể dẫn đến xóa bỏ
 của ít nhất là trên nucleotit và/hoặc cài xen ít nhất là một nucleotit, nhờ đó phá vỡ hoặc
 loại trừ sự biểu hiện của B2M. Theo cách khác, locut B2M có thể được nhắm đích bằng
 ít nhất là hai hệ thống CRISPR mỗi hệ thống này chứa gARN khác nhau, nhờ đó phân
 cắt tại hai vị trí trong locut B2M dẫn đến xóa bỏ của trình tự giữa hai chỗ cắt này, nhờ
 đó loại trừ sự biểu hiện của B2M.

[000137] Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm giảm mức
 độ biểu hiện của chất hoạt hóa trans lớp II (CIITA). CIITA là thành viên của họ đoạn lặp
 giàu loxin (LRR) LR hoặc miền liên kết nucleotit (NBD) của protein và điều hòa sự phiên
 mã của MHC-II bằng cách kết hợp với phức hợp trình tự tăng cường MHC. Sự biểu hiện
 của CIITA được gây cảm ứng ở tế bào B và tế bào phân nhánh như là chức năng của giai
 đoạn phát triển và có thể cảm ứng bằng IFN- γ ở hầu hết các loại tế bào.

[000138] Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm giảm mức
 độ biểu hiện của họ NLR, miền CARD chứa 5 (NLRC5). NLRC5 là chất điều hòa thiết
 yếu của đáp ứng miễn dịch qua trung gian MHC-I và, tương tự với CIITA, NLRC5 có
 thể cảm ứng mức độ cao bằng IFN- γ và có thể chuyển chỗ vào nhân. NLRC5 hoạt hóa
 gen khởi đầu của các gen MHC-I và gây cảm ứng sự phiên mã của MHC-I cũng như là
 các gen liên quan tham gia vào sự trình diện kháng nguyên MHC-I.

[000139] Theo một số phương án, yếu tố dung nạp có thể được cài xen hoặc được tái cài
 xen vào trong tế bào được cải biến di truyền để tạo ra tế bào cho vận năng có đặc quyền

miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được bộc lộ trong bản mô tả này đã được cải biến thêm để biểu hiện một hoặc nhiều yếu tố dung nạp. Yếu tố dung nạp ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều yếu tố trong số HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, chất ức chế CI, và IL-35. Theo một số phương án, cải biến di truyền, ví dụ như, sự cài xen, của ít nhất là một polynucleotit mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp làm cho tế bào cho vạn năng ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch với tỉ lệ cao hơn ít nhất là 1,05, ít nhất là 1,1, ít nhất là 1,25, ít nhất là 1,5, ít nhất là 2, ít nhất là 3, ít nhất là 4, ít nhất là 5, ít nhất là 10, ít nhất là 20, hoặc ít nhất là 50 lần so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, và/hoặc PD-L1 làm cho tế bào cho vạn năng ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ.

[000140] Polynucleotit mã hóa yếu tố dung nạp thường chứa các nhánh tương đồng bên trái và bên phải mà kẹp hai bên trình tự mã hóa yếu tố dung nạp. Các nhánh tương đồng có trình tự về cơ bản tương đồng với ADN hệ gen ở hoặc ở gần vị trí cài xen được nhắm đích. ví dụ như, nhánh tương đồng bên trái có thể là trình tự nucleotit tương đồng với vùng nằm ở bên trái hoặc ngược dòng của vị trí đích hoặc vị trí cắt và nhánh tương đồng bên phải có thể là trình tự nucleotit tương đồng với vùng nằm ở bên phải hoặc xuôi dòng của vị trí đích hoặc vị trí cắt. Đầu gần của mỗi nhánh tương đồng có thể tương đồng với trình tự ADN hệ gen tiếp giáp với vị trí cắt. Theo cách khác, đầu gần của mỗi nhánh tương đồng có thể tương đồng với trình tự ADN hệ gen nằm ở lên đến khoảng 10, 20, 30, 40, 50, 60, hoặc 70 nucleobazơ ra xa khỏi vị trí cắt. Như vậy, polynucleotit mã hóa yếu tố dung nạp có thể được cài xen vào locut gen được nhắm đích ở trong khoảng 10, 20, 30, 40, 50, 60, hoặc 70 cặp bazơ của vị trí cắt, và ADN hệ gen bổ sung tiếp giáp vị trí cắt (và không tương đồng với nhánh tương đồng) có thể được làm khuyết. Các nhánh tương đồng có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ khoảng 50 nucleotit đến vài nghìn nucleotit. Theo một số phương án, các nhánh tương đồng có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ khoảng 500 nucleotit đến khoảng 1000 nucleotit. Độ tương đồng trình tự đáng kể giữa các nhánh tương đồng và ADN hệ gen có thể là ít nhất là khoảng 80%, ít nhất là khoảng 85%, ít nhất là khoảng 90%, ít nhất là khoảng 95%, hoặc ít nhất là khoảng 99%.

[000141] Theo một số phương án, các nhánh tương đồng được sử dụng với B2M dẫn (ví dụ như, gARN chứa trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 1-3 hoặc 35-44). Theo một số phương án, các nhánh tương đồng được thiết kế để được sử dụng với đoạn dẫn B2M bất kỳ mà sẽ loại bỏ vị trí bắt đầu của gen B2M. Theo một số phương án, các nhánh tương đồng B2M có thể chứa hoặc chủ yếu gồm có trình tự polynucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 13 hoặc 19, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 13 hoặc 19. Theo một số phương án, nhánh tương đồng B2M bên trái có thể chứa hoặc chủ yếu gồm có SEQ ID NO: 13, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 13. Theo một số phương án, nhánh tương đồng B2M bên phải có thể chứa hoặc chủ yếu gồm có SEQ ID NO: 19, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 19.

[000142] Ít nhất là một polynucleotit mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp có thể được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh. Gen khởi đầu ngoại sinh có thể là gen khởi đầu cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc kiểu tế bào. Theo một số phương án, gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CMV, EF1a, PGK, CAG, hoặc UBC.

[000143] Theo một số phương án, ít nhất là một polynucleotit mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp được cài xen vào locut ẩn chứa an toàn, ví dụ như, locut AAVS 1. Theo một số phương án, ít nhất là một polynucleotit mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp được cài xen vào vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong (*tức là*, nằm ở trong hoặc ở gần) gen MHC-I, gen MHC-II, hoặc chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II.

[000144] Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M đồng thời với, hoặc sau khi làm khuyết tất cả hoặc một phần của gen hoặc gen khởi đầu B2M. Polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh. Gen khởi đầu ngoại sinh có thể là gen khởi đầu CMV.

[000145] Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho HLA-E được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho

HLA-E được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M đồng thời với, hoặc sau khi làm khuyết tất cả hoặc một phần của gen hoặc gen khởi đầu B2M. Polynucleotit mã hóa cho HLA-E được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh. Gen khởi đầu ngoại sinh có thể là gen khởi đầu CMV.

[000146] Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho HLA-G được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho HLA-G được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C đồng thời với, hoặc sau khi làm khuyết gen hoặc gen khởi đầu HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C.

[000147] Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho CD47 được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen CIITA. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho CD47 được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen CIITA đồng thời với, hoặc sau khi làm khuyết gen hoặc gen khởi đầu CIITA.

[000148] Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho HLA-G được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C đồng thời với sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho CD47 tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen CIITA.

[000149] Theo một số phương án, tế bào chứa sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của một hoặc nhiều yếu tố sống sót. Theo một số phương án, tế bào chứa sự cài xen của một hoặc nhiều trình tự polynucleotit mà mã hóa yếu tố sống sót. Theo một số phương án, tế bào chứa xóa bỏ của một trong số nhiều các yếu tố sống sót. Theo một số phương án, cải biến di truyền theo sáng chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp biên tập gen bất kỳ bao gồm nhưng không giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào chứa sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của ít nhất là một yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là thành viên hoặc con đường quan trọng tham gia vào sự sống sót tế bào, ví dụ như, sự giảm oxy huyết, các loại oxy phản ứng, sự mất đi chất dinh dưỡng, và/hoặc căng thẳng oxy hóa. Theo một số phương án, cải biến di truyền của ít nhất là một yếu tố sống sót làm cho tế bào cho vạn năng sống sót trong khoảng thời gian dài hơn, ví dụ như, khoảng thời gian dài hơn ít nhất là 1,05, ít nhất là 1,1, ít nhất là 1,25, ít nhất là 1,5, ít nhất là 2, ít nhất là 3, ít nhất là 4, ít nhất là 5, ít nhất là 10, ít nhất là 20, hoặc ít nhất

là 50 lần, so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

[000150] Theo một số phương án, tế bào chứa sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho MANF làm cho tế bào cho vạt năng sống sót sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ sống sót cao hơn tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, polynucleotit mà mã hóa cho MANF được cài xen vào locut ẩn chứa an toàn. Theo một số phương án, polynucleotit mà mã hóa cho MANF được cài xen vào gen thuộc về MHC-I, MHC-II, hoặc chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II.

[000151] Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, và/hoặc JNK. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen khởi đầu của gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, và/hoặc JNK.

[000152] Theo một số phương án, nhiều hơn một yếu tố sống sót được cải biến di truyền ở trong tế bào.

[000153] Theo các phương án nhất định, tế bào không có sự biểu hiện MHC-II và sự biểu hiện vừa phải của MHC-I được cải biến di truyền để không có sự biểu hiện bề mặt của MHC-I hoặc MHC-II. Theo phương án khác, tế bào không có sự biểu hiện bề mặt của MHC-I/II được biên tập thêm để có sự biểu hiện của PD-L1, ví dụ như, sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho PD-L1. Theo phương án khác nữa, tế bào không có sự biểu hiện bề mặt của MHC-I/II được biên tập thêm để có sự biểu hiện của PD-L1, ví dụ như, sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho PD-L1, và cũng được cải biến di truyền để làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến.

[000154] Theo một số phương án, tế bào còn chứa sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi, ví dụ như, bằng cách cải biến di truyền, của một hoặc nhiều gen khác mà không nhất thiết được kéo theo trong sự lẩn tránh miễn dịch hoặc sự sống sót tế bào sau cấy ghép. Theo một số phương án, tế bào còn chứa sự biểu hiện tăng của một hoặc nhiều protein công tắc an toàn tương quan với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào chứa sự biểu hiện tăng của một hoặc nhiều gen khác mà mã hóa cho protein công tắc an toàn. Theo một số phương án, công tắc an toàn cũng là gen tự sát. Theo một số phương

án, công tắc an toàn là tymidin kinaza virut herpes simplex-1 (HSV-tk) hoặc caspaza-9 có thể cảm ứng. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa cho ít nhất là một công tắc an toàn được cài xen vào hệ gen, ví dụ như, vào locut ẩn chứa an toàn. Theo một số phương án khác, một hoặc nhiều gen khác mà được cải biến di truyền mã hóa cho một hoặc nhiều trong số protein công tắc an toàn; thể thức nhắm đích; thụ thể; phân tử truyền tín hiệu; yếu tố phiên mã; protein hoặc peptit có hoạt tính được; các ứng viên đích thuốc; và protein thúc đẩy sự cấy, sự lưu thông, sự về nhà, khả năng sống, sự tự tái sinh, sự tồn tại lâu dài, và/hoặc sự sống sót của chúng được tính hợp với cấu trúc.

[000155] Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng được thiết kế hệ gen, trong đó tế bào cho vạn năng chứa ít nhất là một sự cải biến hệ gen được nhắm đích tại một hoặc nhiều vị trí được chọn trong hệ gen, phương pháp này bao gồm bước thiết kế di truyền loại tế bào như mô tả trong bản mô tả này bằng cách đưa vào trong tế bào này một hoặc nhiều cấu trúc để cho phép sự cải biến được nhắm đích tại vị trí được chọn; đưa vào trong tế bào này một hoặc nhiều chỗ đứt sợi kép tại vị trí được chọn bằng cách sử dụng một hoặc nhiều endonucleaza có khả năng nhận diện vị trí được chọn; và nuôi cấy tế bào đã biến tập để cho phép sửa chữa ADN nội sinh để tạo ra sự cải xen hoặc xóa bỏ được nhắm đích tại vị trí được chọn; nhờ đó thu lấy tế bào cho vạn năng được cải biến hệ gen. Tế bào cho vạn năng được tạo ra bằng phương pháp này chứa ít nhất là một sự cải biến hệ gen được nhắm đích có chức năng, và trong đó tế bào được cải biến hệ gen, nếu chúng là tế bào gốc, thì có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân hoặc tế bào được biệt hóa đầy đủ.

[000156] Theo một số phương án khác, tế bào cho vạn năng được thiết kế hệ gen chứa sự biểu hiện được đưa vào hoặc được tăng lên ở ít nhất là một trong số HLA-E, HLA-G, CD47, hoặc D-L1. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được thiết kế hệ gen thiếu hụt HLA lớp I và/hoặc lớp II. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được thiết kế hệ gen không có B2M hoặc có B2M thấp. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được thiết kế hệ gen chứa polynucleotit ngoại sinh được tính hợp hoặc không được tính hợp mã hóa cho một hoặc nhiều protein trong số các protein HLA-E, HLA-G, và PD-L1. Theo một số phương án, sự biểu hiện được đưa vào này là sự biểu hiện tăng từ gen không được biểu hiện hoặc được biểu hiện ở mức độ thấp chứa trong tế bào này. Theo một số phương án, polynucleotit ngoại sinh không được tính hợp được đưa vào

bằng cách sử dụng virus Sendai, AAV, episom, hoặc plasmid. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng không chứa B2M, với sự biểu hiện được đưa vào của một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G, PD-L1, và sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của ít nhất là một protein công tắc an toàn. Theo phương án khác, tế bào cho vượn năng không chứa HLA-A, HLA-B, và HLA-C, với sự biểu hiện được đưa vào của một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G, PD-L1, và ít nhất là một protein công tắc an toàn. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng không chứa B2M, với sự biểu hiện được đưa vào của một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G PD-L1, và sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của ít nhất là một yếu tố sống sót, ví dụ như, MANF. Phương pháp tạo ra tế bào được cải biến di truyền bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này được dự tính là được thực hiện bằng cách sử dụng ít nhất là phương pháp biên tập gen bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này.

IV. Loại tế bào

[000157] Tế bào như mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể thuộc về lớp có thể có bất kỳ của loại tế bào. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào người. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào gốc đa năng (PSC). Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC). Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào đã biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào sinh dưỡng, ví dụ như, tế bào của hệ miễn dịch hoặc tế bào co rút, ví dụ như, tế bào cơ xương.

[000158] Tế bào, ví dụ như, tế bào cho vượn năng gốc, được mô tả trong bản mô tả này có thể được biệt hóa thành loại tế bào liên quan để đánh giá sự biểu hiện HLA, cũng như là sự đánh giá của khả năng gây miễn dịch của dòng tế bào gốc vượn năng. Nhìn chung,

sự biệt hóa chứa việc duy trì tế bào được quan tâm trong một khoảng thời gian và trong điều kiện đủ để tế bào biệt hóa thành tế bào biệt hóa được quan tâm. ví dụ như, tế bào gốc vạn năng được bọc lộ trong bản mô tả này có thể được biệt hóa thành tế bào tiền thân trung mô (MPC), tế bào cơ tim có khả năng gây miễn dịch thấp, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, tế bào nội mô (EC), đại thực bào, tế bào gan, tế bào beta (ví dụ như, tế bào beta tụy), tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, hoặc tế bào tiền thân thần kinh (NPC).

[000159] Tế bào gốc có khả năng tăng sinh và mang lại sự tăng lên cho nhiều tế bào tiền thân hơn, đến lượt mình chúng có khả năng tạo ra số lượng lớn của tế bào mẹ mà đến lượt mình có thể mang lại sự tăng lên cho tế bào con đã biệt hóa hoặc có thể biệt hóa. Bản thân tế bào con có thể được cảm ứng để tăng sinh và sản xuất con cháu mà tiếp đó biệt hóa thành một hoặc nhiều kiểu tế bào trưởng thành, trong khi vẫn giữ lại một hoặc nhiều tế bào có tiềm năng phát triển của bố mẹ. Thuật ngữ "tế bào gốc" sau đây dùng để chỉ tế bào có khả năng hoặc tiềm năng, trong hoàn cảnh cụ thể, biệt hóa thành kiểu hình chuyên biệt hoặc biệt hóa hơn, và giữ lại khả năng, trong các hoàn cảnh nhất định, tăng sinh mà không biệt hóa đáng kể. Theo một khía cạnh, thuật ngữ tế bào tiền thân hoặc tế bào gốc dùng để chỉ tế bào mẹ đã tổng quát hóa mà hậu duệ (con cháu) của chúng chuyên biệt hóa, thường là theo các hướng khác nhau, bằng cách biệt hóa, ví dụ như, bằng cách có được các đặc tính cụ thể hoàn chỉnh, như xảy ra trong sự đa dạng hóa tăng dần của tế bào và mô phôi. Sự biệt hóa tế bào là quy trình phức tạp thường xảy ra thông qua nhiều lần phân chia tế bào. Tế bào đã biệt hóa có thể phát sinh từ tế bào đa năng mà bản thân nó có nguồn gốc từ tế bào đa năng, và v.v.. Mặc dù mỗi tế bào đa năng có thể được coi là tế bào gốc, phạm vi của cá loại tế bào mà mỗi loại có thể mang lại sự tăng lên có thể thay đổi đáng kể. Một số tế bào đã biệt hóa cũng có khả năng mang lại sự tăng lên cho tế bào tiềm năng phát triển lớn hơn. Khả năng này có thể là tự nhiên hoặc có thể được gây ra theo cách nhân tạo khi xử lý bằng các yếu tố khác nhau. Trong nhiều trường hợp sinh học, tế bào gốc cũng có thể là "đa năng" vì chúng có thể sản xuất con cháu của hơn một loại tế bào khác biệt, nhưng điều này không nhất thiết đối với "tính gốc."

[000160] "Tế bào đã biệt hóa" là tế bào mà đã tiến triển thêm nữa xuống dưới con đường phát triển hơn là tế bào mà nó được so sánh với. Do đó, tế bào gốc có thể biệt hóa thành tế bào tiền thân giới hạn dòng (chẳng hạn như tế bào tiền thân tế bào cơ), mà đến lượt nó

có thể biệt hóa thành các dạng khác của tế bào tiền thân xuống dưới hơn nữa trong con đường này (chẳng hạn như tiền thân tế bào cơ), và sau đó thành tế bào đã biệt hóa giai đoạn cuối, chẳng hạn như tế bào cơ, mà có vai trò riêng biệt trong loại mô nhất định, và có thể giữ lại hoặc không giữ lại khả năng để tăng sinh thêm.

Tế bào gốc phôi

[000161] Tế bào được mô tả trong bản mô tả này có thể là tế bào gốc phôi (ESC). ESC có nguồn gốc từ tế bào phôi chưa biệt hóa của phôi động vật có vú và có thể biệt hóa thành loại tế bào bất kỳ và nhân lên nhanh chóng. ESC cũng được tin là có kiểu nhân bình thường, duy trì hoạt tính telomera cao, và thể hiện tiềm năng tăng sinh lâu dài đáng chú ý, làm cho các tế bào này trở thành các ứng viên xuất sắc để sử dụng làm tế bào cho y học.

Tế bào gốc cá thể trưởng thành

[000162] Tế bào được mô tả trong bản mô tả này có thể là tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC). ASC là tế bào chưa biệt hóa mà có thể được tìm thấy ở động vật có vú, ví dụ như, người. ASC được xác định bằng khả năng tự tái sinh của chúng, ví dụ như, được cấy chuyển qua một vài chu kỳ của sự sao chép tế bào trong khi duy trì tình trạng chưa biệt hóa của chúng, và khả năng biệt hóa thành một vài loại tế bào riêng biệt, ví dụ như, tế bào thần kinh đệm. Tế bào gốc cá thể trưởng thành là lớp rộng của tế bào gốc mà có thể bao hàm tế bào gốc tạo máu, tế bào gốc vú, tế bào gốc ruột, tế bào gốc trung mô, tế bào gốc nội mô, tế bào gốc thần kinh, tế bào gốc cá thể trưởng thành khướu giác, tế bào gốc mào thần kinh, và tế bào tinh hoàn.

Tế bào gốc đa năng được cảm ứng

[000163] Tế bào được mô tả trong bản mô tả này có thể là tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC). iPSC có thể được tạo ra một cách trực tiếp từ tế bào người trưởng thành bằng cách đưa vào các gen mà mã hóa cho các yếu tố phiên mã quan trọng tham gia vào tính đa năng, ví dụ như, Oct4, Sox2, cMyc, và Klf4. iPSC có thể có nguồn gốc từ cùng một đối tượng mà tế bào tiền thân tiếp theo được dùng cho nó. Tức là, tế bào sinh dưỡng có thể được thu lấy từ đối tượng, được lập trình lại thành tế bào gốc đa năng được cảm ứng, và sau đó được biệt hóa lại thành tế bào tiền thân để được dùng cho đối tượng (ví dụ như,

tế bào tự thân). Tuy nhiên, trong trường hợp của tế bào tự thân, nguy cơ của đáp ứng miễn dịch và khả năng sống kém sau khi cấy vẫn còn.

Tế bào gốc và tiền thân tạo máu người

[000164] Tế bào được mô tả trong bản mô tả này có thể là tế bào gốc và tiền thân tạo máu người (hHSPC). Dòng tế bào gốc này mang lại sự tăng lên cho tất cả các loại tế bào máu, bao gồm dạng hồng cầu (hồng cầu hoặc tế bào máu đỏ (RBC)), dạng tủy (bạch cầu đơn nhân và đại thực bào, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu ưa axit, tế bào nhân khổng lồ/tiểu cầu, và tế bào phân nhánh), và dạng bạch huyết (tế bào T, tế bào B, tế bào NK). Tế bào máu được sản xuất bằng sự tăng sinh và sự biệt hóa của quần thể rất nhỏ của tế bào gốc tạo máu đa năng (HSC) mà cũng có khả năng bổ sung thêm bản thân chúng bằng cách sự tự tái sinh. Trong quá trình biệt hóa, con cháu của HSC phát triển qua các giai đoạn trưởng thành trung gian khác nhau, tạo ra đa năng và tế bào tiền thân được ước định bởi dòng trước khi đạt đến sự trưởng thành. Tủy xương (BM) là vị trí chính của sự tạo máu ở người và, trong điều kiện bình thường, chỉ số lượng nhỏ của tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC) có thể được tìm thấy trong máu ngoại vi (PB). Việc điều trị bằng xytokin, một số thuốc kìm hãm tủy xương dùng trong điều trị ung thư, và các hợp chất mà phá vỡ sự tương tác giữa tế bào sinh dưỡng tạo máu và BM có thể huy động nhanh chóng số lượng lớn của tế bào gốc và tiền thân vào hệ tuần hoàn.

Biệt hóa tế bào thành các loại tế bào khác

[000165] Một bước khác của phương pháp theo sáng chế có thể chứa việc biệt hóa tế bào thành tế bào biệt hóa. Bước biệt hóa có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. ví dụ như, iPSC người được biệt hóa thành nội bì chính thức bằng cách sử dụng các cách điều trị khác nhau, bao gồm chất bổ sung activin và B27 (Life Technologies). Nội bì chính thức được biệt hóa tiếp thành tế bào gan, việc điều trị bao gồm: FGF4, HGF, BMP2, BMP4, Oncostatin M, Dexametason, v.v. (Duan et al, Stem Cells, 2010;28:674–686; Ma et al, Stem Cells Translational Medicine, 2013;2:409–419). Theo phương án khác, bước biệt hóa có thể được thực hiện theo Sawitza *et al*, Sci Rep. 2015; 5: 13320. Tế bào biệt hóa có thể là tế bào sinh dưỡng bất kỳ của động vật có vú, ví dụ như, người. Theo một số phương án, tế bào sinh dưỡng có thể là tế bào biểu mô tiết nội tiết (ví dụ như, tế bào tiết hormon tuyến giáp, tế bào vỏ tuyến thượng thận), tế bào biểu mô tiết tuyến ngoại tiết (ví dụ như, tế bào niêm mạc tuyến nước bọt, tế bào tuyến

tiền liệt), tế bào tiết hormon (ví dụ như, tế bào thùy trước tuyến yên, tế bào đảo tụy), tế bào biểu mô keratin hóa (ví dụ như, tế bào keratin biểu bì), tế bào biểu mô hàng rào được phân tầng ẩm, tế bào truyền cảm giác (ví dụ như, tế bào nhận kích thích ánh sáng), tế bào noron thực vật, tế bào hỗ trợ cơ quan cảm giác và noron ngoại vi (ví dụ như, tế bào Schwann), noron hệ thần kinh trung ương, tế bào thần kinh đệm (ví dụ như, tế bào hình sao, tế bào thần kinh đệm ít gai), tế bào thấu kính, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào chức năng hàng rào (ví dụ như, tế bào ống dẫn), tế bào nền ngoại bào, tế bào co rút (ví dụ như, tế bào cơ xương, tế bào cơ tim, tế bào cơ trơn), tế bào máu (ví dụ như, hồng cầu), tế bào của hệ miễn dịch (ví dụ như, tế bào nhân khổng lồ, tế bào tiểu thần kinh đệm, bạch cầu trung tính, dưỡng bào, tế bào T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên), tế bào mầm (ví dụ như, tinh tử), tế bào nuôi, hoặc tế bào kẽ.

V. Chế phẩm và cách dùng

Chế phẩm và phân phối để biên tập gen

[000166] ARN dẫn, polynucleotit, ví dụ như, polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp hoặc polynucleotit mà mã hóa cho endonucleaza, và endonucleaza như mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo chế phẩm và được phân phối cho tế bào theo phương thức bất kỳ đã biết trong lĩnh vực.

[000167] ARN dẫn và/hoặc polynucleotit có thể được tạo chế phẩm với tá dược được dụng chẳng hạn như chất mang, dung môi, chất làm ổn định, chất hỗ trợ, chất pha loãng, v.v., tùy thuộc vào phương thức dùng và dạng liều lượng cụ thể. Hợp phần ARN dẫn và/hoặc polynucleotit có thể được tạo chế phẩm để đạt được độ pH tương thích sinh lý, và nằm trong khoảng từ độ pH bằng khoảng 3 đến độ pH bằng khoảng 11, từ khoảng pH 3 đến khoảng pH 7, tùy thuộc vào chế phẩm và đường dùng. Trong một số trường hợp, độ pH có thể được điều chỉnh đến khoảng từ khoảng độ pH 5,0 đến khoảng độ pH 8. Trong một số trường hợp, hợp phần có thể chứa lượng hữu hiệu để điều trị của ít nhất là một hợp chất như được mô tả trong bản mô tả này, cùng với một hoặc nhiều tá dược được dụng. Một cách tùy ý, hợp phần có thể chứa dạng kết hợp của hợp chất được mô tả trong bản mô tả này, hoặc có thể bao gồm thành phần hoạt tính thứ hai hữu dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn (ví dụ như và nhưng không giới hạn ở, chất kháng khuẩn hoặc chất kháng vi sinh vật), hoặc có thể bao gồm dạng kết hợp của các chất phản ứng theo sáng chế.

[000168] Tá được thích hợp bao gồm, ví dụ như, các phân tử chất mang mà bao gồm các đại phân tử chuyển hóa chậm, lớn chẳng hạn như protein, polysacarit, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin dạng polyme, copolyme axit amin, và hạt virus bất hoạt. Tá được ví dụ khác có thể bao gồm chất chống oxy hóa (ví dụ như và nhưng không giới hạn ở, axit ascorbic), chất càngh hóa (ví dụ như và nhưng không giới hạn ở, EDTA), carbohydrat (ví dụ như và nhưng không giới hạn ở, dextrin, hydroxyalkylxenluloza, và hydroxyalkylmetylxenluloza), axit stearic, dịch lỏng (ví dụ như và nhưng không giới hạn ở, dầu, nước, nước muối, glyxerol và etanol), chất làm ẩm hoặc nhũ hóa, chất đệm pH, và dạng tương tự.

[000169] Polynucleotit ARN dẫn (ARN hoặc ADN) và/hoặc (các) polynucleotit endonucleaza (ARN hoặc ADN) có thể được phân phối bằng vật mang phân phối virus hoặc không virus đã biết trong lĩnh vực. Theo cách khác, (các) polypeptit endonucleaza có thể được phân phối bằng vật mang phân phối virus hoặc không virus đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như đục lỗ điện hoặc hạt nano lipid. Theo các khía cạnh khác nữa, ADN endonucleaza có thể được phân phối dưới dạng một hoặc nhiều polypeptit, một mình hoặc được tạo phức hợp từ trước với một hoặc nhiều ARN dẫn, hoặc một hoặc nhiều crARN cùng với tracrARN.

[000170] Polynucleotit có thể được phân phối bằng vật mang phân phối không virus bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hạt nano, liposom, ribonucleoprotein, peptit tích điện dương, thể liên hợp ARN phân tử nhỏ, thể khảm aptamer-ARN, và phức hợp ARN-protein dung hợp. Một số vật mang phân phối không virus ví dụ được mô tả trong Peer and Lieberman, Gene Therapy, 2011, 18: 1127–1133 (mà tập trung vào vật mang phân phối không virus đối với siARN mà cũng hữu dụng để phân phối polynucleotit khác).

[000171] Đối với polynucleotit theo sáng chế, chế phẩm có thể được chọn từ dạng bất kỳ đã được hướng dẫn, ví dụ như, trong đơn quốc tế PCT/US2012/069610.

[000172] Polynucleotit, chẳng hạn như ARN dẫn, sgARN, và mARN mã hóa cho endonucleaza, có thể được phân phối cho tế bào hoặc đối tượng bằng hạt nano lipid (LNP).

[000173] LNP dùng để chỉ hạt bất kỳ có đường kính nhỏ hơn 1000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, hoặc 25 nm. Theo cách khác, hạt nano có thể

có kích thước nằm trong khoảng từ 1-1000 nm, 1-500 nm, 1-250 nm, 25-200 nm, 25-100 nm, 35-75 nm, hoặc 25-60 nm.

[000174] LNP có thể được tạo ra từ lipit cation, anion, hoặc trung tính. Lipit trung tính, chẳng hạn như phospholipit gây dung hợp DOPE hoặc thành phần màng cholesterol, có thể được bao gồm trong LNP làm 'lipit trợ giúp' để tăng cường hoạt tính chuyển nạp và độ ổn định hạt nano. Hạn chế của lipit cation bao gồm hiệu quả thấp do độ ổn định kém và sự thanh thải nhanh, cũng như là sự gây ra đáp ứng viêm hoặc kháng viêm.

[000175] LNP cũng có thể gồm có lipit kỵ nước, lipit ưa nước, hoặc cả lipit kỵ nước và lipit ưa nước.

[000176] Lipit bất kỳ hoặc dạng kết hợp của các lipit mà đã được biết đến trong lĩnh vực có thể được sử dụng để sản xuất LNP. Ví dụ về lipit dùng để sản xuất LNP là: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-cholesterol, DOTAP-cholesterol, GAP-DMORIE-DPyPE, và GL67A-DOPE-DMPE-polyetylen glycol (PEG). Ví dụ về lipit cation là: 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, và 7C1. Ví dụ về lipit trung tính là: DPSC, DPPC, POPC, DOPE, và SM. Ví dụ về lipit được cải biến PEG là: PEG-DMG, PEG-CerC14, và PEG-CerC20.

[000177] Lipit có thể được kết hợp ở số bất kỳ của tỉ lệ mol để sản xuất LNP. Ngoài ra, (các) polynucleotit có thể được kết hợp với (các) lipit trong khoảng tỉ lệ mol rộng để sản xuất LNP.

[000178] Vector virus kết hợp adeno (AAV) tái tổ hợp có thể được dùng để phân phối. Kỹ thuật để sản xuất hạt rAAV, trong đó hệ gen AAV cần được đóng gói mà bao gồm polynucleotit để được phân phối, các gen rep và cap, và các chức năng virus trợ giúp được cung cấp cho tế bào là tiêu chuẩn trong lĩnh vực. Sự sản xuất của rAAV thường đòi hỏi các thành phần sau đây có mặt trong tế bào đơn lẻ (được chỉ ra trong bản mô tả này dưới dạng tế bào đóng gói): hệ gen rAAV, các gen rep và cap AAV riêng rẽ khỏi (*tức là*, không ở trong) hệ gen rAAV, và các chức năng virus trợ giúp. Các gen rep và cap AAV có thể là từ tít huyết thanh AAV bất kỳ đối với virus tái tổ hợp có thể được tạo ra, và có thể là từ tít huyết thanh AAV khác với ITR hệ gen rAAV, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tít huyết thanh AAV được mô tả trong bản mô tả này. Sự sản xuất của rAAV kiểu giả được bộc lộ trong, ví dụ như, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 01/83692.

Chế phẩm và cách dùng tế bào, ví dụ như, tế bào cho vận năng

[000179] Tế bào được cải biến di truyền, ví dụ như, tế bào cho vận năng, như mô tả trong bản mô tả này có thể được tạo chế phẩm và được dùng cho đối tượng bằng phương thức bất kỳ đã biết trong lĩnh vực.

[000180] Các thuật ngữ "dùng," "đưa vào," "cấy," "ghép" và "cấy ghép" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong trường hợp thay thế tế bào, ví dụ như, tế bào tiền thân, vào đối tượng, bằng phương pháp hoặc đường dùng mà dẫn đến ít nhất là sự định vị một phần của tế bào được đưa vào tại vị trí mong muốn. Tế bào ví dụ như, tế bào tiền thân, hoặc con cháu đã biệt hóa của chúng có thể được dùng bằng đường dùng thích hợp bất kỳ mà dẫn đến sự phân phối đến vị trí mong muốn ở đối tượng nơi mà ít nhất là một phần của tế bào được cấy ghép hoặc các thành phần của tế bào vẫn còn sống. Khoảng thời gian sống của tế bào sau khi dùng cho đối tượng có thể ngắn bằng ít giờ, ví dụ như, hai mươi tư giờ, đến ít ngày, đến dài như một vài năm, hoặc thậm chí toàn bộ thời gian sống của đối tượng, *tức là*, ghép lâu dài.

[000181] Tế bào được cải biến di truyền, ví dụ như, tế bào cho vận năng, như mô tả trong bản mô tả này có thể sống được sau khi dùng cho đối tượng trong khoảng thời gian mà dài hơn khoảng thời gian của tế bào không được cải biến.

[000182] Theo một số phương án, hợp phần chứa tế bào như mô tả trong bản mô tả này có thể được dùng bằng đường dùng thích hợp, mà có thể bao gồm dùng trong tĩnh mạch, ví dụ như, dưới dạng liều bolus hoặc bằng cách truyền liên tục trong một khoảng thời gian. Theo một số phương án, dùng trong tĩnh mạch có thể được thực hiện bằng đường trong cơ, trong màng bụng, trong não tủy, dưới da, trong động mạch, trong hoạt dịch, hoặc nội tủy mạch. Theo một số phương án, hợp phần có thể ở dạng rắn, dạng trong nước, hoặc dạng lỏng. Theo một số phương án, dạng trong nước hoặc dạng lỏng có thể được phun sương hoặc được làm khô lạnh. Theo một số phương án, dạng được phun sương hoặc được làm khô lạnh có thể được hoàn nguyên với dung dịch trong nước hoặc lỏng.

[000183] Hợp phần tế bào cũng có thể được nhũ hóa hoặc được trình bày dưới dạng hợp phần liposom, với điều kiện là quy trình nhũ hóa không ảnh hưởng bất lợi đến khả năng sống của tế bào. Tế bào và thành phần hoạt tính khác bất kỳ có thể được trộn với tá dược

mà là được dụng và tương hợp với thành phần hoạt tính, và với lượng thích hợp để sử dụng trong phương pháp trị liệu được mô tả trong bản mô tả này.

[000184] Các chất khác bao gồm trong hợp phần tế bào có thể bao gồm muối được dụng của các thành phần trong đó. Muối được dụng bao gồm muối cộng axit (được tạo thành với nhóm amin tự do của polypeptit) mà được tạo thành với axit vô cơ, chẳng hạn như, ví dụ, axit hydrocloric hoặc axit phosphoric, hoặc các axit hữu cơ như axit axetic, axit tartaric, axit mandelic và axit tương tự. Các muối được tạo thành với nhóm carboxyl tự do cũng có thể có nguồn gốc từ bazơ vô cơ chẳng hạn như, ví dụ, natri, kali, amoni, canxi hoặc sắt hydroxit, và bazơ hữu cơ như isopropylamin, trimetylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain và bazơ tương tự.

[000185] Chất mang dung chịu được về mặt sinh lý đã được biết rõ trong lĩnh vực. Chất mang dạng lỏng ví dụ là dung dịch trong nước tiệt trùng mà không chứa nguyên liệu nào ngoài thành phần hoạt tính và nước, hoặc chứa chất đệm chẳng hạn như natri photphat ở giá trị độ pH sinh lý, nước muối sinh lý hoặc cả hai, chẳng hạn như nước muối đệm photphat. Ngoài ra, chất mang trong nước có thể chứa hơn một muối đệm, cũng như là muối chẳng hạn như natri và kali clorua, dextroza, polyetylen glycol và các chất tan khác. Hợp phần lỏng cũng có thể chứa các pha lỏng ngoài ra và thêm vào sự không bao gồm nước. Ví dụ về pha lỏng khác này là glyxerin, dầu thực vật chẳng hạn như dầu hạt bông, và nhũ tương nước-dầu. Lượng của hoạt chất dùng trong hợp phần tế bào mà hữu hiệu trong việc điều trị rối loạn hoặc tình trạng bệnh cụ thể có thể phụ thuộc vào bản chất của rối loạn hoặc tình trạng bệnh, và có thể được xác định bằng kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn.

[000186] Theo một số phương án, hợp phần chứa tế bào có thể được dùng cho đối tượng, ví dụ như, đối tượng là người, mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh. Theo một số phương án, hợp phần có thể được dùng cho đối tượng mà không mắc, không bị nghi ngờ mắc hoặc không có nguy cơ mắc bệnh. Theo một số phương án, đối tượng là người khỏe mạnh. Theo một số phương án, đối tượng ví dụ như, đối tượng người, mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh di truyền. Theo một số phương án, đối tượng đang có hoặc có nguy cơ phát triển triệu chứng chỉ thị bệnh.

VI. Hợp phần và phương pháp cụ thể theo sáng chế

[000187] Theo đó, sáng chế đề cập cụ thể đến các hợp phần và phương pháp không làm giới hạn sáng chế sau đây.

[000188] Trong hợp phần thứ nhất, Hợp phần 1, sáng chế hợp phần chứa tế bào mà chứa (i) ít nhất là một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; (ii) ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng mức độ biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp tương quan với tế bào không được cải biến; và (iii) ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến.

[000189] Trong hợp phần khác, Hợp phần 2, sáng chế đề xuất hợp phần chứa tế bào mà chứa (i) ít nhất là một xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) ít nhất là một sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của xóa bỏ di truyền của (i).

[000190] Trong hợp phần khác, Hợp phần 3, sáng chế đề xuất hợp phần chứa tế bào mà chứa ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến.

[000191] Trong hợp phần khác, Hợp phần 4, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 1, trong đó cải biến di truyền của (i) là xóa bỏ.

[000192] Trong hợp phần khác, Hợp phần 5, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 1, trong đó cải biến di truyền của (ii) là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp ở locut ẩn chứa an toàn hoặc tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của cải biến di truyền của (i).

[000193] Trong hợp phần khác, Hợp phần 6, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 1, trong đó cải biến di truyền của (i) là xóa bỏ của gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và cải biến di

truyền của (ii) là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của cải biến di truyền của (i).

[000194] Trong hợp phần khác, Hợp phần 7, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 1, 2, hoặc từ 4 đến 6, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là một hoặc nhiều gen MHC-I (ví dụ như, HLA-A, HLA-B và HLA-C), gen MHC-II (ví dụ như, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, và HLA-DR), hoặc gen mà mã hóa cho chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần khác của phức hợp MHC-I (ví dụ như, B2M, NLRC5, và CIITA).

[000195] Trong hợp phần khác, Hợp phần 8, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong đó hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 1, 2, hoặc từ 4 đến 6, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là một hoặc nhiều trong số HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M, hoặc CIITA.

[000196] Trong hợp phần khác, Hợp phần 9, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 1 hoặc 2, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần một hoặc nhiều trong số HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M, hoặc CIITA.

[000197] Trong hợp phần khác, Hợp phần 10, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 9, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C, hoặc xóa bỏ ở trong hoặc ở gần B2M.

[000198] Trong hợp phần khác, Hợp phần 11, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 9, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C, hoặc xóa bỏ ở trong hoặc ở gần CIITA.

[000199] Trong hợp phần khác, Hợp phần 12, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 1, 2, hoặc từ 4 đến 11, trong đó ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp là một hoặc nhiều polynucleotit mà mã hóa cho một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, hoặc PD-L1.

[000200] Trong hợp phần khác, Hợp phần 13, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 12, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần B2M và (ii) là sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho PD-L1 tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ trong (i).

[000201] Trong hợp phần khác, Hợp phần 14, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 12, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, hoặc xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C và (ii) là sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho HLA-G tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ trong (i) (ví dụ như, xóa bỏ HLA-A).

[000202] Trong hợp phần khác, Hợp phần 15, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 12, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C, hoặc xóa bỏ ở trong hoặc ở gần CIITA và (ii) là sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho HLA-G tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A và sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho CD47 tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ ở trong hoặc ở gần CIITA.

[000203] Trong hợp phần khác, Hợp phần 16, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 1 hoặc từ 3 đến 15, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót là một hoặc nhiều gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều trong số ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

[000204] Trong hợp phần khác, Hợp phần 17, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 1 hoặc từ 3 đến 16, trong đó cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến là sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho MANF, ví dụ như, ở locut ẩn chứa an toàn.

[000205] Trong hợp phần khác, Hợp phần 18, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 1 hoặc từ 3 đến 16, trong đó cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của gen mà mã hóa yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần gen ZNF143,

TXNIP, FOXO1, hoặc JNK, mà hạ thấp hoặc loại bỏ sự biểu hiện của gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK tương quan với tế bào không được cải biến.

[000206] Trong hợp phần khác, Hợp phần 19, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 18, trong đó tế bào còn chứa polynucleotit ngoại sinh mà không được tính hợp vào ADN hệ gen của tế bào.

[000207] Trong hợp phần khác, Hợp phần 20, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 19, trong đó polynucleotit ngoại sinh mã hóa cho HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, MANF, và/hoặc PD-L1.

[000208] Trong hợp phần khác, Hợp phần 21, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 20, trong đó tế bào còn chứa sự biểu hiện tăng của một hoặc nhiều công tắc an toàn tương quan với tế bào không được cải biến.

[000209] Trong hợp phần khác, Hợp phần 22, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 21, trong đó công tắc an toàn là tymidin kinaza virus herpes simplex-1 (HSV-tk) hoặc caspaza-9 có thể cảm ứng.

[000210] Trong hợp phần khác, Hợp phần 23, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 21 hoặc 22, trong đó sự biểu hiện tăng của một hoặc nhiều công tắc an toàn bắt nguồn từ sự cài xen di truyền của polynucleotit mà mã hóa cho protein công tắc an toàn, ví dụ như, vào locut ẩn chứa an toàn.

[000211] Trong hợp phần khác, Hợp phần 24, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 5, 17, hoặc 23, trong đó locut ẩn chứa an toàn được chọn từ nhóm gồm có AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF, và TTR.

[000212] Trong hợp phần khác, Hợp phần 25, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 24, trong đó tế bào còn chứa cải biến di truyền khác mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen khác bất kỳ.

[000213] Trong hợp phần khác, Hợp phần 26, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 25, trong đó cải biến di truyền,

xóa bỏ di truyền, hoặc sự cài xen di truyền được tạo ra bằng cách phân phối endonucleaza và ARN dẫn (gARN) đến tế bào.

[000214] Trong hợp phần khác, Hợp phần 27, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 26, trong đó endonucleaza là Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (còn gọi là Csn1 và Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, hoặc Cpf1 endonucleaza; chất tương đồng của chúng, sự tái tổ hợp của phân tử có trong tự nhiên của chúng, được tối ưu hóa codon của chúng, hoặc các phiên bản cải biến của chúng, và dạng kết hợp của chúng.

[000215] Trong hợp phần khác, Hợp phần 28, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 27, trong đó endonucleaza là Cas9, tùy ý Cas9 *S. pyogenes*, hoặc biến thể của chúng chứa NLS SV40 đầu tận cùng N và NLS SV40 đầu tận cùng C.

[000216] Trong hợp phần khác, Hợp phần 29, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 26, trong đó tỉ lệ khối lượng của gARN với endonucleaza là 1:1.

[000217] Trong hợp phần khác, Hợp phần 30, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần 2, 5, 6, từ 12 đến 15, 17, 19, 20, hoặc 23 trong đó polynucleotit chứa gen khởi đầu ngoại sinh.

[000218] Trong hợp phần khác, Hợp phần 31, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 30, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là CMV, EFla, PGK, CAG, UBC, hoặc gen khởi đầu cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc kiểu tế bào khác.

[000219] Trong hợp phần khác, Hợp phần 32, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong Hợp phần 31, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.

[000220] Trong hợp phần khác, Hợp phần 33, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 32, trong đó tế bào là tế bào gốc (ví dụ như, tế bào gốc người).

[000221] Trong hợp phần khác, Hợp phần 34, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 33, trong đó tế bào là tế bào gốc

phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC).

[000222] Trong hợp phần khác, Hợp phần 35, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 32, trong đó tế bào là tế bào biệt hóa.

[000223] Trong hợp phần khác, Hợp phần 36, sáng chế đề xuất hợp phần, như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 32 hoặc 35, trong đó tế bào là tế bào sinh dưỡng.

[000224] Trong phương pháp thứ nhất, Phương pháp 1, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào được cải biến, phương pháp này bao gồm bước: (i) đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; (ii) đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng mức độ biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp ở tế bào; và (iii) đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót ở tế bào cho vượn năng.

[000225] Trong phương pháp khác, Phương pháp 2, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vượn năng, phương pháp này bao gồm bước: (i) đưa vào ít nhất là một xóa bỏ của ít nhất là một vùng của ADN hệ gen ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) đưa vào ít nhất là một cải xen ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của xóa bỏ của (i).

[000226] Trong phương pháp khác, Phương pháp 3, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vượn năng, phương pháp này bao gồm bước đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót.

[000227] Trong phương pháp khác, Phương pháp 4, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 1, trong đó cải biến di truyền của (i) là xóa bỏ.

[000228] Trong phương pháp khác, Phương pháp 5, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp 1, trong đó cải biến di truyền của (ii) là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp ở locut ẩn chứa an toàn hoặc tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của cải biến di truyền của (i).

[000229] Trong phương pháp khác, Phương pháp 6, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp 1, trong đó cải biến di truyền của (i) là xóa bỏ của gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và cải biến di truyền của (ii) là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của cải biến di truyền của (i).

[000230] Trong phương pháp khác, Phương pháp 7, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 1, 2, hoặc từ 4 đến 6, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là một hoặc nhiều gen MHC-I (ví dụ như, HLA-A, HLA-B và HLA-C), gen MHC-II (ví dụ như, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, và HLA-DR), hoặc gen mà mã hóa cho chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II (ví dụ như, B2M, NLRC5, và CIITA).

[000231] Trong phương pháp khác, Phương pháp 8, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 1, 2, hoặc từ 4 đến 6, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần khác hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là một hoặc nhiều trong số HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M, hoặc CIITA.

[000232] Trong phương pháp khác, Phương pháp 9, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 1 hoặc 2, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần một hoặc nhiều trong số HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M, hoặc CIITA.

[000233] Trong phương pháp khác, Phương pháp 10, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 9, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C, và xóa bỏ ở trong hoặc ở gần B2M.

[000234] Trong phương pháp khác, Phương pháp 11, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 9, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C, và xóa bỏ ở trong hoặc ở gần CIITA.

[000235] Trong phương pháp khác, Phương pháp 12, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 1, 2, hoặc từ 4 đến 11, trong đó ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp là một hoặc nhiều polynucleotit mà mã hóa cho một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, hoặc PD-L1.

[000236] Trong phương pháp khác, Phương pháp 13, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 12, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần B2M và (ii) là sự cài xen của polynucleotit mã hóa cho PD-L1 tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ trong (i).

[000237] Trong phương pháp khác, Phương pháp 14, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 12, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, và xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C và (ii) là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho HLA-G tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ trong (i) (ví dụ như, xóa bỏ HLA-A).

[000238] Trong phương pháp khác, Phương pháp 15, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 12, trong đó (i) là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-A, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-B, xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-C, và xóa bỏ ở trong hoặc ở gần CIITA và (ii) là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho HLA-G tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ ở trong hoặc ở gần HLA-

A và sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho CD47 tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong xóa bỏ ở trong hoặc ở gần CIITA.

[000239] Trong phương pháp khác, Phương pháp 16, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 1 hoặc từ 3 đến 15, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa yếu tố sống sót là một hoặc nhiều gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

[000240] Trong phương pháp khác, Phương pháp 17, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 1 hoặc từ 3 đến 16, trong đó cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của gen mà mã hóa yếu tố sống sót là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho MANF, ví dụ như, ở locut ẩn chứa an toàn.

[000241] Trong phương pháp khác, Phương pháp 18, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 1 hoặc từ 3 đến 16, trong đó cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của gen mà mã hóa yếu tố sống sót là xóa bỏ ở trong hoặc ở gần gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK, mà hạ thấp hoặc loại bỏ sự biểu hiện của gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK tương quan với tế bào không được cải biến.

[000242] Trong phương pháp khác, Phương pháp 19, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 18, trong đó tế bào là tế bào gốc (ví dụ như, tế bào gốc người).

[000243] Trong phương pháp khác, Phương pháp 20, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 19, trong đó tế bào là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC).

[000244] Trong phương pháp khác, Phương pháp 21, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 18, trong đó tế bào là tế bào biệt hóa.

[000245] Trong phương pháp khác, Phương pháp 22, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 18 hoặc 21, trong đó tế bào là tế bào sinh dưỡng.

[000246] Trong phương pháp khác, Phương pháp 23, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 22, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đưa vào polynucleotit ngoại sinh vào trong tế bào mà không trở nên được tính hợp vào ADN hệ gen của tế bào.

[000247] Trong phương pháp khác, Phương pháp 24, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 23, trong đó polynucleotit ngoại sinh mã hóa cho HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, MANF, và/hoặc PD-L1.

[000248] Trong phương pháp khác, Phương pháp 25, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 24, trong đó này phương pháp còn chứa bước làm tăng mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều công tắc an toàn tương quan với tế bào không được cải biến.

[000249] Trong phương pháp khác, Phương pháp 26, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp 25, trong đó công tắc an toàn là tymidin kinaza virus herpes simplex-1 (HSV-tk) hoặc caspaza-9 có thể cảm ứng.

[000250] Trong phương pháp khác, phương pháp 27, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 25 hoặc 26, trong đó bước làm tăng mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều công tắc an toàn bắt nguồn từ sự cài xen di truyền của polynucleotit mà mã hóa cho công tắc an toàn, ví dụ như, vào locut ẩn chứa an toàn.

[000251] Trong phương pháp khác, Phương pháp 28, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 5, 17, hoặc 27, trong đó locut ẩn chứa an toàn được chọn từ nhóm gồm có AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF, và TTR.

[000252] Trong phương pháp khác, Phương pháp 29, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 28, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đưa vào cải biến di truyền khác mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen khác bất kỳ.

[000253] Trong phương pháp khác, Phương pháp 30, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 29, trong đó cải

biến di truyền, xóa bỏ, hoặc sự cài xen được tạo ra bằng cách phân phối đến tế bào endonucleaza và ít nhất là một ARN dẫn (gARN).

[000254] Trong phương pháp khác, Phương pháp 31, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 30, trong đó endonucleaza là Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (còn gọi là Csn1 và Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, hoặc Cpf1 endonucleaza; chất tương đồng của chúng, sự tái tổ hợp của phân tử có trong tự nhiên của chúng, được tối ưu hóa codon của chúng, hoặc các phiên bản cải biến của chúng, và dạng kết hợp của chúng.

[000255] Trong phương pháp khác, Phương pháp 32, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp 31, trong đó endonucleaza là Cas9, tùy ý là Cas9 *S. pyogenes*, hoặc biến thể của chúng chứa NLS SV40 đầu tận cùng N và NLS SV40 đầu tận cùng C.

[000256] Trong phương pháp khác, Phương pháp 33, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 30, trong đó tỉ lệ khối lượng của (các) gARN với endonucleaza là 1:1.

[000257] Trong phương pháp khác, Phương pháp 34, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 2, 5, 6, từ 12 đến 15, 17, 23, 25, hoặc 27, trong đó polynucleotit chứa gen khởi đầu ngoại sinh.

[000258] Trong phương pháp khác, Phương pháp 35, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp 34, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là CMV, EF1a, PGK, CAG, UBC, hoặc gen khởi đầu cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc kiểu tế bào khác.

[000259] Trong phương pháp khác, Phương pháp 36, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 35, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.

[000260] Trong phương pháp khác, Phương pháp 37, sáng chế đề xuất phương pháp này bao gồm bước dùng cho đối tượng hợp phần của tế bào như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 36 hoặc hợp phần chứa một số lượng các tế bào được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 36.

[000261] Trong phương pháp khác, Phương pháp 38, sáng chế đề xuất phương pháp này bao gồm bước (i) thu lấy hợp phần của tế bào như đề xuất trong hợp phần bất kỳ trong số các Hợp phần từ 1 đến 34; (ii) việc biệt hóa tế bào thành tế bào được giới hạn dòng hoặc tế bào được biệt hóa đầy đủ; và (iii) dùng tế bào được giới hạn dòng hoặc tế bào được biệt hóa đầy đủ này cho đối tượng cần chúng.

[000262] Trong phương pháp khác, Phương pháp 39, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 37 hoặc 38, trong đó đối tượng là người mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh.

[000263] Trong phương pháp khác, Phương pháp 40, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 39, trong đó bệnh là bệnh di truyền.

[000264] Trong phương pháp khác, Phương pháp 41, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 39 hoặc 40, trong đó tế bào còn chứa cải biến di truyền mà làm giảm mức độ biểu hiện của gen hoặc protein mà được kết hợp với bệnh.

[000265] Trong phương pháp khác, Phương pháp 42, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 39 đến 41, trong đó cải biến di truyền có khả năng điều trị bệnh hoặc triệu chứng của bệnh.

[000266] Trong phương pháp khác, Phương pháp 43, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 37 đến 42, trong đó tế bào được thu lấy từ nguồn không phải là đối tượng.

[000267] Trong phương pháp khác, Phương pháp 44, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước cải biến di truyền tế bào bằng cách (i) đưa vào xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ trong hệ gen của tế bào tại vị trí ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) đưa vào trong hệ gen của tế bào cài xen ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp, tại vị trí mà gộp lên một phần, gộp lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của (i), nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng.

[000268] Trong phương pháp khác, Phương pháp 45, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước cải biến di truyền tế bào bằng

cách (i) đưa vào xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ trong hệ gen của tế bào tại vị trí ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) đưa vào trong hệ gen của tế bào cài xen ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp vào locut ẩn chứa an toàn, nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng.

[000269] Trong phương pháp khác, Phương pháp 46, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 44 hoặc 45, trong đó tế bào cho vạn năng làm tăng khả năng tránh miễn dịch và/hoặc mức sống sót của tế bào so với tế bào không được cải biến.

[000270] Trong phương pháp khác, Phương pháp 47, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 46, trong đó ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là gen MHC-I được chọn từ HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C, gen MHC-II được chọn từ HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, hoặc HLA-DR, hoặc gen được chọn từ B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, hoặc RFXANK.

[000271] Trong phương pháp khác, Phương pháp 48, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 47, trong đó ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp là một hoặc nhiều polynucleotit mà mã hóa cho một hoặc nhiều trong số PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

[000272] Trong phương pháp khác, Phương pháp 49, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 48, trong đó ít nhất là một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh.

[000273] Trong phương pháp khác, Phương pháp 50, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 49, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc kiểu tế bào, gen khởi đầu cơ định là gen khởi đầu CMV, EF1a, PGK, CAG, hoặc UBC.

[000274] Trong phương pháp khác, Phương pháp 51, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 50, trong đó xóa

bỏ và/hoặc sự cài xen của (i) nằm ở trong hoặc ở gần B2M, và sự cài xen của (ii) là polynucleotit mã hóa cho PD-L1 hoặc HLA-E.

[000275] Trong phương pháp khác, Phương pháp 52, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 51, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đưa vào ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là yếu tố sống sót tương quan với tế bào không được cải biến.

[000276] Trong phương pháp khác, Phương pháp 53, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 52, trong đó ít nhất là một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm mức độ biểu hiện của ít nhất là yếu tố sống sót là sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho MANF, mà làm tăng mức độ biểu hiện của MANF tương quan với tế bào không được cải biến; hoặc xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazo ở trong hoặc ở gần gen mà mã hóa cho ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK, mà hạ thấp hoặc loại bỏ sự biểu hiện của ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK tương quan với tế bào không được cải biến.

[000277] Trong phương pháp khác, Phương pháp 54, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 53, trong đó polynucleotit mà mã hóa cho MANF được cài xen vào locut ẩn chứa an toàn hoặc vào gen thuộc về MHC-I, MHC-II, hoặc chất điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II.

[000278] Trong phương pháp khác, Phương pháp 55, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 54, trong đó cải biến di truyền bao gồm việc phân phối ít nhất là một hệ thống endonucleaza được dẫn bằng ARN vào tế bào.

[000279] Trong phương pháp khác, Phương pháp 56, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 55, trong đó ít nhất là một hệ thống endonucleaza được dẫn bằng ARN là hệ thống CRISPR chứa CRISPR nucleaza và ARN dẫn.

[000280] Trong phương pháp khác, Phương pháp 57, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 56, trong đó CRISPR nucleaza là Cas9, Cpf1, chất tương đồng của chúng, phiên bản cải biến của chúng, phiên bản được tối ưu hóa codon của chúng, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng.

[000281] Trong phương pháp khác, Phương pháp 58, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 56 hoặc 57, trong đó CRISPR nucleaza là Cas9 *S. pyogenes*.

[000282] Trong phương pháp khác, Phương pháp 59, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 56 đến 58, trong đó CRISPR nucleaza chứa tín hiệu định vị nhân (NLS) đầu tận cùng N và/hoặc NLS đầu tận cùng C.

[000283] Trong phương pháp khác, Phương pháp 60, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 56 đến 59, trong đó CRISPR nucleaza và ARN dẫn có mặt theo tỉ lệ khối lượng bằng 1:1.

[000284] Trong phương pháp khác, Phương pháp 61, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 44 hoặc từ 46 đến 60, trong đó xóa bỏ và/hoặc sự cài xen của (i) nằm ở trong hoặc ở gần locut gen B2M, và sự cài xen của (ii) là polynucleotit mã hóa cho PD-L1.

[000285] Trong phương pháp khác, Phương pháp 62, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 61, trong đó ARN dẫn dùng cho (i) và (ii) chứa trình tự nucleotit chứa ít nhất là một trong số các SEQ ID NO: 1-3 hoặc 35-44.

[000286] Trong phương pháp khác, Phương pháp 63, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 61 hoặc 62, trong đó polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được kẹp hai bên bởi (a) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng nằm bên trái của vị trí trong (i) và (b) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng nằm bên phải của vị trí trong (i).

[000287] Trong phương pháp khác, Phương pháp 64, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 63, trong đó polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được cài xen vào locut gen B2M ở trong vòng 50 cặp bazơ của vị trí trong (i).

[000288] Trong phương pháp khác, Phương pháp 65, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 63 hoặc 64, trong đó (a) chủ yếu gồm có trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 13, và (b) chủ yếu gồm có trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 19.

[000289] Trong phương pháp khác, Phương pháp 66, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 61 đến 65, trong đó polynucleotit mã hóa cho PD-L1 được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh, trong đó tùy ý gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.

[000290] Trong phương pháp khác, Phương pháp 67, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 66, trong đó tế bào là tế bào động vật có vú, trong đó tùy ý tế bào là tế bào người.

[000291] Trong phương pháp khác, Phương pháp 68, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 67, trong đó tế bào là tế bào gốc.

[000292] Trong phương pháp khác, Phương pháp 69, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 68, trong đó tế bào là tế bào gốc đa năng (PSC), tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC).

[000293] Trong phương pháp khác, Phương pháp 70, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 69, trong đó tế bào là tế bào biệt hóa hoặc tế bào sinh dưỡng.

[000294] Trong phương pháp khác, Phương pháp 71, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 69, trong đó tế bào cho vượn năng có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn.

[000295] Trong phương pháp khác, Phương pháp 72, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 71, trong đó tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng là tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, hoặc tế bào tiền thân thần kinh.

[000296] Trong phương pháp khác, Phương pháp 73, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 71, trong đó tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết chẳng hạn như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào của hệ miễn dịch.

[000297] Trong hợp phần khác, Hợp phần 37, sáng chế đề xuất hợp phần chứa một số lượng các tế bào cho vạn năng được tạo ra bằng phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 44 đến 73.

[000298] Trong hợp phần khác, Hợp phần 38, sáng chế đề xuất hợp phần như đề xuất trong Hợp phần 37, trong đó một số lượng các tế bào cho vạn năng có thể được duy trì trong một khoảng thời gian và trong điều kiện đủ để tế bào trải qua sự biệt hóa.

[000299] Trong hợp phần khác, Hợp phần 39, sáng chế đề xuất hợp phần chứa tế bào mà chứa (i) ít nhất là một xóa bỏ ở trong hoặc ở gần ít nhất là một gen mà mã hóa cho một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II hoặc thành phần hoặc chất điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (ii) ít nhất là một sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa cho ít nhất là một yếu tố dung nạp tại vị trí mà gói lên một phần, gói lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của xóa bỏ di truyền của (i).

[000300] Trong phương pháp khác, Phương pháp 74, sáng chế đề xuất phương pháp chứa bước dùng cho đối tượng một số lượng các tế bào cho vạn năng của Hợp phần 37 hoặc 38.

[000301] Trong phương pháp khác, Phương pháp 75, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng cần chúng, chứa phương pháp này bao gồm bước (i) thu lấy hoặc đã thu được một số lượng các tế bào cho vạn năng của Hợp phần 37 hoặc 38 sau khi biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn; và (ii) dùng tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn cho đối tượng.

[000302] Trong phương pháp khác, Phương pháp 76, sáng chế đề xuất phương pháp thu lấy tế bào để dùng cho đối tượng cần chúng, chứa phương pháp này bao gồm bước (i) thu lấy hoặc đã thu được tế bào cho vạn năng của Hợp phần 37 hoặc 38; và (ii) duy trì tế bào cho vạn năng trong một khoảng thời gian và trong điều kiện đủ để tế bào biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn.

[000303] Trong phương pháp khác, Phương pháp 77, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 75 hoặc 76, trong đó tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng là tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, hoặc tế bào tiền thân thần kinh.

[000304] Trong phương pháp khác, Phương pháp 78, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 75 hoặc 76, trong đó tế bào sinh dưỡng biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết chẳng hạn như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào của hệ miễn dịch.

[000305] Trong phương pháp khác, Phương pháp 79, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 74 đến 78, trong đó đối tượng là người mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh.

[000306] Trong phương pháp khác, Phương pháp 80, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 79, trong đó bệnh là bệnh di truyền.

[000307] Trong phương pháp khác, Phương pháp 81, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng, chứa phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc đa năng (PSC) (a) nucleaza được dẫn bằng ARN; (b) ARN dẫn (gARN) nhắm đích vị trí đích trong locut gen beta-2-microglobulin (B2M); và (c) vector chứa axit nucleic, axit nucleic này chứa (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng nằm bên trái của vị trí đích trong locut gen B2M, (ii) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố dung nạp, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng nằm bên phải của vị trí đích trong locut gen B2M, trong đó locut gen B2M được phân cắt tại vị trí đích và axit nucleic được cài xen vào locut gen B2M ở trong vòng 50 cặp bazơ của vị trí đích, nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng làm tăng khả năng tránh miễn dịch và/hoặc mức sống sót của tế bào so với PSC mà không chứa axit nucleic được cài xen vào locut gen B2M.

[000308] Trong phương pháp khác, Phương pháp 82, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 81, trong đó gARN chứa trình tự nucleotit được chọn từ SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, hoặc SEQ ID NO: 3.

[000309] Trong phương pháp khác, Phương pháp 83, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 81 hoặc 82, trong đó (i) chủ yếu gồm có trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 13, và (iii) chủ yếu gồm có trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 19.

[000310] Trong phương pháp khác, Phương pháp 84, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 81 đến 83, trong đó yếu

tổ dung nạp là phối tử chết theo chương trình 1 (PD-L1) hoặc kháng nguyên bạch cầu người E (HLA-E).

[000311] Trong phương pháp khác, Phương pháp 85, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 81 đến 84, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố dung nạp được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh.

[000312] Trong phương pháp khác, Phương pháp 86, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp 85, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu cơ định, gen khởi đầu đặc hiệu loại tế bào, gen khởi đầu đặc hiệu loại mô, hoặc gen khởi đầu được điều hòa về thời gian.

[000313] Trong phương pháp khác, Phương pháp 87, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 85 hoặc 86, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.

[000314] Trong phương pháp khác, Phương pháp 88, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 81 đến 87, trong đó vector là vector plasmit.

[000315] Trong phương pháp khác, Phương pháp 89, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 88, trong đó vector plasmit chứa trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 33 hoặc SEQ ID NO: 34.

[000316] Trong phương pháp khác, Phương pháp 90, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 81 đến 89, trong đó nucleaza được dẫn bằng ARN là Cas9 nucleaza.

[000317] Trong phương pháp khác, Phương pháp 91, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 90, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất là một tín hiệu định vị nhân (NLS).

[000318] Trong phương pháp khác, Phương pháp 92, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 90 hoặc 91, trong đó Cas9 nucleaza là Cas9 *S. pyogenes*.

[000319] Trong phương pháp khác, Phương pháp 93, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 81 đến 92, trong đó PSC

là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC).

[000320] Trong phương pháp khác, Phương pháp 94, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 81 đến 93, trong đó PSC là PSC người.

[000321] Trong phương pháp khác, Phương pháp 95, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng, chứa phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc đa năng (PSC) (a) nucleaza được dẫn bằng ARN; (b) ARN dẫn (gARN) nhắm đích vị trí đích trong locut gen beta-2-microglobulin (B2M), trong đó gARN chứa trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 2; và (c) vector chứa axit nucleic, axit nucleic này chứa (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng nằm bên trái của vị trí đích trong locut gen B2M mà chủ yếu gồm có SEQ ID NO: 13, (ii) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố dung nạp, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng nằm bên phải của vị trí đích trong locut gen B2M mà chủ yếu gồm có SEQ ID NO: 19, trong đó locut gen B2M được phân cắt tại vị trí đích và axit nucleic được cài xen vào locut gen B2M ở trong vòng 50 cặp bazơ của vị trí đích, nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng làm tăng khả năng tránh miễn dịch và/hoặc mức sống sót của tế bào so với PSC mà không chứa axit nucleic được cài xen vào locut gen B2M.

[000322] Trong phương pháp khác, Phương pháp 96, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 95, trong đó yếu tố dung nạp là phối tử chết theo chương trình 1 (PD-L1) hoặc kháng nguyên bạch cầu người E (HLA-E).

[000323] Trong phương pháp khác, Phương pháp 97, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 95 hoặc 96, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố dung nạp được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh.

[000324] Trong phương pháp khác, Phương pháp 98, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 97, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là cơ định, đặc hiệu loại tế bào, đặc hiệu loại mô, hoặc được điều hòa về thời gian.

[000325] Trong phương pháp khác, Phương pháp 99, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 97 hoặc 98, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.

[000326] Trong phương pháp khác, Phương pháp 100, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 95 đến 99, trong đó vector là vector plasmit.

[000327] Trong phương pháp khác, Phương pháp 101, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 100, trong đó vector plasmit chứa trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 33 hoặc SEQ ID NO: 34.

[000328] Trong phương pháp khác, Phương pháp 102, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 95 đến 101, trong đó nucleaza được dẫn bằng ARN là Cas9 nucleaza.

[000329] Trong phương pháp khác, Phương pháp 103, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 102, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất là một tín hiệu định vị nhân (NLS).

[000330] Trong phương pháp khác, Phương pháp 104, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong Phương pháp 102 hoặc 103, trong đó Cas9 nucleaza là Cas9 *S. pyogenes*.

[000331] Trong phương pháp khác, Phương pháp 105, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 95 đến 104, trong đó PSC là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tiền thân tạo máu (HSPC).

[000332] Trong phương pháp khác, Phương pháp 106, sáng chế đề xuất phương pháp như đề xuất trong phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 95 đến 105, trong đó PSC là PSC người.

VII. Ví dụ thực hiện sáng chế

[000333] Các ví dụ dưới đây mô tả sự tạo ra và sự xác định đặc điểm của tế bào cho vạn năng theo sáng chế. Bảng 1 liệt kê các yếu tố dung nạp và Bảng 2 liệt kê các yếu tố sống sót mà có thể được cải biến di truyền trong tế bào này. Hình 1A-1C minh họa các chiến lược biên tập gen khác nhau mà có thể được sử dụng để xâm nhập miễn dịch.

Bảng 1. Các yếu tố dung nạp mà có thể được cải biến di truyền

Yếu tố	Knock out (KO)	Knock in (KI)
HLA-E		+
HLA-G		+
CTLA-4		+
CD47		+
PD-L1		+
B2M	-	
HLA-ABC	-	
CIITA	-	

Bảng 2. Các yếu tố sống sót mà có thể được cải biến di truyền

Yếu tố	Knock out (KO)	Knock in (KI)
ZNF143	-	
TXNIP	-	
FOXO	-	
JNK	-	
MANF		+

Ví dụ 1: Tạo ra iPSC bị knock-out B2M

[000334] Sự chọn lọc ARN dẫn (gARN) đối với B2M. Để xác định phổ lớn của gARN có khả năng biên tập vùng đích ADN B2M, sự sàng lọc gARN được phiên mã *in vitro* (IVT) được tiến hành. gARN nhắm đích B2M được thiết kế để nhắm đích exon 1 của gen B2M. Trình tự hệ gen B2M được đưa ra để phân tích bằng cách sử dụng phần mềm thiết kế gARN. Danh mục thu được của gARN được thu hẹp thành danh mục có khoảng 200 gARN dựa trên tính duy nhất của trình tự (chỉ những gARN không có sự ăn khớp hoàn hảo ở nơi nào khác trong hệ gen được sàng lọc) và sự lệch đích được dự đoán nhỏ nhất. Tập hợp gARN này được phiên mã *in vitro*, và được chuyển nạp bằng cách sử dụng MessengerMax vào tế bào HEK293T mà biểu hiện về mặt cấu trúc Cas9. Tế bào được thu hoạch 48 giờ sau chuyển nạp, ADN hệ gen được phân lập, và hiệu quả cắt được đánh giá bằng cách sử dụng phân tích TIDE. ARN dẫn với lượng indel cao và tác dụng lệch đích được dự đoán thấp được chọn để phân tích thêm. Bảng 3 thể hiện các trình tự đích của gARN B2M được chọn.

Bảng 3. Các trình tự đích gARN B2M được chọn

Tên	Trình Tự Đích (5'-3')	SEQ ID NO:	PAM
gARN B2M-1 (Exon 1_T12)	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC	1	TGG
gARN B2M-2 (Exon 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TGG
gARN B2M-3 (Exon 1_T8)	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CGG
Exon 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TGG
Exon 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AGG
Exon 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GGG
Exon 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CGG

Exon 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CGG
Exon 1_T7	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	40	AGG
Exon 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	41	TGG
Exon 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATTC	42	GGG
Exon 1_T11	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CGG
Exon 1_T13	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG	44	AGG

[000335] Việc sàng lọc gARN B2M ở iPSC. Ba gARN (B2M-1, B2M-2, và B2M-3) được sử dụng để biên tập iPSC. Vị trí của trình tự đích của mỗi trong số các gARN này được vẽ sơ đồ trên Hình 2. Tế bào iPSC (dòng tế bào TC-1133, RUDCR, NJ) được chuyển nạp vào trong nhân bằng cách sử dụng chất chuyển nạp nhân Lonza 4D và bộ kit tế bào sơ cấp P3 (Lonza, cat#V4XP-3024) với hỗn hợp RNP của Cas9 (Aldevron, cat#9212-5MG) và gARN (Synthego) ở tỉ lệ mol bằng 3:1 (gARN:Cas9) với nồng độ cuối cùng bằng 125 pmol Cas9 và 375 pmol gARN. Tế bào được phân ly bằng cách sử dụng Accutase (Stempro, cat#A1110501), sau đó được tái tạo huyền phù trong môi trường DMEM/F12 (Gibco, cat#11320033), được đếm bằng cách sử dụng Cellometer (Nexcelon) và được ly tâm. Tế bào được tái tạo huyền phù trong chất đệm P3 với chất bổ sung 1 (tỉ lệ 4,5:1) ở nồng độ bằng 2×10^3 tế bào/ μ l. Tổng cộng 2×10^5 tế bào được kết hợp với phức hợp RNP, được chuyển sang cuvet chuyển nhiễm nhân (Lonza kit) và được chuyển nhiễm nhân bằng cách sử dụng chương trình CA-137. Đối với mỗi cuvet 250 μ l môi trường StemFlex (Gibco, cat#A3349401) bằng CloneR (Stem Cell Technologies, cat#05888) (tỉ lệ 1:10) được sử dụng để tái tạo huyền phù tế bào đã được chuyển nhiễm nhân. Huyền phù tế bào này được chia vào hai giếng của đĩa 24 giếng được phủ Vitronectin (Gibco, cat#A14700) với 250 μ l nữa của StemFlex bằng CloneR. Tế bào được thu hồi trong thiết bị ủ thiếu oxy (37°C, O₂ 4%, CO₂ 8%) trong thời gian 48 giờ. Sau 48 giờ, ADN hệ gen được thu hoạch từ một giếng của mỗi bản sao kỹ thuật bằng cách sử dụng bộ kit phân lập gADN (Qiagen, cat#69506)

[000336] gADN đã phân lập được đưa đi PCR để xác định tần suất indel. PCR đối với các vùng liên quan được thực hiện bằng cách sử dụng Platinum Taq Supermix (Invitrogen, cat#125320176 và Cat# 11495017) với các đoạn mồi B2M. Các trình tự đoạn mồi được nêu trong Bảng 4 và các vị trí của các đoạn mồi B2M tương quan với vị trí đích gARN được thể hiện trên Hình 2. Các điều kiện chu kỳ được nêu trong Bảng 5.

Bảng 4. Các đoạn mồi TIDE B2M

Tên	Loại	Trình tự (5'-3')	SEQ ID NO:
B2MF2	xuôi	CAGACAGCAAACCTCACCCAG	4
B2MR2	ngược	AAACTTTGTCCCGACCCTCC	5

Bảng 5. Các thông số chu kỳ PCR B2M

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính	94°C	2 phút	1
Biến tính	94°C	15 giây	38
Ủ	55°C	30 giây	
Mở rộng	68°C	45 giây	
Kéo dài	68°C	5 phút	1
Giữ	4	giữ	

[000337] Các sản phẩm khuếch đại thu được được đưa đi làm sạch PCR và xác định trình tự Sanger. Kết quả xác định trình tự Sanger được nhập vào Tsunami cùng với trình tự dẫn. Tỷ lệ phần trăm và sự xác định indel được tính bằng phần mềm (Hình 3A). gARN B2M-1, B2M-2, và B2M-3 lần lượt có tần suất indel bằng $2,5\% \pm 1,1\%$, $87,6\% \pm 14,1\%$,

và $63,9\% \pm 0,9\%$ ($n=2$). Các Hình **3B** và **3C** thể hiện sự phân bố của kết quả indel đối với gARN B2M-2 (Hình **3B**) và gARN B2M-3 (Hình **3C**).

[000338] Tế bào trong giếng bản sao được duy trì đến khi hợp lưu và sau đó được chuyển sang các bình lớn hơn tuần tự. Quần thể lớn được chuyển tiếp sang môi trường Advanced 20/10/10 (Xem bảng 6) và Laminin-521 (Stem Cell Technologies, cat#77004) để duy trì.

Bảng 6. Chế phẩm môi trường Advanced 20/10/10

Chất phản ứng	Lượng	Nồng độ hoạt động	Thông tin chất phản ứng
DMEM/F12 không có HEPES	955mL	Bazơ	Gibco (11330032)
Normocin	2 mL		Invivogen (ANTNR1)
Axit amin không thiết yếu, 100x	10 mL	1x	Gibco (11140076)
Lipit đã được xác định về mặt hóa học, 100x	2 mL	0,2x	Gibco (11905031)
HSA 20% (FAF)	5 mL	0,1%	Sigma (A1887)
Natri bicarbonat 7,5%	7 mL	0,0525%	Gibco (25080094)
Insulin người, 4 mg/ml	5 mL	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Invitrogen (12585014)
Natri clorua, 250mg/ml	2 mL	0,5 mg/mL	Sigma
Axit ascorbic, 200 mM	1 mL	200 μM	Sigma
Holo-transferin, 10 mg/ml	1 mL	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Sigma

Natri selenit, 140 µg/ml	100 µL	14 ng/mL	Sigma
Để tạo ra Advanced 20/10/10 hoàn chỉnh (thể tích 1 l) bổ sung các thành phần sau đây vào lần sử dụng đầu tiên			
FGF bazơ, 100 µg/ml	200 µL	20 ng/mL	Peprtech
Activin A, 100 µg/ml	100 µL	10 ng/mL	Peprtech
Heregulin, 100 µg/ml	100 µL	10 ng/mL	Peprtech

[000339] Tạo ra và xác định đặc điểm dòng IPS KO B2M. Các quần thể được biên tập lớn được xác nhận trình tự (Hình 4A) được sắp xếp theo tế bào đơn lẻ bằng cách sử dụng FACS-ARIA (BD Bioscience) vào đĩa 96 giếng được phủ Vitronectin và được thu hồi trong StemFlex bằng CloneR. Một cách vắn tắt, tế bào được phân ly từ các bình thót cổ duy trì bằng cách sử dụng Accutase và được tái tạo huyền phù trong StemFlex bằng CloneR. Sau đó tế bào được đếm bằng cách sử dụng Cellometer và được pha loãng đến $1 \times 10^5/\text{ml}$. 2 ml của nó được lọc qua lưới lọc tế bào (Falcon, #352235) vào ống FACS, được cung cấp cho bộ điều khiển và các tế bào đơn lẻ được sắp xếp vào các giếng riêng lẻ. Các tế bào đơn lẻ đã lắng ra đĩa được cho sinh trưởng trong thiết bị ủ thiếu oxy (37°C , CO_2 8%, O_2 4%) với sự thay đổi môi trường cách một ngày một lần đến khi các khuẩn lạc đủ lớn để được cấy lại như là các tế bào đơn lẻ. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết gADN (xem ở trên). Sự xác định dòng được xác nhận thông qua PCR và việc xác định trình tự Sanger (xem chi tiết dưới đây). Bảng 7 thể hiện các trình tự của các dòng được chọn xung quanh vị trí cắt (các trình tự được làm khuyết và/hoặc được cài xen được thể hiện ở dạng in đậm).

Bảng 7. Phân tích trình tự của các dòng KO B2M

Dòng	Trình tự (5'-3')	SEQ ID NO:
WT	CT XCGC T CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	27

A9	CT XCGC GCTACTTA - - - - -GZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	28
A11	CT XCGC TT CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
B10	CT AA - - - - - - - - -GGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	30
B12	CT XCGC TT CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
C5	CT XCGC - - - - - - - - -GCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	31
C9	CT XCGC - CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	32
C11	CT XCGC TT CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
C12	CT XCGC TT CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29

[000340] Các trình tự dòng được sắp xếp thẳng hàng trong phần mềm Snapgene để xác định sự nhận diện indel và tính đồng hợp tử hoặc tính dị hợp tử. Như thể hiện trên Hình 4B, 8 dòng là đồng hợp tử đối với KO B2M và 7 dòng là dị hợp tử đối với KO B2M. Dòng đồng hợp tử có sự biến tập mong muốn được mở rộng và được xác nhận thêm thông qua việc xác định trình tự và việc đếm tế bào theo dòng. Dòng ban đầu được duy trì trong môi trường StemFlex trên các đĩa phủ Vitronectin sau đó cuối cùng được chuyển tiếp sang môi trường Advanced 20/10/10 và các bình được phủ Laminin-521.

[000341] Tế bào được duy trì tiếp trên các bình thoát cổ được phủ Laminin-521 với Advanced 20/10/10. Dòng đã được biến tập được xác nhận để nhận diện indel thông qua PCR của vùng B2M và xác định trình tự Sanger. Knockout được xác nhận thông qua sự

đếm tế bào theo dòng đối với B2M và HLA-A (xem Bảng 8 và Bảng 9 về danh sách kháng thể được sử dụng) và phân tích Taqman qPCR của sự biểu hiện B2M bằng cách sử dụng quy trình Taqman tiêu chuẩn (Taqman FastAdvanced Mastermix, ThermoFisher, cat#4444556). Mức độ biểu hiện B2M đối với ba dòng KO B2M cũng như là tế bào kiểu dại (không được cải biến) được thể hiện trên Hình 5. Cả ba dòng KO được thử nghiệm thể hiện sự biểu hiện mARN giảm đi của B2M tương quan với tế bào kiểu dại.

Bảng 8. Kháng thể để đếm tế bào theo dòng đa năng

Đích	Chất huỳnh quang	Nhà sản xuất	Danh mục số
SSEA-4	AlexaFluor 647	ThermoFisher	SSEA421
Tra-1-60	PE	ThermoFisher	MA1-023-PE
Tra-1-81	PE	BD Bioscience	560161

Bảng 9. Kháng Thể Đối Với B2M Và HLA-ABC

Đích	Chất huỳnh quang	Nhà sản xuất	Danh mục số
B2M	AlexaFluor 647	Biolegend	316311
HLA-ABC	FITC	BD Pharmigen	555552

[000342] Việc chiết ARN được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit Qiagen RNeasy với ADNaza Không Có ARNaza theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Qiagen, cat#74104 và 79254). Việc tổng hợp cADN được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit tổng hợp cADN Advanced iScript để RT-qPCR (BioRad, cat#1725037) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tình trạng kiểu nhân của dòng được đánh giá thông qua dịch vụ Karyostat (ThermoFisher) và theo dõi sự bất thường kiểu nhân đã biết BCL2L1 thông qua ddPCR bằng cách sử dụng hướng dẫn của nhà sản xuất và ddPCR supermix đối với Đoạn dò (không có dUTP) (BioRad, cat#1863024; các đoạn mồi trong Bảng 10) với nhiệt độ ủ 59°C và RPP30 làm thử nghiệm tham chiếu.

Bảng 10. Bộ đoạn mỗi đoạn dò ddPCR

	BCL2L1 (Đích)	SEQ ID NO:	RPP30 (Tham chiếu)	SEQ ID NO:
Đoạn mỗi xuôi	TCTGCAGAAGGCTAC CCCTA	7	GATTTGGACCTGCGAG CG	9
Đoạn mỗi ngược	TGCTGTGTCTAAGACC TCTTTCAT	8	CAAGCCTGGCAATAAA CAATGA	10
Đoạn dò	Đoạn dò vạn năng #44 (Sigma, cat# 4688040001)	-	5' VIC-CTGCTGCCTGA- ACAT-3'-MGB-NFQ	11

[000343] Sản phẩm khuếch đại thu được được kiểm tra trên gel trên gel agarosa 2% đã đúc sẵn (ThermoFisher, cat#G501802) và được đưa đi làm sạch PCR và xác định trình tự Sanger. Tập xác định trình tự thu được được nhập vào phần mềm Tsunami cùng với trình tự gARN và tập trình tự đối chứng để xác định sự nhận diện indel và tỉ lệ phần trăm.

[000344] Dòng cũng được xác nhận là âm tính đối với sự biểu hiện của các kháng nguyên B2M và MHC lớp I (HLA-A, B, C), có hoặc không có sự xử lý Interferon-gamma (25 ng/ml, R & D Systems, 285-IF) thông qua việc đếm tế bào theo dòng của chúng. Xem Hình 6A-6D.

[000345] Dòng được xác nhận là giữ lại tính đa năng thông qua việc đếm tế bào theo dòng đối với chỉ thị bề mặt tế bào đa năng (Hình 7A-7D). Sự xác nhận thêm về tính đa năng bao gồm Taqman Scorecard (ThermoFisher, cat#A15872), dịch vụ Thermo Pluritest và sự biệt hóa Trilineage (xem quy trình đầy đủ dưới đây).

[000346] Tế bào được phân ly và được đếm như trên, trước khi ly tâm và tái tạo huyền phù trong môi trường Advanced 20/10/10 với 2 μ M Y-27632 (Tocris, cat#1245) lên đến 1×10^6 /ml. Sau đó tế bào đã được tái tạo huyền phù được lọc qua bộ lọc 40 μ M (Fisherbrand, cat#22363547) và 5 ml huyền phù được lắng ra trong giếng đơn lẻ của đĩa

6 giếng gắn cực thấp (Corning, cat#3471). Sau đó tế bào được lắng ra trên máy lắc quỹ đạo qua đêm ở tốc độ 98 vòng/phút để tạo thành khối kết tụ. Sau 16 giờ, môi trường đã tiêu thụ được loại bỏ khỏi mỗi giếng bằng cách xoay cẩn thận đĩa để thu gom khối kết tụ. 4 ml Advanced 20/10/10 mới được bổ sung.

[000347] Sau 24 giờ nữa, tế bào được biệt hóa. Khối kết tụ trước hết được thu gom vào ống hình nón 50 ml và được ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong thời gian 1 phút để làm lắng khối kết tụ. Môi trường được hút ra và khối kết tụ được rửa bằng DMEM/F12. Khối kết tụ lại được thu gom bằng cách ly tâm và được tái tạo huyền phù trong 4 ml môi trường biệt hóa tương ứng trước khi được đưa trở lại đĩa và máy lắc. Tất cả sự biệt hóa sử dụng môi trường cơ bản sau đây: 480 ml IMDM +Glutamax (Gibco, cat#31980030), 480 ml F12+Glutamax (Gibco, cat#31765035), 10 ml Axit amin không thiết yếu (Gibco, cat#11140076), 5 ml BSA 20% (Sigma, cat#A7638-5G), 2 ml Lipit đã được xác định về mặt hóa học (Gibco, cat#11905031), 1 ml Axit ascorbic 200 mM (Sigma, cat#A4403-100MG), 1 ml holo-transferin 10 mg/ml (Sigma, cat#T0665), và 100 µl Natri selenit 140 µg/ml (Sigma, cat#S5261). Để biệt hóa tế bào thành tế bào ngoại bì, nồng độ cuối cùng của insulin 4 mg/ml (Gibco, cat#12585014), 2 µM A83-01, 2 µM Dorsomorphin (Peprtech, cat#8666430) và 2 µM PNU-74654 được dùng trong hai ngày. Để biệt hóa tế bào thành tế bào trung bì, nồng độ cuối cùng của Insulin 1 µg/ml, 0,1 µM PIK-90, 3 µM CHIR99021 (Peprtech, cat#2520691) và 0,5 µM LDN193189 (Peprtech, cat#1062443) được dùng trong hai ngày. Đối với ngày 1 của sự biệt hóa nội bì, nồng độ cuối cùng của 0,2 µg/ml insulin, 0,1 µM PIK-90, 100 ng/ml Activin-A (Peprtech, cat#120-00), 2 µM CHIR99021 và 20 ng/ml FGF bazơ (Peprtech, cat#101-18b) được sử dụng. Hai ngày nữa của sự biệt hóa đối với nội bì được thực hiện với: 0,2 µg/ml insulin, 0,1 µM PIK-90, 100 ng/ml Activin A và 0,25 µM LDN193189. Môi trường được thay đổi hàng ngày đối với tất cả sự biệt hóa. Tất cả được thu gom để phân tích ARN bằng cách sử dụng Taqman Scorecard vào ngày 3.

Ví dụ 2: Duy trì và mở rộng tế bào.

[000348] **Duy trì hESC/hiPSC.** Tế bào của dòng tế bào gốc phôi người (hESC) CyT49 được duy trì, được nuôi cấy, được cấy chuyển, được tăng sinh, và được lắng ra đĩa như

được mô tả trong Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004. Tế bào CyT49 được phân ly bằng cách sử dụng ACCUTASE® (Stemcell Technologies 07920 hoặc tương đương).

[000349] Tế bào gốc đa năng được cảm ứng của người (hiPSC), chẳng hạn như dòng tế bào TC1133 (Lonza), được duy trì trong StemFlex Complete (Life Technologies, A3349401) trên đĩa nuôi cấy mô được phủ BIOLAMININ 521 CTG (BioLamina Cat# CT521). Các đĩa này được phủ trước bằng dịch pha loãng 1:10 hoặc 1:20 của BIOLAMININ trong DPBS, canxi, magie (Life Technologies, 14040133) trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Tế bào được cho ăn hàng ngày bằng môi trường StemFlex. Để cấy chuyển tế bào, cùng mật độ của tế bào như đối với CyT49 được sử dụng. Để lắng ra đĩa tế bào như các tế bào đơn lẻ, tế bào được lắng ra đĩa với chất bổ sung RevitaCell™ 1% (100X) (Thermofisher Cat#A2644501) trong StemFlex trên đĩa được phủ BIOLAMININ.

[000350] **Tách dòng tế bào đơn lẻ của hPSC.** Để tách dòng tế bào đơn lẻ, hPSC (hESC hoặc hiPSC) được nuôi bằng StemFlex Complete với Revitacell (đối với nồng độ cuối cùng bằng 1X Revitacell) 3-4 giờ trước khi phân ly bằng ACCUTASE®. Sau khi phân ly, tế bào được sắp xếp dưới dạng các tế bào đơn lẻ trong mỗi giếng của đĩa nuôi cấy mô 96 giếng được phủ BIOLAMININ. Máy sắp xếp WOLF FACS (Nanocollect) được sử dụng để sắp xếp các tế bào đơn lẻ vào các giếng. Các đĩa này được nhồi trước với 100-200 µl StemFlex Complete với Revitacell. Ba ngày sau khi cấy tế bào, tế bào được nuôi bằng StemFlex mới và tiếp tục được nuôi cách một ngày một lần bằng 100-200 µl môi trường. Sau khi sinh trưởng 10 ngày, tế bào được cho ăn hàng ngày bằng StemFlex đến ngày 12-14. Vào lúc này, các đĩa này được phân ly bằng ACCUTASE® và huyền phù tế bào đã được thu gom được chia ra 1:2 với một nửa cho vào đĩa 96 giếng mới để duy trì và một nửa cho vào dung dịch chiết ADN QuickExtract™ ADN Extraction Solution (Lucigen). Sau khi chiết ADN, PCR được thực hiện để đánh giá sự có mặt hoặc không có mặt của sự biên tập gen mong muốn tại locut ADN được nhắm đích. Việc xác định trình tự Sanger được sử dụng để xác nhận các biên tập mong muốn.

[000351] **Mở rộng các dòng hPSC có nguồn gốc từ tế bào đơn lẻ.** Đối với CyT49, các dòng đã được nhắm đích thành công được cấy chuyển trên đĩa 24 giếng với môi trường XF KSR A10H10 10% tinh khiết nhưng trên các đĩa được phủ BIOLAMININ. Sau giai

đoạn 24 giếng, các dòng CyT49 được cấy chuyển như được mô tả trong Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

[000352] Đối với hiPSC (TC1133), tế bào được duy trì trong StemFlex Complete trong suốt quá trình tách dòng và duy trì thường xuyên trên các đĩa được phủ BIOLAMININ với Revitacell ở tất cả các giai đoạn cấy chuyển.

Ví dụ 3: Tạo ra tế bào gốc người đa năng bị knock-out B2M (hPSC)

[000353] Chọn lọc ARN dẫn (gARN) đối với B2M trong hPSC. Ba gARN nhắm đích B2M được mô tả ở trên trong Ví dụ 1 được sử dụng để nhắm đích gen B2M trong hPSC. Để đánh giá hiệu quả cắt của chúng trong hPSC, tế bào CyT49 được đục lỗ điện bằng cách sử dụng Thiết bị đục lỗ điện Neon (Bộ Kit Chuyển Nạp Neon ThermoFisher Cat# MPK5000) với hỗn hợp ribonucleoprotein (RNP) của protein Cas9 (Biomay) và ARN dẫn (Synthego) ở tỉ lệ mol bằng 3:1 (gARN:Cas9) với các giá trị tuyệt đối bằng 125 pmol Cas9 và 375 pmol gARN. Để tạo thành phức hợp RNP, gARN và Cas9 được kết hợp trong một bình với chất đệm R (Bộ Kit Chuyển Nạp Neon) đến tổng thể tích bằng 25 μ l và được ủ trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tế bào được phân ly bằng cách sử dụng ACCUTASE®, sau đó được tái tạo huyền phù trong môi trường DMEM/F12 (Gibco, cat#11320033), được đếm bằng cách sử dụng NC-200 (Chemometec) và được ly tâm. Tổng cộng 1×10^6 tế bào được tái tạo huyền phù với phức hợp RNP và chất đệm R được bổ sung đến tổng thể tích bằng 125 μ l. Sau đó hỗn hợp này được đục lỗ điện bằng 2 xung trong 30 ms ở 1100 V. Sau khi đục lỗ điện, tế bào được lấy ra bằng pipet cho vào ống Eppendorf đã được nhồi với môi trường StemFlex bằng RevitaCell. Sau đó huyền phù tế bào này được lắng đĩa nuôi cấy mô đã được phủ trước bằng BIOLAMININ 521 CTG ở độ pha loãng 1:20. Tế bào được nuôi cấy trong thiết bị ủ có mức oxy bình thường (37°C, CO₂ 8%) trong thời gian 48 giờ. Sau 48 giờ, ADN hệ gen được thu hoạch từ tế bào bằng cách sử dụng QuickExtract (Lucigen, Middleton, WI; Cat#QE09050).

[000354] PCR đối với trình tự B2M đích được thực hiện và ADN đã khuếch đại thu được được đánh giá về hiệu quả cắt bằng cách phân tích TIDE. PCR đối với các vùng liên quan được thực hiện bằng cách sử dụng Platinum Taq Supermix (Invitrogen, cat#125320176 và Cat# 11495017). Các trình tự của các đoạn mồi PCR được thể hiện

trong Bảng 4; và các điều kiện chu kỳ nêu trong Bảng 5. Các sản phẩm khuếch đại thu được được đưa đi làm sạch PCR và xác định trình tự Sanger. Kết quả xác định trình tự Sanger được nhập vào phần mềm Tsunami cùng với trình tự dẫn. Tỷ lệ phần trăm và sự xác định indel được tính bằng phần mềm. Sau đó gARN cụ thể được chọn dựa trên tần suất indel của chúng trong hPSC. Hình 8 thể hiện hiệu quả cắt đối với 3 gARN B2M.

[000355] Sự lệch đích của gARN được chọn được đánh giá ở ADN có nguồn gốc từ tế bào gốc bằng cách sử dụng phân tích bắt giữ thể lai của các vị trí được dự đoán độ tương tự trình tự. B2M-2 và B2M-3 dẫn không thể hiện tác dụng lệch đích có thể phát hiện được. gARN B2M-2 được chọn để tạo ra dòng tiếp do hoạt tính trúng đích cao của nó và hoạt tính lệch đích không thể phát hiện được.

[000356] Sự tạo ra và sự xác định đặc điểm dòng hPSC KO B2M. Bằng cách sử dụng gARN B2M-2, hESC CyT49 được đục lỗ điện và được sắp xếp tế bào đơn lẻ 3 ngày sau khi đục lỗ điện bằng cách sử dụng thiết bị sắp xếp WOLF FACS (Nanocollect) vào đĩa 96 giếng được phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex và Revitacell. Các tế bào đơn lẻ đã lắng ra đĩa được cho sinh trưởng trong thiết bị ủ có mức oxy bình thường (37°C, CO₂ 8%) với sự thay đổi môi trường cách một ngày một lần đến khi các khuẩn lạc đủ lớn để được cấy lại như là các tế bào đơn lẻ. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen.

[000357] Tình trạng KO B2M của dòng được xác định thông qua PCR và việc xác định trình tự Sanger. Các trình tự ADN thu được của vùng B2M đích được sắp xếp thẳng hàng trong phần mềm Snapgene để xác định sự nhận diện indel và tính đồng hợp tử hoặc tính dị hợp tử. Dòng có sự biến tập mong muốn được mở rộng và được xác nhận thêm thông qua việc đánh giá đếm tế bào theo dòng đối với sự biểu hiện B2M (Xem Bảng 11 về danh sách của kháng thể được sử dụng). Dòng được đánh giá có hoặc không có sự xử lý Interferon-gamma (25 ng/ml, R & D Systems, 285-IF). Hình 9A thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào kiểu dại và Hình 9B thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào KO. Tình trạng kiểu nhân của dòng được đánh giá thông qua dịch vụ Cell Line Genetics (Madison, WI) và kiểu nhân bình thường được báo cáo.

Bảng 11. Kháng thể để đếm tế bào theo dòng đa năng

Kháng nguyên	Dòng	Chất huỳnh quang	Nhà sản xuất	Danh mục #
Oct3/4	40/3	Alexa 647	BD Bioscience	560329
SOX2	030-678	PE	BD Bioscience	562195
B2M	2M2	PE	Biolegend	316305
HLA-ABC	W6/32	Alexa 488	Biolegend	311415
mIgG1 kappa	N/A	PE	BD Bioscience	555749
PD-L1	B7-H1	Alexa-488	ThermoFisher	53-5983-42
HLA-E	3D12	PE	ThermoFisher	12-9953-42

[000358] Dòng được xác nhận là giữ lại tính đa năng thông qua việc đếm tế bào theo dòng nội bào đối với các chỉ thị đa năng OCT4 và SOX2. Dòng đa năng đã được xác nhận được biệt hóa thành tế bào tiền thân nội tiết tụy bằng cách sử dụng phương pháp đã được thiết lập trước đây (Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004).

Ví dụ 4: Tạo ra tế bào gốc người đa năng bị knock-out B2M knock-in PD-L1 (hPSC)

[000359] **Thiết kế của chiến lược B2M-KO PD-L1-KI.** Thiết kế plasmit để cài xen PD-L1 (CD274) vào locut B2M được tạo ra nhờ đó bộ ba mở đầu của B2M được loại bỏ sau khi trải qua sự sửa chữa định hướng tương đồng (HDR) để cài xen PD-L1, thủ tiêu bất kỳ cơ hội nào của sự biểu hiện B2M một phần. Hình 10 thể hiện sơ đồ của plasmit và Bảng 12 xác định các thành phần và vị trí ở trong đó. Plasmit cho chứa gen khởi đầu CAGGS điều khiển cADN của PD-L1 được kẹp hai bên bằng các nhánh tương đồng có 800 cặp bazơ với trình tự giống hệt với locut B2M xung quanh exon 1. Trình tự hoàn chỉnh của plasmit được thể hiện trong SEQ ID NO: 33.

Bảng 12. Các thành phần của plasmid cho B2M-CAGGS-PD-L1

Thành phần	Vị trí (kích thước theo bp)	SEQ ID NO:
ITR bên trái	1-130 (130)	12
LHA-B2M	145-944 (800)	13
vùng tăng cường CMV	973-1352 (380)	14
gen khởi đầu β -actin gà	1355-1630 (276)	15
intron khảm	1631-2639 (1009)	16
PD-L1	2684-3556 (873)	17
tín hiệu poly(A) bGH	3574-3798 (225)	18
RHA-B2M	3805-4604 (800)	19
ITR bên phải	4646-4786 (141)	20

[000360] gARN B2M-2 được sử dụng để làm thuận lợi cho sự cài xen của gen chuyển PD-L1 tại locut B2M đích. Plasmid cho PD-L1 được đưa vào cùng với phức hợp RNP được tạo thành bởi gARN nhắm đích B2M và protein Cas9. Cho mỗi 1 triệu tế bào CyT49, 4 μ g ADN plasmid được phân phối cùng với RNP. Sự đục lỗ điện được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 3. Bảy ngày sau khi đục lỗ điện, tế bào được sắp xếp đối với sự biểu hiện PD-L1 bề mặt bằng cách sử dụng thiết bị sắp xếp WOLF FACS (Nanocollect) vào đĩa 96 giếng được phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex với RevitaCell. Để sắp xếp bằng FACS, tế bào chưa được biên tập đóng vai trò làm đối chứng âm. Tế bào dương tính PD-L1 được chọn để sắp xếp và tách dòng tế bào đơn lẻ.

[000361] Để phát hiện sự biểu hiện PD-L1 bề mặt, kháng thể huỳnh quang kháng-PD-L1 được sử dụng (xem Bảng 11). Các tế bào đơn lẻ đã lắng ra đĩa được cho sinh trưởng trong thiết bị ủ có mức oxy bình thường (37°C, CO₂ 8%) với sự thay đổi môi trường cách

một ngày một lần đến khi các khuẩn lạc đủ lớn để được cấy lại như là các tế bào đơn lẻ. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen.

[000362] Các dòng được nhắm đích đúng được xác định thông qua PCR đối với sự cài xen knock-in (KI) PD-L1 bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà khuếch đại vùng từ bên ngoài các nhánh tương đồng plasmit đến chỗ cài xen cADN PD-L1 giúp cho chỉ có thể khuếch đại ADN được tính hợp KI. Sự cài xen trúng đích được thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử bằng PCR để đánh giá KI đã xảy ra theo phương thức dị hợp tử hay đồng hợp tử. Nếu dòng dị hợp tử được xác định, alen âm tính KI được gửi đi xác định trình tự Sanger để xác nhận rằng nó chứa indel phá vỡ B2M. Các dòng KI đúng với sự phá vỡ B2M hoàn toàn (thông qua sự cài xen KI hoặc sự tạo thành indel) được mở rộng trong định dạng nuôi cấy mô tăng dần đến khi đạt đến kích thước quần thể là 30 triệu tế bào. Xấp xỉ 10 dòng được mở rộng theo phương thức này và được xác nhận là đa năng bằng cách thử nghiệm đối với OCT4 và SOX2 thông qua việc đếm tế bào theo dòng nội bào (Hình 11). Sau đó các dòng mà đã vượt qua các thử nghiệm nêu trên, được thử nghiệm thêm để phân tích kiểu nhân (Cell Line Genetics), như được mô tả dưới đây. Ngoài ra, sau đó các dòng được thử nghiệm về thẩm quyền của chúng để biệt hóa thành tiền thân nội bì tụy (PEC) thông qua quy trình đã được thiết lập (Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004), như được mô tả dưới đây. Sự mất đi của B2M được xác nhận tiếp bởi việc thiếu sự biểu hiện của B2M có hoặc không có sự xử lý Interferon-gamma (25 ng/ml, R & D Systems, 285-IF) thông qua việc đếm tế bào theo dòng. Hình 12A và 12B thể hiện sự biểu hiện PD-L1 lần lượt trong tế bào kiểu dại và tế bào KO B2M/KI PD-L1.

Ví dụ 5: Tạo ra tế bào gốc người đa năng bị knock-out B2M knock-in HLA-E (hPSC)

[000363] **Thiết kế chiến lược B2M-KO HLA-E -KI.** Thiết kế plasmit để cài xen trime HLA-E vào locut B2M được tạo ra nhờ đó bộ ba mở đầu của B2M được loại bỏ sau khi trải qua sự sửa chữa định hướng tương đồng (HDR) để cài xen trime HLA-E, thủ tiêu bất kỳ cơ hội nào của sự biểu hiện B2M một phần. Hình 13 thể hiện sơ đồ của plasmit và Bảng 13 xác định các thành phần và vị trí ở trong đó. cADN trime HLA-E được tạo thành bởi peptit tín hiệu B2M dung hợp với peptit trình diện HLA-G dung hợp với protein màng B2M dung hợp với protein HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó. Thiết kế trime này đã được công bố trước đây (Gornalusse et al. (2017) Nat. Biotechnol. 35(8):

765-772). Plasmid cho để phân phối HLA-E chứa gen khởi đầu CAGGS gây ra sự biểu hiện của trime HLA-E được kẹp hai bên bằng các nhánh tương đồng có 800 cặp bazơ với trình tự giống hệt với locut B2M xung quanh exon 1. Trình tự hoàn chỉnh của plasmid được thể hiện trong SEQ ID NO: 34.

Bảng 13. Các thành phần của plasmid cho B2M-CAGGS-HLA-E

Thành phần	Vị trí (kích thước theo bp)	SEQ ID NO:
ITR bên trái	1-130 (130)	12
LHA-B2M	145-944 (800)	13
vùng tăng cường CMV	973-1352 (380)	14
gen khởi đầu β -actin gà	1355-1630 (276)	15
intron khảm	1631-2639 (1009)	16
trình tự tín hiệu B2M	2684-2743 (60)	21
peptit HLA-G	2744-2770 (27)	22
cầu nối GS	2771-2815 (45)	23
protein màng B2M	2816-3112 (297)	24
cầu nối GS	3113-3172 (60)	25
HLA-E	3173-4183 (1011)	26
tín hiệu poly(A) bGH	4204-4428 (225)	18
RHA-B2M	4435-5234 (800)	19
ITR bên phải	5276-5416 (141)	20

[000364] gARN B2M-2 được sử dụng để làm thuận lợi cho sự cài xen của gen chuyển HLA-E tại locut B2M đích. Plasmid cho HLA-E được đưa vào cùng với phức hợp RNP được tạo thành bởi gARN nhắm đích B2M và protein Cas9. Cho mỗi 1 triệu tế bào CyT49, 4 µg ADN plasmid được phân phối cùng với RNP. Sự đục lỗ điện được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 3. Bảy ngày sau khi đục lỗ điện, tế bào được sắp xếp đối với sự biểu hiện HLA-E bề mặt bằng cách sử dụng thiết bị sắp xếp WOLF FACS (Nanocollect) vào đĩa 96 giếng được phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex với RevitaCell. Để sắp xếp bằng FACS, tế bào chưa được biên tập đóng vai trò làm đối chứng âm. Tế bào dương tính HLA-E được chọn để sắp xếp và tách dòng tế bào đơn lẻ.

[000365] Để phát hiện sự biểu hiện HLA-E bề mặt, kháng thể huỳnh quang kháng-HLA-E được sử dụng (Bảng 11). Các tế bào đơn lẻ đã lắng ra đĩa được cho sinh trưởng trong thiết bị ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) với sự thay đổi môi trường cách một ngày một lần đến khi các khuẩn lạc đủ lớn để được cấy lại như là các tế bào đơn lẻ. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen.

[000366] Các dòng được nhắm đích đúng được xác định thông qua PCR đối với sự cài xen knock-in (KI) HLA-E bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà khuếch đại vùng từ bên ngoài các nhánh tương đồng plasmid đến chỗ cài xen cADN HLA-E giúp cho chỉ có thể khuếch đại ADN được tích hợp KI. Sự cài xen trúng đích được thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử bằng PCR để đánh giá KI đã xảy ra theo phương thức dị hợp tử hay đồng hợp tử. Nếu dòng dị hợp tử được xác định, alen âm tính KI được gửi đi xác định trình tự Sanger để xác nhận rằng nó chứa indel phá vỡ B2M. Các dòng KI đúng với sự phá vỡ B2M hoàn toàn (thông qua sự cài xen KI hoặc sự tạo thành indel) được mở rộng trong định dạng nuôi cấy mô tăng dần đến khi đạt đến kích thước quần thể là 30 triệu tế bào. Xấp xỉ 10 dòng được mở rộng theo phương thức này và được xác nhận là đa năng bằng cách thử nghiệm đối với OCT4 và SOX2 thông qua việc đếm tế bào theo dòng nội bào (Hình 14). Sau đó các dòng mà đã vượt qua các thử nghiệm nêu trên được thử nghiệm thêm để phân tích kiểu nhân (Cell Line Genetics). Ngoài ra, các dòng được thử nghiệm về thẩm quyền của chúng để biệt hóa thành tiền thân nội bì tụy (PEC) thông qua quy trình đã được thiết lập (Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004). Sự mất đi của B2M được xác nhận tiếp bởi việc thiếu sự biểu hiện của HLA-A,B,C có hoặc không có sự xử

lý Interferon-gamma (50 ng/ml, R & D Systems, 285-IF) thông qua việc đếm tế bào theo dòng (Hình 15). Hình 16 thể hiện sự biểu hiện HLA-E.

Ví dụ 6: Phân tích kiểu nhân của dòng đã được biên tập

[000367] Phân tích xác định kiểu nhân bằng g của tế bào gốc phôi (ES) đã được biên tập. 1 triệu tế bào ES đã được biên tập được cấy chuyển vào bình thót cổ nuôi cấy T-25 với môi trường nuôi cấy (DMEM/F12+KSR không chứa Xeno 10% với 10 ng/ml Activin và 10 ng/ml Heregulin). Sau khi nuôi cấy qua đêm, ba bình thót cổ nuôi cấy T25 được chuyển sang Cytogenetics Laboratory (Cell Line Genetics, Inc.) để phân tích xác định kiểu nhân; phân tích FISH đối với nhiễm sắc thể 1, 12, 17, 20; và phân tích lai hóa hệ gen so sánh mảng (aCGH) với mảng 8x60K tiêu chuẩn. Kết quả băng G của tế bào được chọn đã được đọc lỗ điện với các đoạn dẫn không cắt ("NCG"), dòng KO B2M, dòng B2M HO/PD-L1 HI ("V1-A"), và dòng KO B2M/KI HLA-E ("V2-A") được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14. Kết quả xác định kiểu nhân bằng G

Dòng tế bào	Loại	Cấy chuyển	Phân tích kiểu nhân	Phân tích FISH	Phân tích mảng aCGH
NCG#1	đoạn dẫn không cắt	P36	Bình thường	Bình thường	vượt qua
NCG#2	đoạn dẫn không cắt	P36	Bình thường	Bình thường	vượt qua
B2MKO#1	KO B2M	P38	Bình thường	Bình thường	vượt qua
B2MKO#2	KO B2M	P36	Bình thường	Bình thường	vượt qua

B2MKO#3	KO B2M	P36	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V1-A003	KO B2M/KI PD-L1	P37	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V1-A004	KO B2M/KI PD-L1	P38	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V1-A007	KO B2M/KI PD-L1	P37	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V1-A008	KO B2M/KI PD-L1	P38	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V2-A005	KO B2M/KI HLA-E	P42	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V2-A006	KO B2M/KI HLA-E	P38	Bình thường	Bình thường	vượt qua
V2-A007	KO B2M/KI HLA-E	P38	Bình thường	Bình thường	vượt qua

Ví dụ 7: Biệt hóa tế bào gốc phôi người đã được biên tập thành tế bào nội bì tụy (PEC)

[000368] Duy trì tế bào gốc phôi (ES) người đã được biên tập. Tế bào gốc phôi người đã được biên tập ở các lần cấy chuyển khác nhau (P38-42) được cấy ở 33.000 tế bào/cm² để cấy chuyển 4 ngày hoặc 50.000 tế bào/cm² để cấy chuyển 3 ngày với môi trường hESM (DMEM/F12+10% KSR+ 10 ng/ml Activin A và 10 ng/ml Heregulin) và huyết thanh AB người 10% cuối cùng.

[000369] Kết tụ tế bào gốc phôi người đã được biên tập để biệt hóa PEC. ES đã được biên tập được phân ly thành các tế bào đơn lẻ với ACCUTASE® và sau đó được ly tâm và được tái tạo huyền phù trong 2% StemPro (Cat#A1000701, Invitrogen, CA) trong môi

trường DMEM/F12 ở 1 triệu tế bào trong mỗi ml, và tổng cộng 350-400 triệu tế bào được cấy trong một chai dạng con lăn 850 cm² (Cat#431198, Corning, NY) với tốc độ quay là 8 vòng/phút $\pm$ 0,5 vòng/phút trong 18-20 giờ trước khi biệt hóa biệt hóa. Khối kết tụ ES từ tế bào gốc phôi người đã được biên tập là sự biệt hóa thành các dòng tụy bằng cách sử dụng chai dạng con lăn như được mô tả trong Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

Ví dụ 8: Xác định đặc điểm của tế bào nội bì tụy đã biệt hóa (PEC)

[000370] Đếm tế bào theo dòng đối với FOXA2 và SOX17 ở Giai đoạn 1 (DE) và CHGA, PDX1 và NKX6.1 ở giai đoạn PEC. Khối kết tụ giai đoạn 1 có nguồn gốc từ hESC, hoặc khối kết tụ tụy có nguồn gốc từ hESC, được rửa bằng PBS và sau đó được phân ly bằng enzym thành huyền phù tế bào đơn lẻ ở nhiệt độ 37°C bằng cách sử dụng ACCUMAX™ (Catalog# A7089, Sigma, MO). Chất Đệm Tách MACS (Cat#130-091-221, Miltenyi Biotec, North Rhine-Westphalia, Đức) được bổ sung và huyền phù được cho đi qua bộ lọc 40 μ M và được tạo viên. Để nhuộm màu chỉ thị nội bào, tế bào được cố định trong thời gian 30 phút trong paraformaldehyt 4% (khối lượng/thể tích), được rửa trong Chất Đệm FACS (PBS, BSA 0,1% (khối lượng/thể tích), NaN₃ 0,1% (khối lượng/thể tích)) và sau đó tế bào được làm cho thấm bằng Chất Đệm Perm (PBS, Triton X-100 0,2% (thể tích/thể tích) (Cat#A16046, Alfa Aesar, MA), huyết thanh lừa bình thường 5% (thể tích/thể tích), NaN₃ 0,1% (khối lượng/thể tích)) trong thời gian 30 phút trên nước đá và sau đó được rửa bằng chất đệm rửa (PBS, 1% (khối lượng/thể tích) BSA, NaN₃ 0,1% (khối lượng/thể tích)). Tế bào được ủ với kháng thể sơ cấp (Bảng 15) được pha loãng với Chất Đệm Phong Bể (PBS, Triton X-100 0,1% (thể tích/thể tích), huyết thanh lừa bình thường 5% (thể tích/thể tích), NaN₃ 0,1% (khối lượng/thể tích)) qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Tế bào được rửa trong chất đệm IC và sau đó được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ 4°C. Tế bào được rửa trong chất đệm IC và sau đó trong Chất Đệm FACS. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được thu lấy bằng Máy Đếm Tế Bào Theo Dòng NovoCyte (ACEA Biosciences, Brussels). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (Tree Star, Inc.). Tế bào nguyên vẹn được xác định dựa trên thiết bị tán sắc ánh sáng tiến (góc thấp) và bên (góc vuông, 90°). Mức nền được ước tính bằng cách sử dụng đối chứng kháng thể và tế bào chưa biệt hóa. Trên các

hình vẽ, đồ thị đếm tế bào theo dòng đại diện được thể hiện đối với một trong số các quần thể con. Các số được báo cáo trong các hình vẽ thể hiện tỉ lệ phần trăm của tổng số tế bào từ công tế bào nguyên vẹn.

Bảng 15. Kháng thể để đếm tế bào theo dòng để xác định đặc điểm của PEC đã biệt hóa

Kháng nguyên	Chất huỳnh quang	Nguồn	Độ pha loãng
SOX17	AF647	BD Bioscience (Cat#562594)	1:50
FOXA2	PE	Miltenyi Biotechnology (Cat#130-107-773)	1:10
PDX1	PE	BD Bioscience (Cat#562161)	1:2,5
NKX6,1	AF647	BD Bioscience (Cat#563338)	1:2,5
CHGA	AF405	Novus (Cat#NBP2-33198AF405)	1:1000

[000371] Ở giai đoạn DE, quần thể của tế bào dương tính kép FOXA2 và SOX17 lớn hơn 90% tổng số tế bào từ tế bào biệt hóa kiểu đại CyT49. Tế bào KI PD-L1/KO B2M, KI HLA-E/KO B2M, và KO B2M thể hiện tỉ lệ phần trăm có thể so sánh được của DE so với tế bào kiểu đại (Hình 17A-17B và Hình 18).

[000372] Ở giai đoạn PEC, sự đếm tế bào theo dòng đối với chromogranin (CHGA), PDX1 và NKX6.1 được thực hiện. Quần thể dị loại ở giai đoạn PEC bao gồm tế bào tiền thân tụy, nội tiết sớm (Hình 19). Từ biểu đồ tròn của quần thể dị loại (Hình 20), sự phân bố của các quần thể tế bào từ tế bào đã được biên tập đã biệt hóa (KI PD-L1/KO B2M hoặc KO B2M) rất tương tự với tế bào kiểu đại.

[000373] RNAseq nhắm đích. RNAseq nhắm đích đối với phân tích biểu hiện gen được thực hiện bằng cách sử dụng Illumina TruSeq và bảng tùy chỉnh của các oligo nhắm đích 111 gen. Bảng này chủ yếu chứa các gen mà là chỉ thị của các giai đoạn phát triển trong

quá trình biệt hóa tủy. Khi kết thúc mỗi giai đoạn biệt hóa, 10 μ l APV (thể tích viên được kết tụ) được thu gom và được chiết bằng cách sử dụng quy trình cột quay Qiagen RNeasy hoặc RNeasy 96, bao gồm sự xử lý ADNaza trên cột. Sự định lượng và sự kiểm soát chất lượng được thực hiện bằng cách sử dụng TapeStation kết hợp với Qubit, hoặc bằng cách bằng cách sử dụng Qiagen QIAxcel. 50-200 ng ARN được xử lý theo quy trình điều chế thư viện Illumina TruSeq, mà gồm có sự tổng hợp cADN, sự lai hóa của tập hợp oligo tùy chỉnh, rửa, mở rộng, nối của oligo đã liên kết, sự khuếch đại PCR của thư viện, và sự làm sạch thư viện, trước khi định lượng và kiểm soát chất lượng của các thư viện dsADN thu được bằng cách sử dụng TapeStation kết hợp với Qubit, hoặc bằng cách bằng cách sử dụng Qiagen QIAxcel. Các thư viện được pha loãng tiếp đến nồng độ 4 nM và được gom lại, sau đó là làm biến tính, làm tăng vọt đối chứng PhiX, và pha loãng thêm đến 10-12 pM trước khi tải lên thiết bị xác định trình tự Illumina MiSeq. Sau khi chạy xác định trình tự, phân tích dữ liệu ban đầu được thực hiện tự động thông qua BaseSpace, tạo ra số đếm đọc được thô đối với mỗi đoạn dò tùy chỉnh. Đối với mỗi gen, sau đó các số đếm đọc được này được tính tổng đối với tất cả các đoạn dò tương ứng với gen đó, với sự bổ sung 1 số đếm đọc được (để ngăn chặn phép chia xuôi cho 0). Sự chuẩn hóa được thực hiện đối với gen SF3B2, và kết quả đọc được trực quan hóa theo cách thông thường dưới dạng số lần thay đổi so với Giai đoạn 0. Khi dữ liệu được xử lý để phân tích thành phần chính, sự chuẩn hóa được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp DEseq. Sự biểu hiện gen được chọn được thể hiện trên Hình 21. Kiểu biểu hiện động học của *FOXA2*, *CHGA*, *PDX1* và *NKX6.1* từ tế bào KI PD-L1/KO B2M hoặc KO B2M tương tự với tế bào kiểu đại.

[000374] Xác nhận sự biểu hiện B2M và PD-L1 ở giai đoạn PEC. Ở giai đoạn PEC, khối kết tụ đã biệt hóa được kích thích có hoặc không có interferon-gamma (50 ng/ml) trong thời gian 48 giờ. Khối kết tụ được rửa bằng PBS và sau đó được phân hủy bằng enzym thành huyền phù tế bào đơn lẻ ở nhiệt độ 37°C bằng cách sử dụng ACCUMAX™ (Catalog# A7089, Sigma, MO). Chất Đệm Tách MACS (Cat#130-091-221, Miltenyi Biotec, North Rhine-Westphalia, Đức) được bổ sung và huyền phù được cho đi qua bộ lọc 40 μ M và được tạo viên. Để nhuộm màu chỉ thị bề mặt, tế bào đã phân hủy được ủ với kháng thể liên hợp huỳnh quang đã pha loãng trong Chất Đệm Tách MACS trong thời gian 20 phút và sau đó được rửa trong Chất Đệm Tách MACS. Tế bào được tái tạo

huyền phù trong Chất Đệm FACS để thu dòng. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được thu lấy bằng Máy Đếm Tế Bào Theo Dòng NovoCyte. Như thể hiện Hình 22A-22F, sự biểu hiện B2M ở dưới giới hạn phát hiện trong PEC đã biệt hóa từ KI PD-L1/KO B2M hoặc KO B2M, và PDL1 được biểu hiện trong PEC đã biệt hóa từ tế bào KI PD-L1/KO B2M.

[000375] Kiểu hình miễn dịch của tế bào PEC. Ở giai đoạn PEC, khối kết tụ đã biệt hóa được kích thích có hoặc không có interferon-gamma (50 ng/ml) trong thời gian 48 giờ. Khối kết tụ được thu hoạch để nhuộm màu MHC lớp I và II. Không có sự biểu hiện MHC lớp II ở giai đoạn PEC từ tế bào kiểu dại hoặc tế bào đã được biên tập (tế bào KI PD-L1/KO B2M và KO B2M) (Hình 23D-23F). Sự biểu hiện của HLA-ABC (MHC lớp I) là thấp (1,3% từ tế bào kiểu dại) và nó được điều hòa tăng khi kích thích IFN- γ . Tuy nhiên, HLA-ABC không được biểu hiện ngay cả trong điều kiện kích thích IFN- γ trong tế bào đã được biên tập (tế bào KI PD-L1/KO B2M và KO B2M) (Hình 23A-23C).

Ví dụ 9: Thử nghiệm hoạt hóa/tăng sinh tế bào T

[000376] Tế bào đã biệt hóa PEC được thử nghiệm về khả năng của chúng để kích hoạt đáp ứng miễn dịch thông qua thử nghiệm hoạt hóa/tăng sinh tế bào T người *in vitro*. PBMC thể cho mới được mua từ Hemacare và tế bào T CD3⁺ được tinh chế bằng cách sử dụng bộ Kit Phân Lập Tế Bào T Pan, người (Miltenyi Cat#130-096-535). Tế bào T đã phân lập được gắn nhãn bằng Quy Trình Kit Tăng Sinh Tế Bào CFSE CellTrace™ (Thermofisher Cat#C34554) theo hướng dẫn sử dụng của người sản xuất và được đồng ủ với PEC đã biệt hóa trong thời gian 5 ngày. Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 Để Mở Rộng Và Hoạt Hóa Tế Bào T (Thermofisher Cat# 11161D) được sử dụng làm đối chứng dương để hoạt hóa tế bào T. Một mình tế bào T được gắn nhãn bằng CFSE và dùng làm đối chứng âm. Phần trăm của tế bào CD3⁺ CFSE⁺ được đo để đánh giá phần trăm của sự tăng sinh tế bào T (Hình 24A-24D). Sự tăng sinh tế bào T được kích hoạt bằng WT PEC ở trên đối chứng có một mình tế bào T. PEC được điều khiển bởi CyT49 KO B2M và KO B2M/KI PD-L1 không kích hoạt sự tăng sinh tế bào T ở trên đối chứng chỉ có tế bào T thể hiện bản chất gây miễn dịch thấp của tế bào đã được biên tập.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước cải biến di truyền tế bào *in vitro* bằng cách:

(i) đưa xóa bỏ và/hoặc cài xen ít nhất là một cặp bazơ vào hệ gen của tế bào tại vị trí trong locut gen beta-2-microglobulin (B2M); và

(ii) đưa vào hệ gen của tế bào phần cài xen polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp vào locut gen B2M trong khoảng 50 cặp bazơ so với vị trí theo (i), trong đó yếu tố dung nạp là phối tử chết theo chương trình 1 (PD-L1);

trong đó việc cải biến di truyền bao gồm việc phân phối ít nhất là một hệ endonucleaza được dẫn bởi ARN, trong đó hệ endonucleaza được dẫn bởi ARN là hệ CRISPR chứa CRISPR nucleaza và ARN dẫn, hệ này hướng đích đến vị trí trong locut gen B2M, và polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp được bọc sườn bằng (a) trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 13 có tính đồng nhất về trình tự với vùng nằm ở phía bên trái của vị trí theo (i) và (b) trình tự nucleotit thể hiện ở SEQ ID NO: 19 có tính đồng nhất về trình tự với vùng nằm phía bên phải của vị trí theo (i), trong đó locut của gen B2M bị phân cắt ở vị trí đích và polynucleotit mã hóa PD-L1 được cài xen vào locut gen B2M trong khoảng 50 cặp bazơ so với vị trí theo (i), nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng, và trong đó tế bào cho vạn năng là tế bào gốc đa năng (PSC), tế bào gốc của phôi (ESC), và tế bào gốc trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào tiền thân và gốc tạo huyết (HSPC).

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào cho vạn năng làm tăng khả năng tránh miễn dịch và/hoặc mức sống sót của tế bào so với tế bào không được cải biến.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vị trí đã được hướng đích đến bởi ARN dẫn chứa trình tự axit nucleic của ít nhất là một trong số các SEQ ID NO: 1 đến 3.

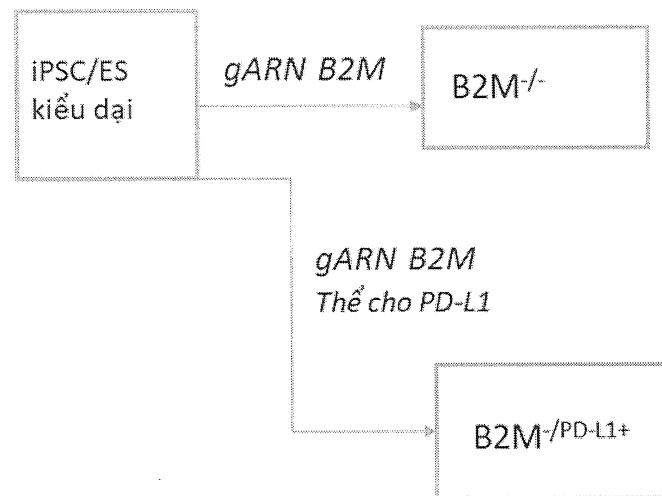
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 3, trong đó vị trí được hướng đích đến bởi ARN dẫn chứa trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 2.

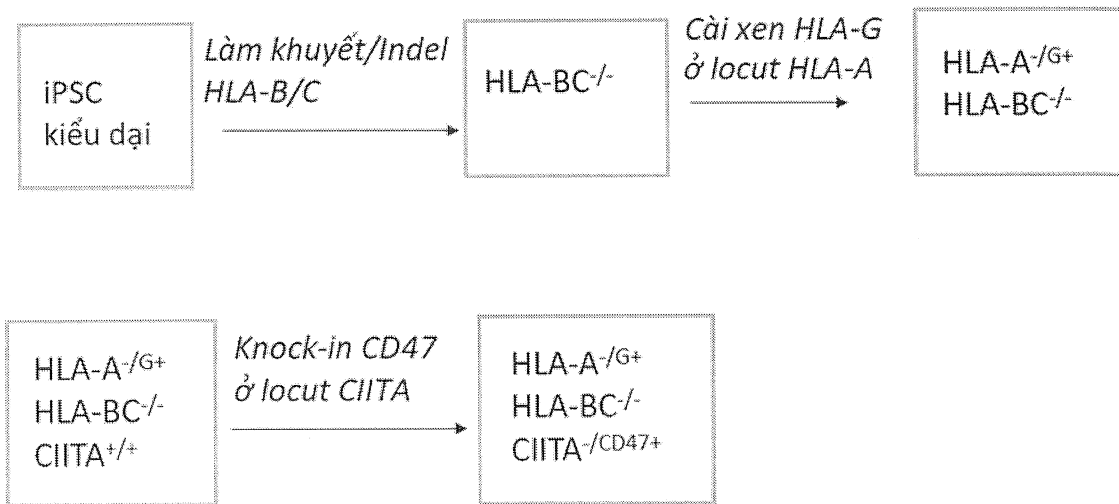
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp được liên kết khi hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, đặc hiệu mô, hoặc đặc hiệu kiểu tế bào, trong đó tùy ý gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 6, trong đó polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp chứa vector, trong đó tùy ý vector là vector plasmid.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó vector plasmit gồm trình tự axit nucleic được thể hiện ở SEQ ID NO: 33.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 8, trong đó CRISPR nucleaza là Cas9 nucleaza, chất tương đồng của nó, phiên bản cải biến của nó, phiên bản đã được tối ưu hóa codon của nó, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó tùy ý Cas9 nucleaza là Cas9 của *S. pyogenes*.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó CRISPR nucleaza chứa tín hiệu định vị nhân (nuclear localization signal - NLS) đầu tận cùng N và/hoặc NLS đầu tận cùng C.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó CRISPR nucleaza và ARN dẫn có mặt theo tỉ lệ khối lượng bằng 1:1.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó CRISPR nucleaza được tạo phức sơ bộ với một hoặc nhiều ARN dẫn như phần tử ribonucleoprotein (RNP).
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó tế bào cho vận năng là tế bào của động vật có vú, trong đó tùy ý tế bào này là tế bào của người.
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó tế bào cho vận năng có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng hoặc tế bào sinh dưỡng đã được biệt hóa hoàn toàn; trong đó tùy ý tế bào tiền thân bị giới hạn theo dòng là tế bào tiền thân nội bì tụy, tế bào tiền thân nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, tế bào non, hoặc tế bào tiền thân thần kinh; trong đó còn tùy ý tế bào sinh dưỡng đã được biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết chẳng hạn như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào của hệ miễn dịch.

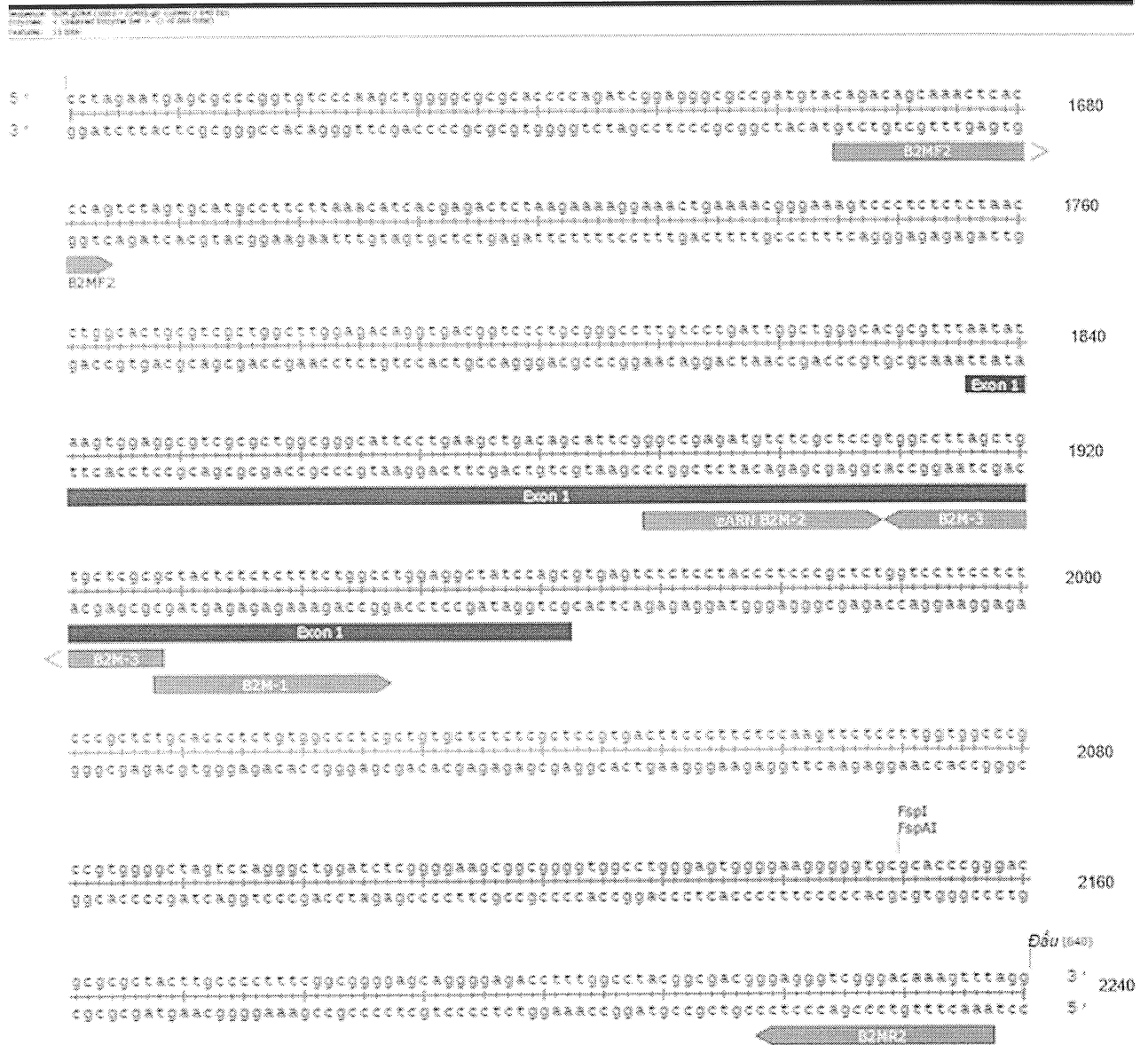
	Tế bào neuron	Tế bào tuyến tụy	Các dòng khác
Các ví dụ về đích	<i>Knock-out B2M</i> <i>Knock-in thể dung hợp B2M/HLA-G</i>	<i>Knock-out B2M</i> <i>Knock-out CIITA</i> <i>Knock-in PD-L1</i> <i>Knock-in CTLA4-Ig</i>	<i>Knock-out HLA-ABC</i> <i>Knock-in HLA-G</i> <i>Knock-out CIITA</i> <i>Knock-in CD47</i>
Các đích/vùng khởi động khác	<i>Các gen quyết định sự sống sót tế bào</i> <i>Các công tắc tự sát: HSV-tk, iCaspaza9</i> <i>Các vùng khởi động: vùng khởi động cơ định, vùng khởi động đặc hiệu tế bào, vùng khởi động nội sinh</i>		

HÌNH 1A

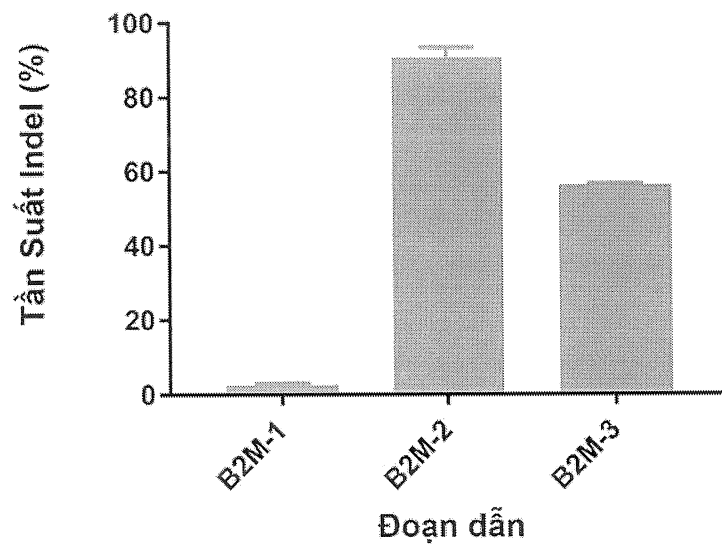
**HÌNH 1B**



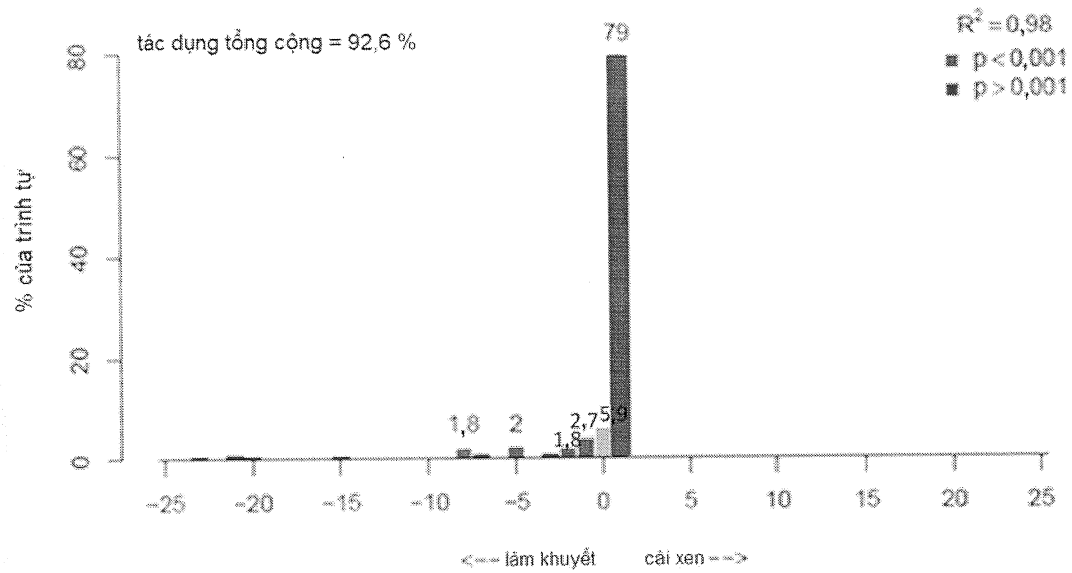
HÌNH 1C



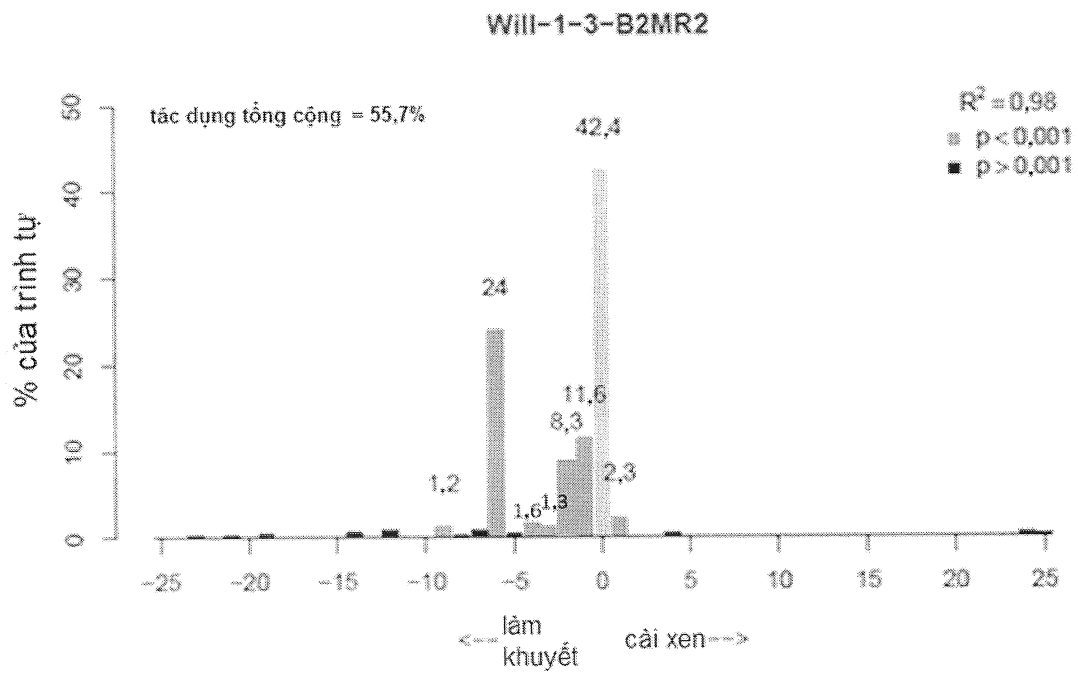
HÌNH 2



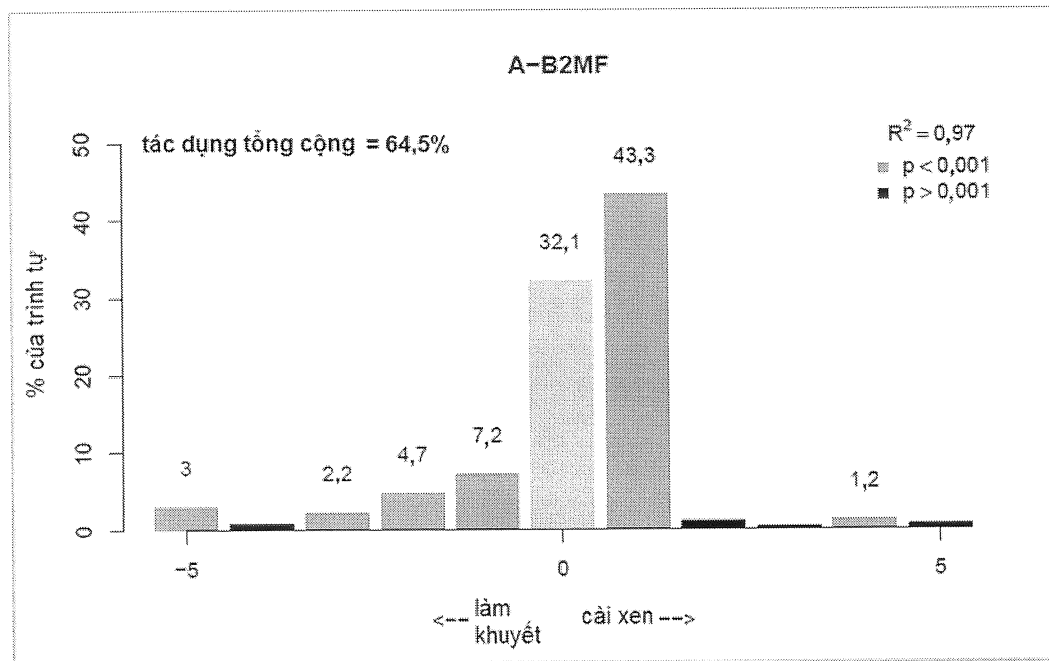
HÌNH 3A



HÌNH 3B

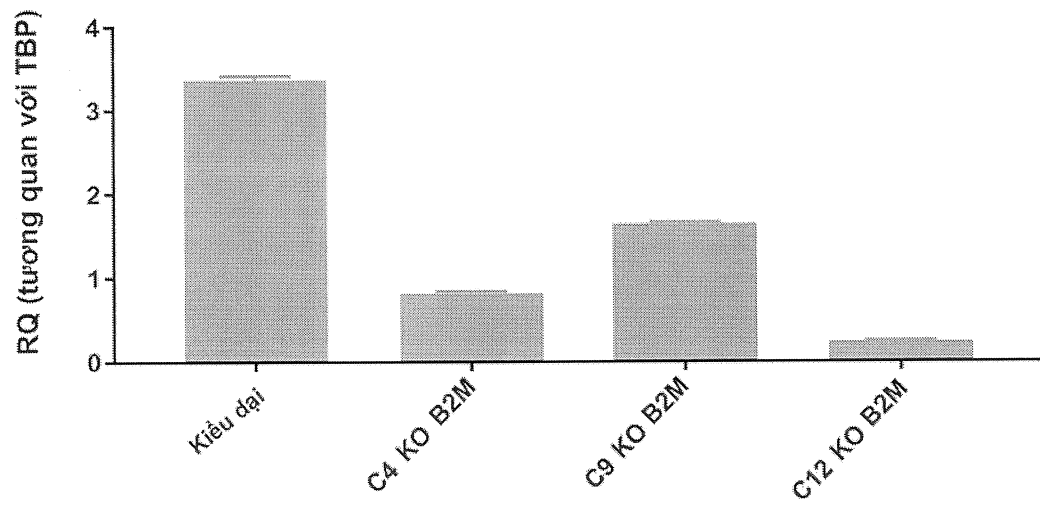


HÌNH 3C

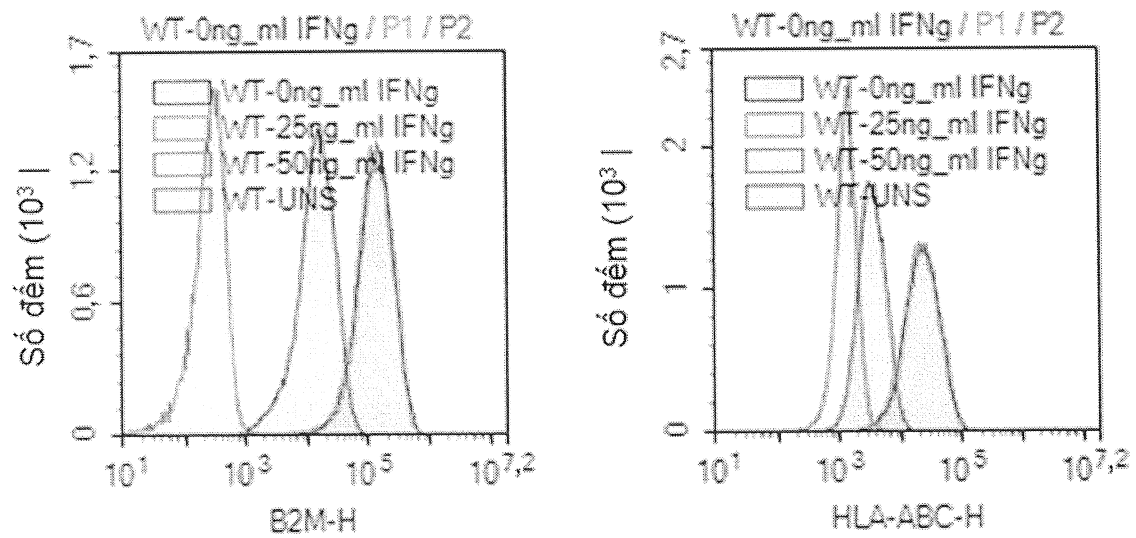
**HÌNH 4A**

Đồng Hợp tử KO B2M		Đi Hợp Tử KO B2M	
Dòng	Biên dạng	Dòng	Biên dạng
A9	+2/+2	A5	+1/-28
A11	+1/+1	B2	-1/-21
B10	-36/-36	B4	+1/-23
B12	+1/+1	B8	-4/-5
C5	-23/-23	B9	+1/+14
C9	-1/-1	C2	+1/-5
C11	+1/+1	C4	+1/-1
C12	+1/+1		

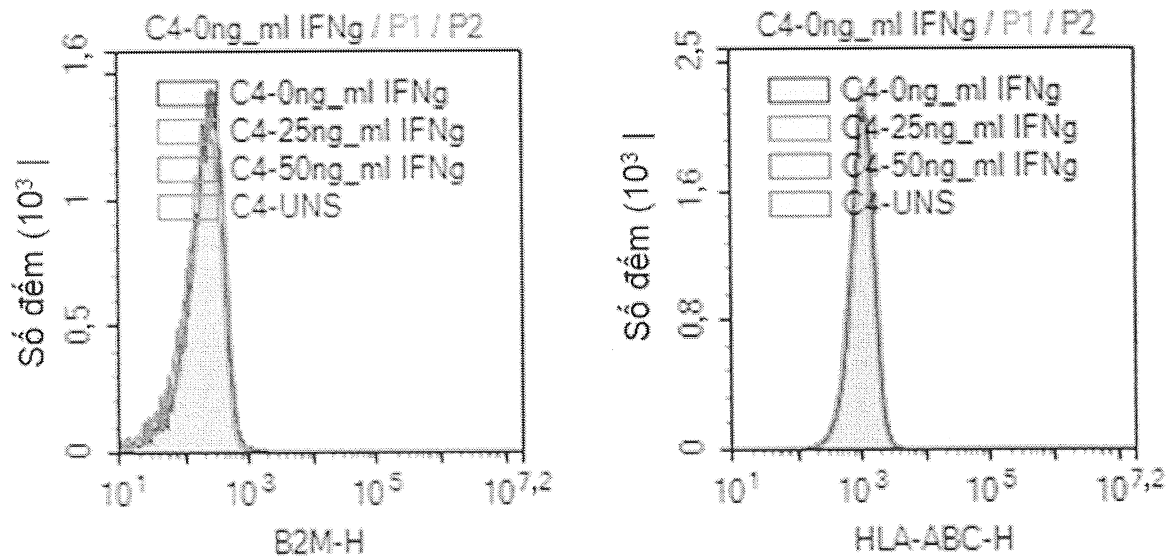
HÌNH 4B



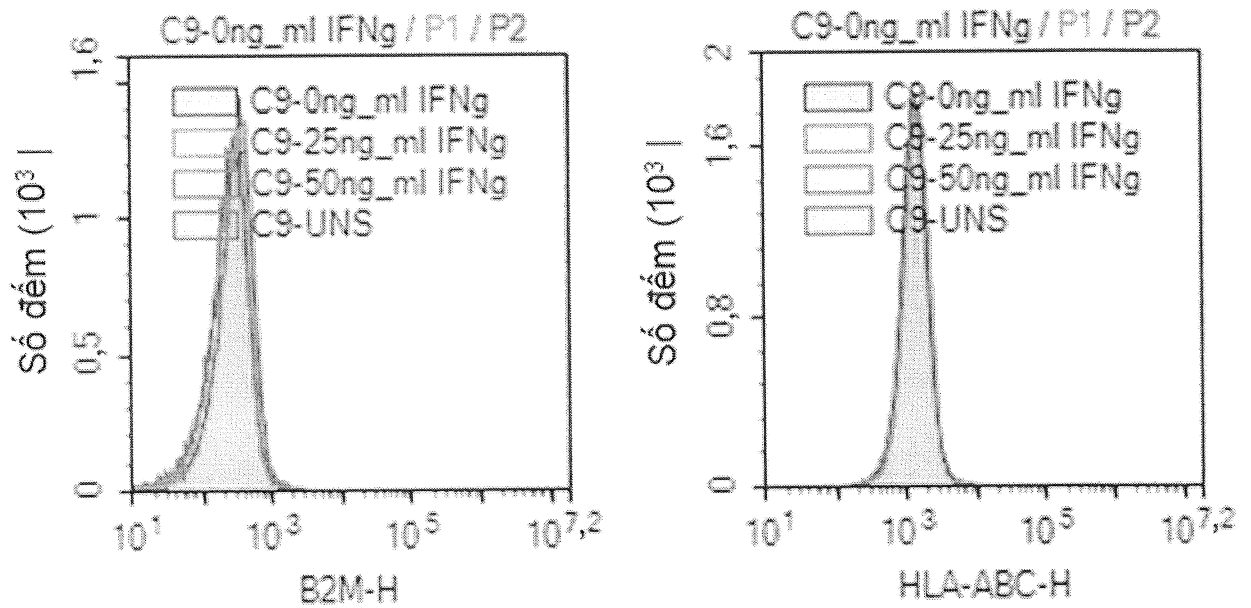
HÌNH 5

Kiểu Đại

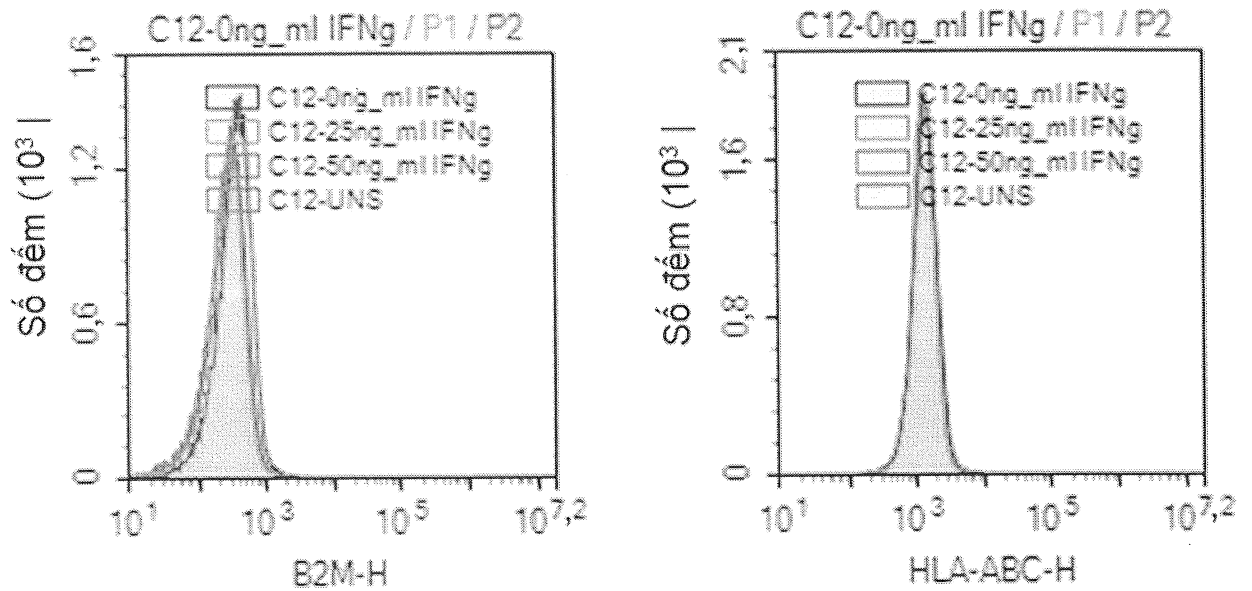
HÌNH 6A

C4 Knock-out B2M**HÌNH 6B**

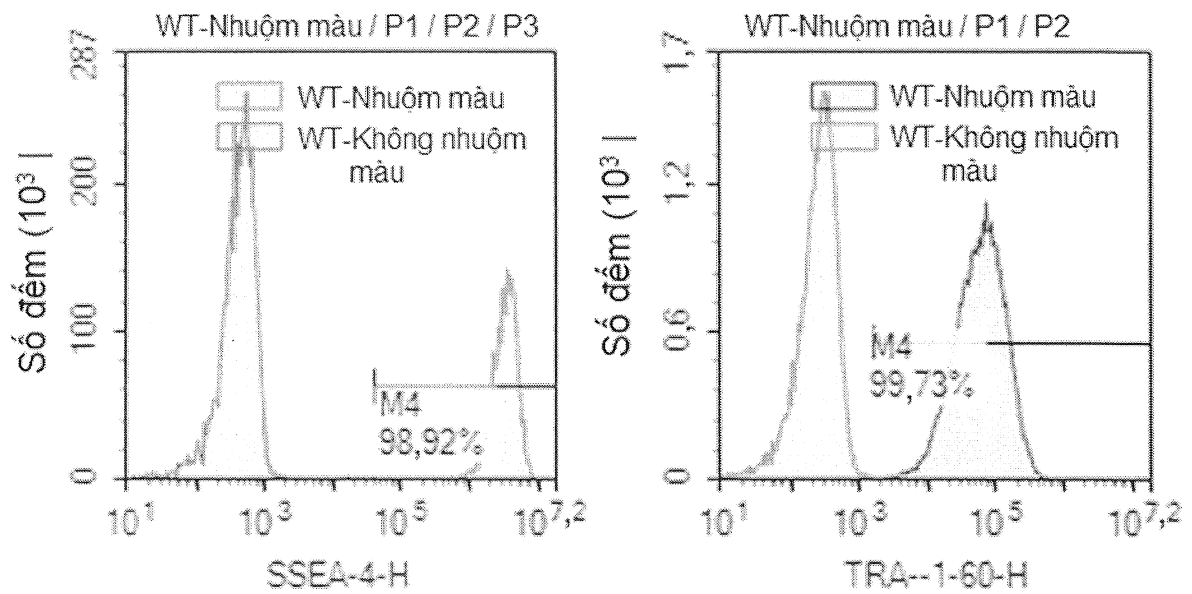
C9 Knock-out B2M



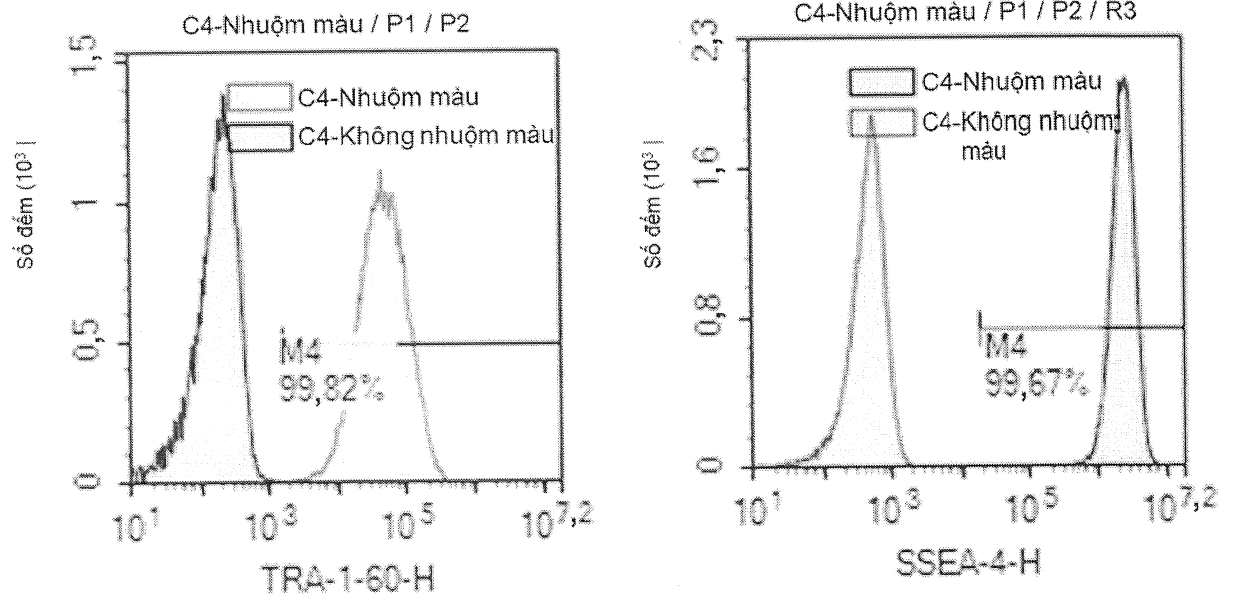
HÌNH 6C

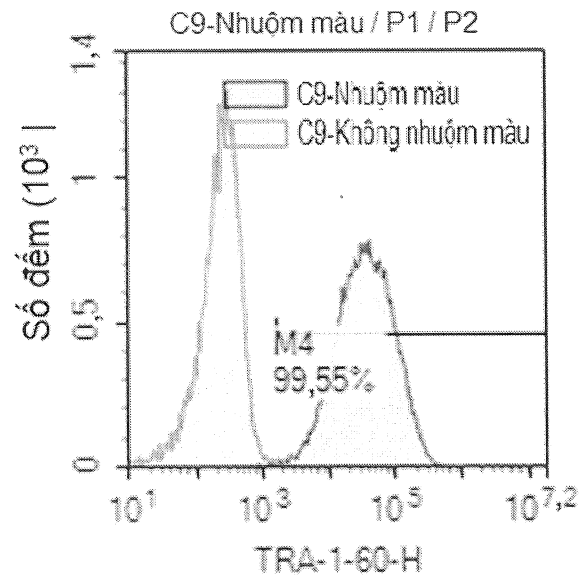
C12 Knock-out B2M**HÌNH 6D**

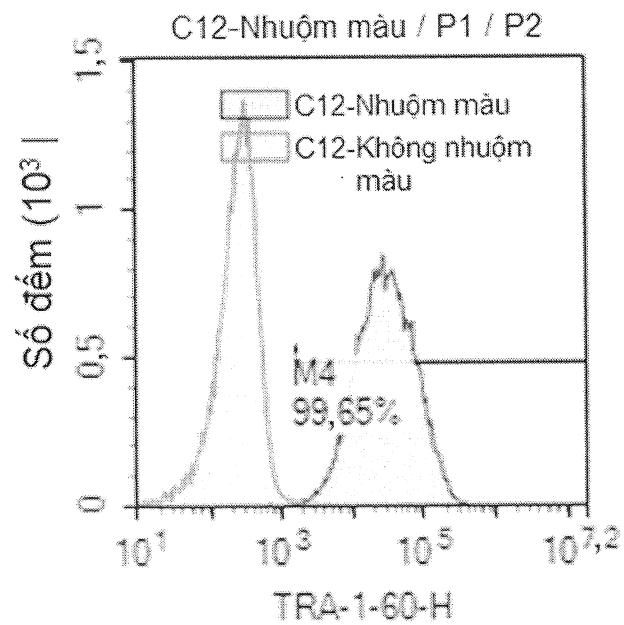
Kiểu Đại

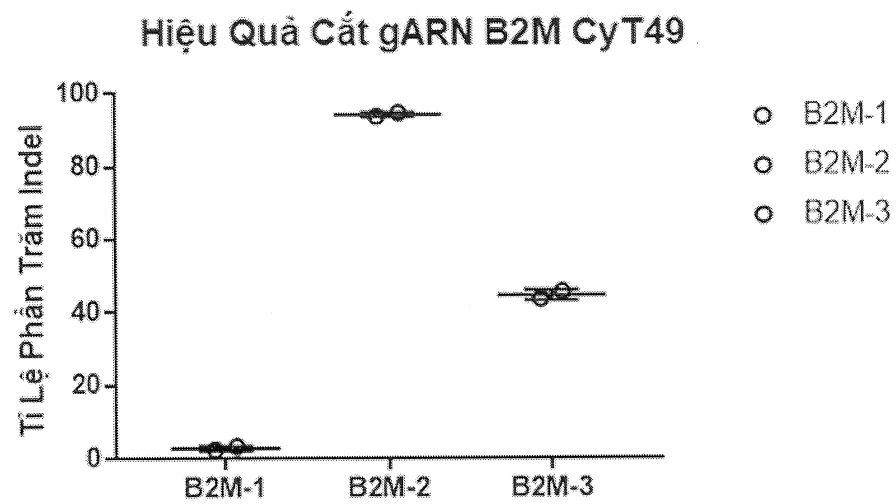


HÌNH 7A

C4 Knock-out B2M**HÌNH 7B**

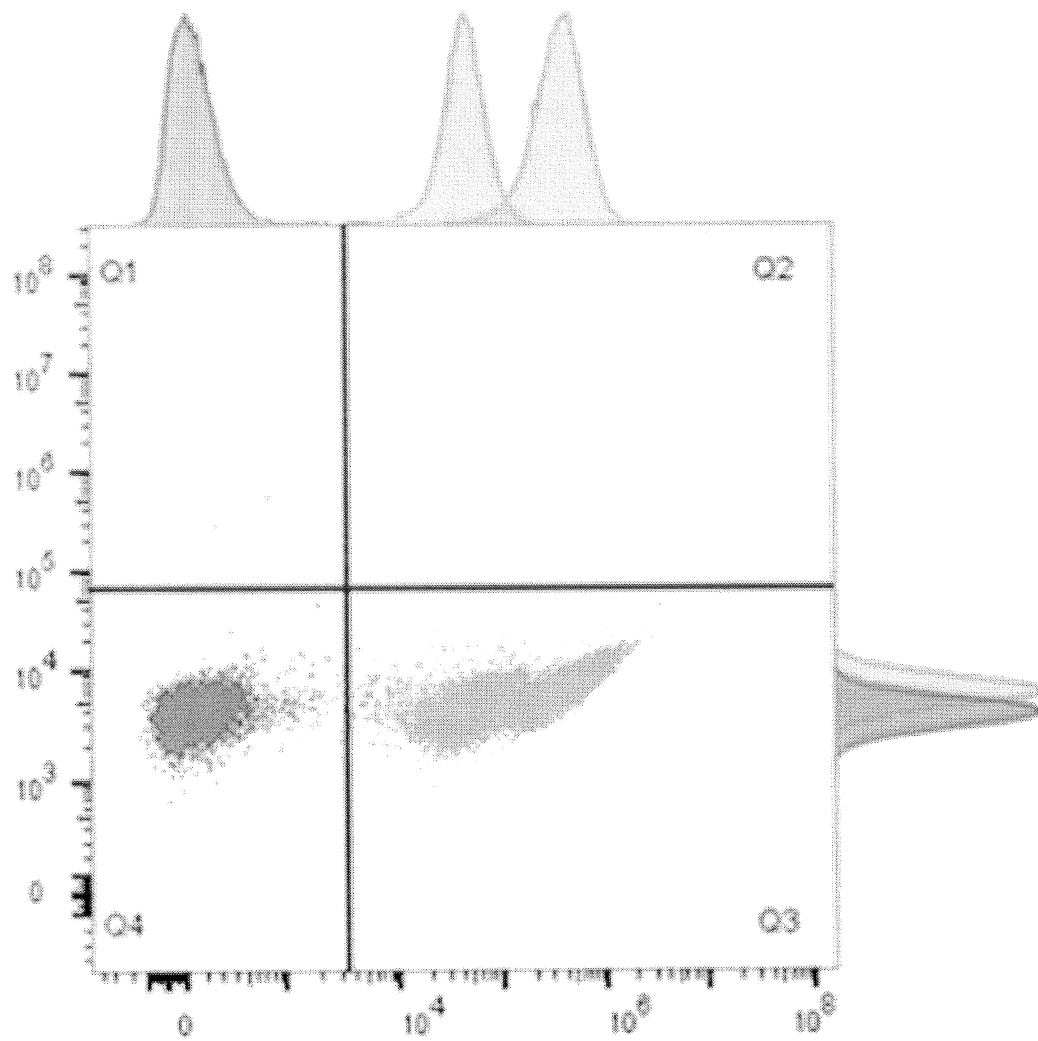
C9 Knock-out B2M**HÌNH 7C**

C12 Knock-out B2M**HÌNH 7D**



HÌNH 8

CYT49 WT BIO-1

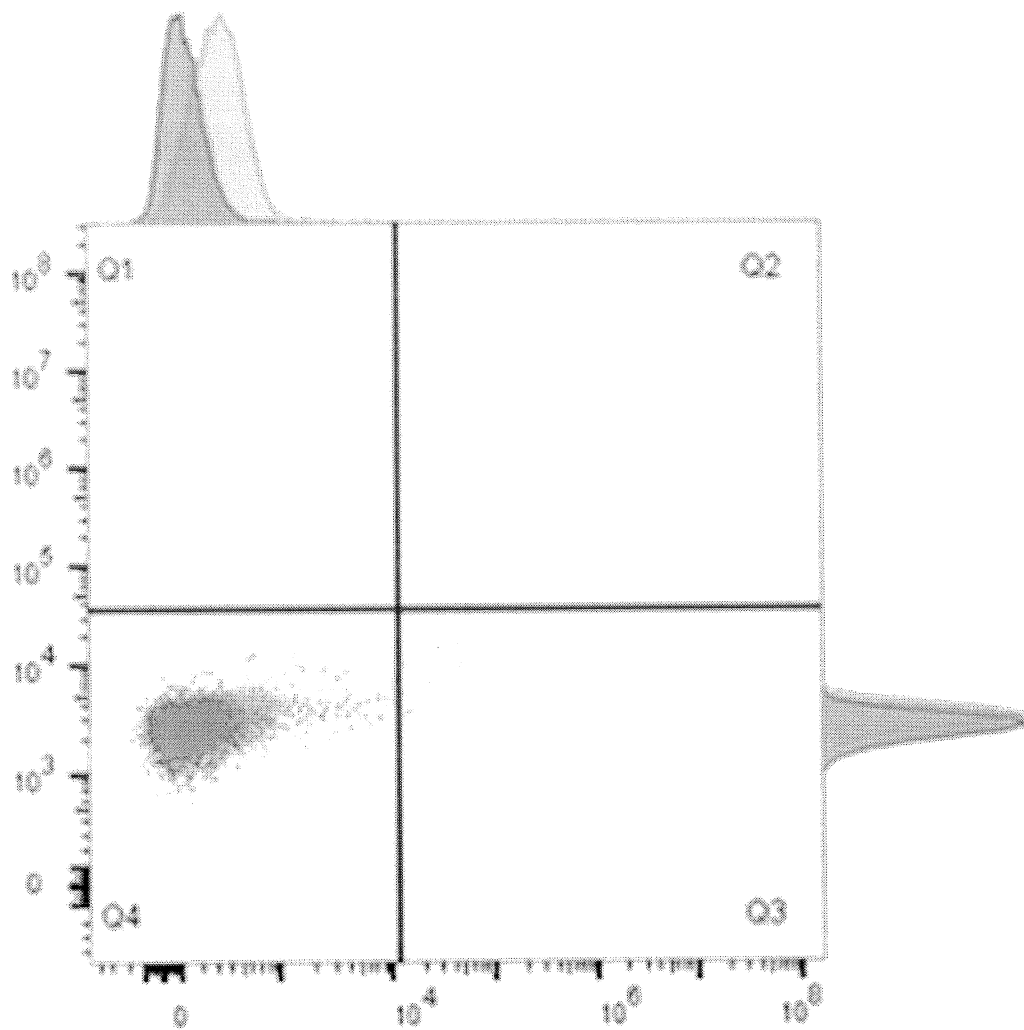


Sự Biểu Hiện B2M

	Chú Thích Vùng Lâm Việc
	Đối chứng IGG
	50ng INTG-1
	NT-1

HÌNH 9A

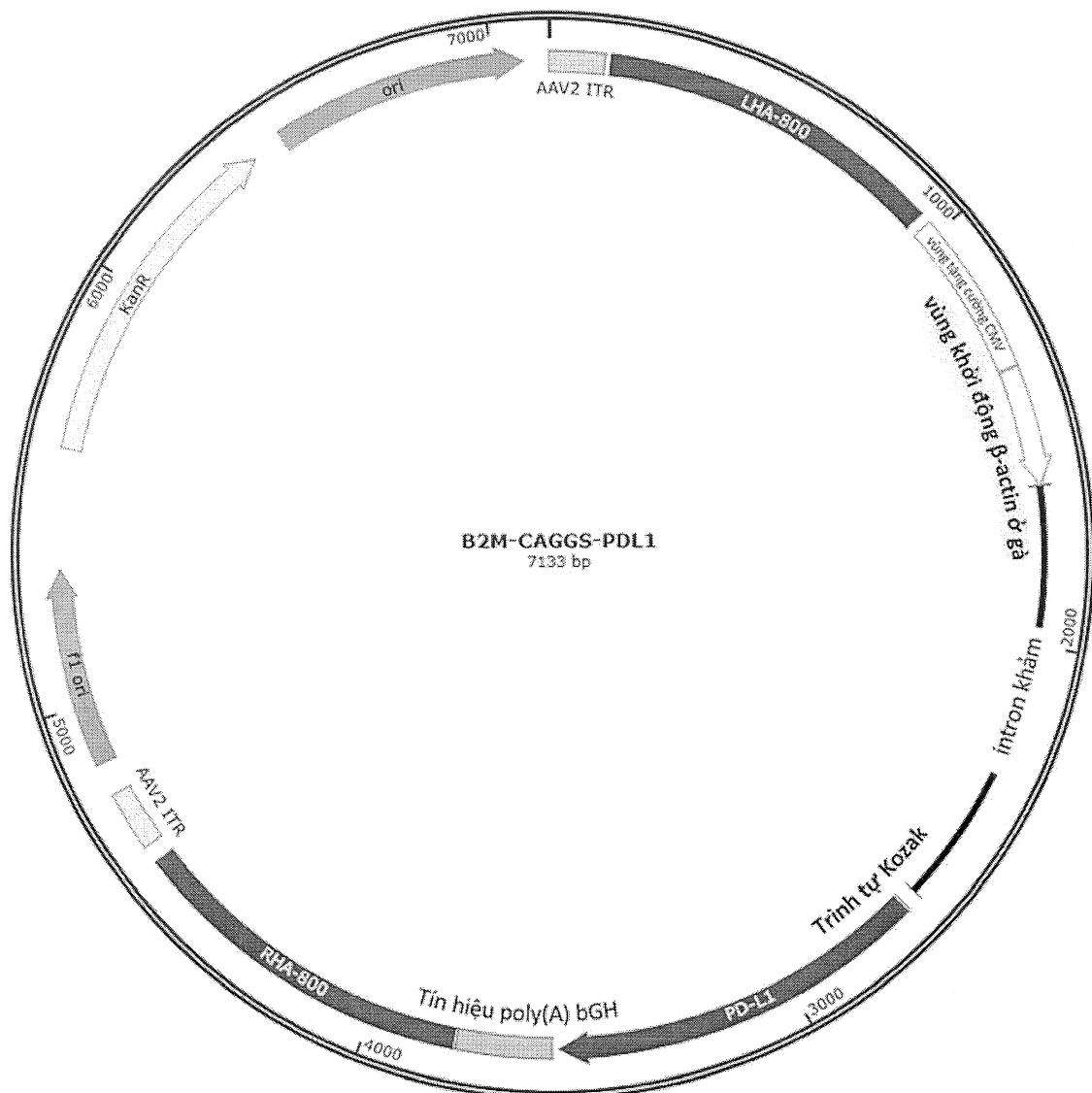
B2M-KO-1 BIO-1

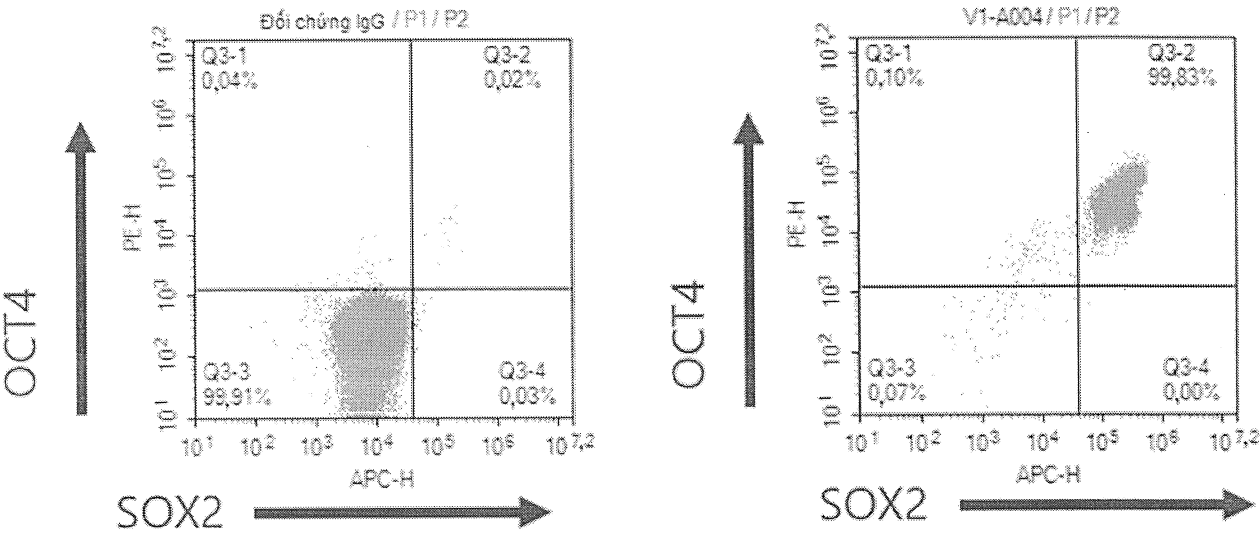


Sự Biểu Hiện B2M

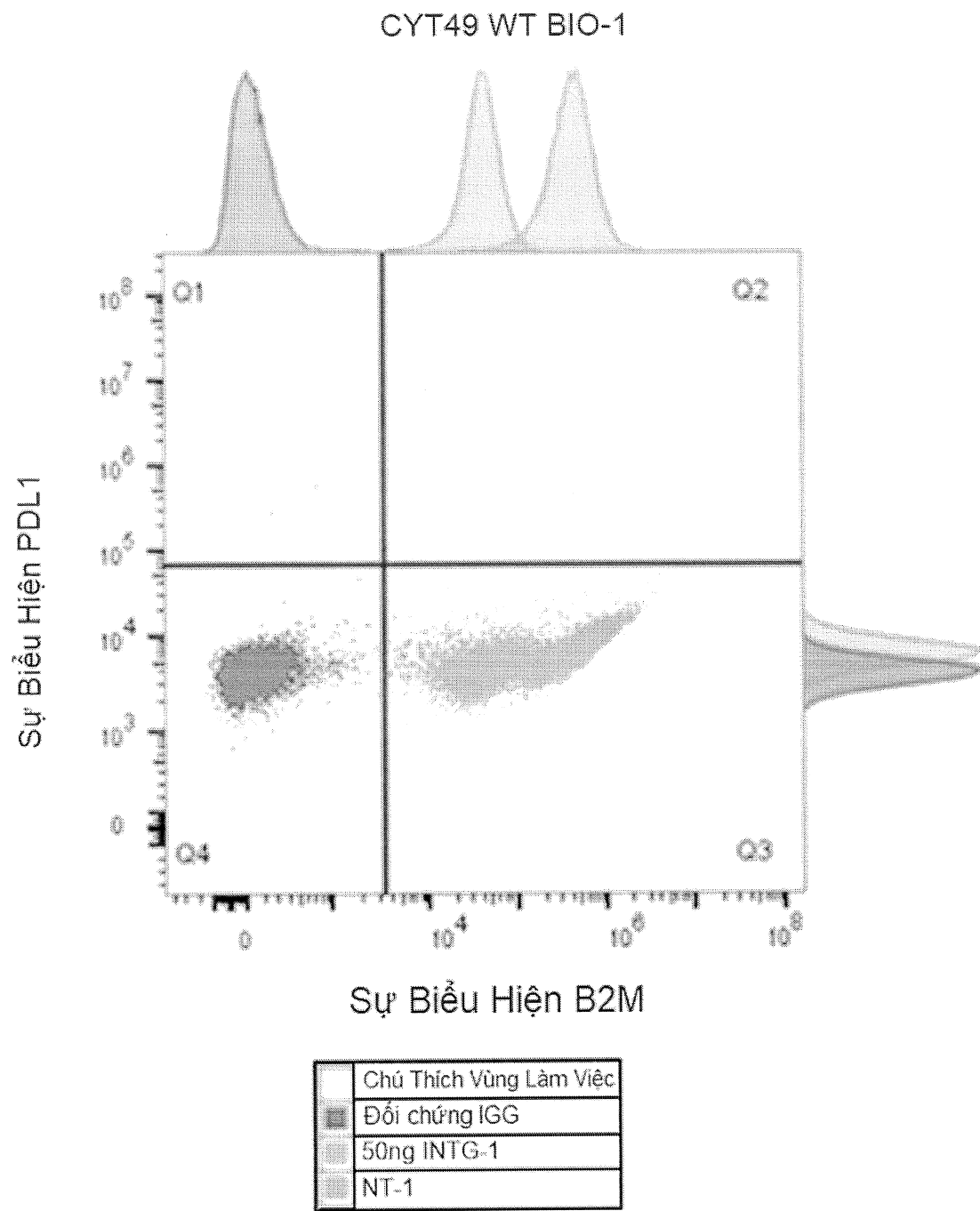
	Chút Thích Vùng Lâm Viéc
	Đối chứng IGG
	50ng INTG-1
	NT-1

HÌNH 9B

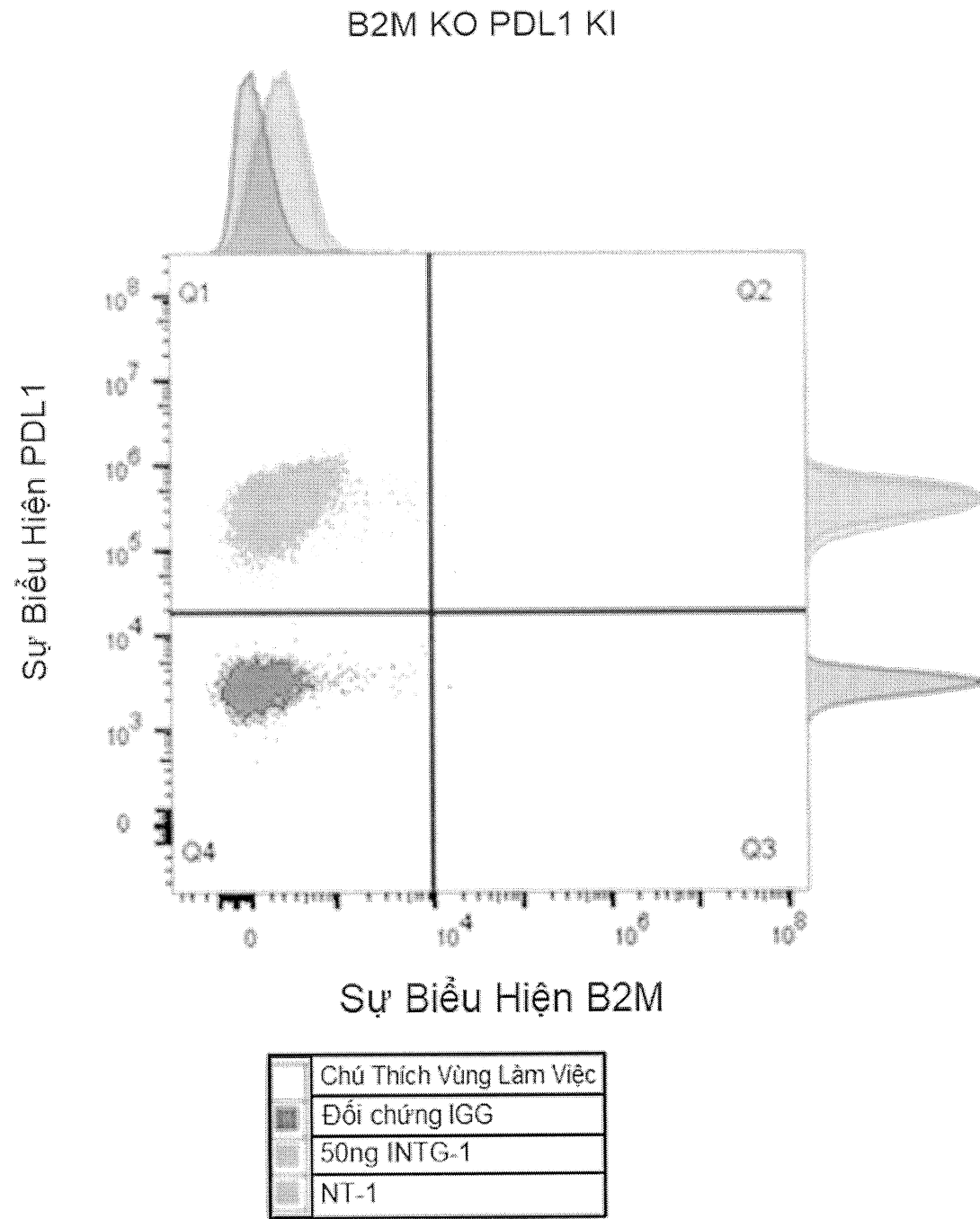
**HÌNH 10**



HÌNH 11



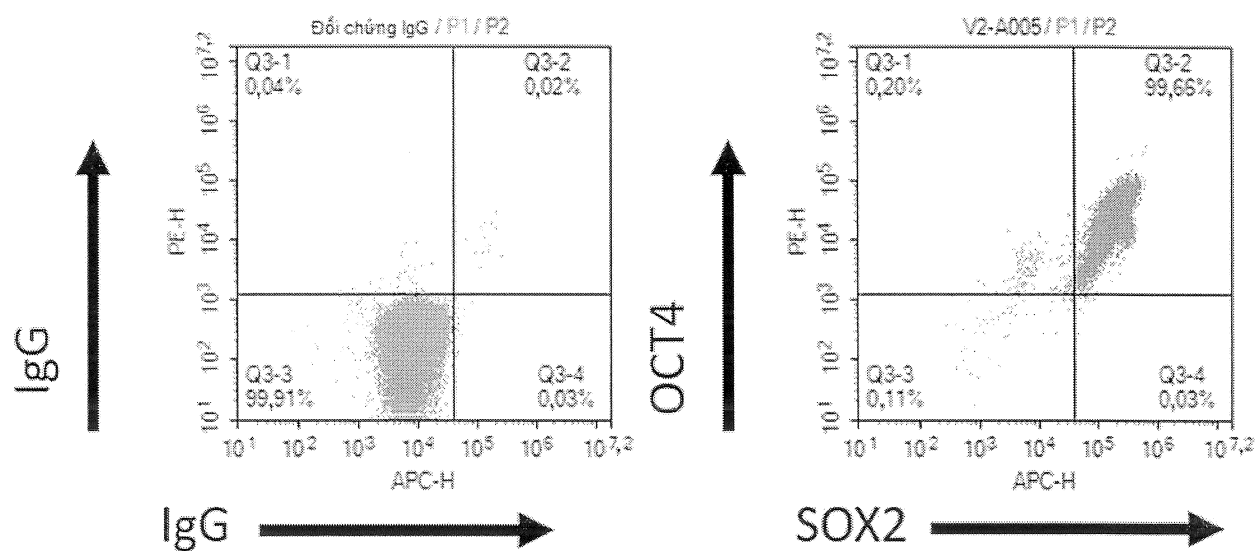
HÌNH 12A

**HÌNH 12B**

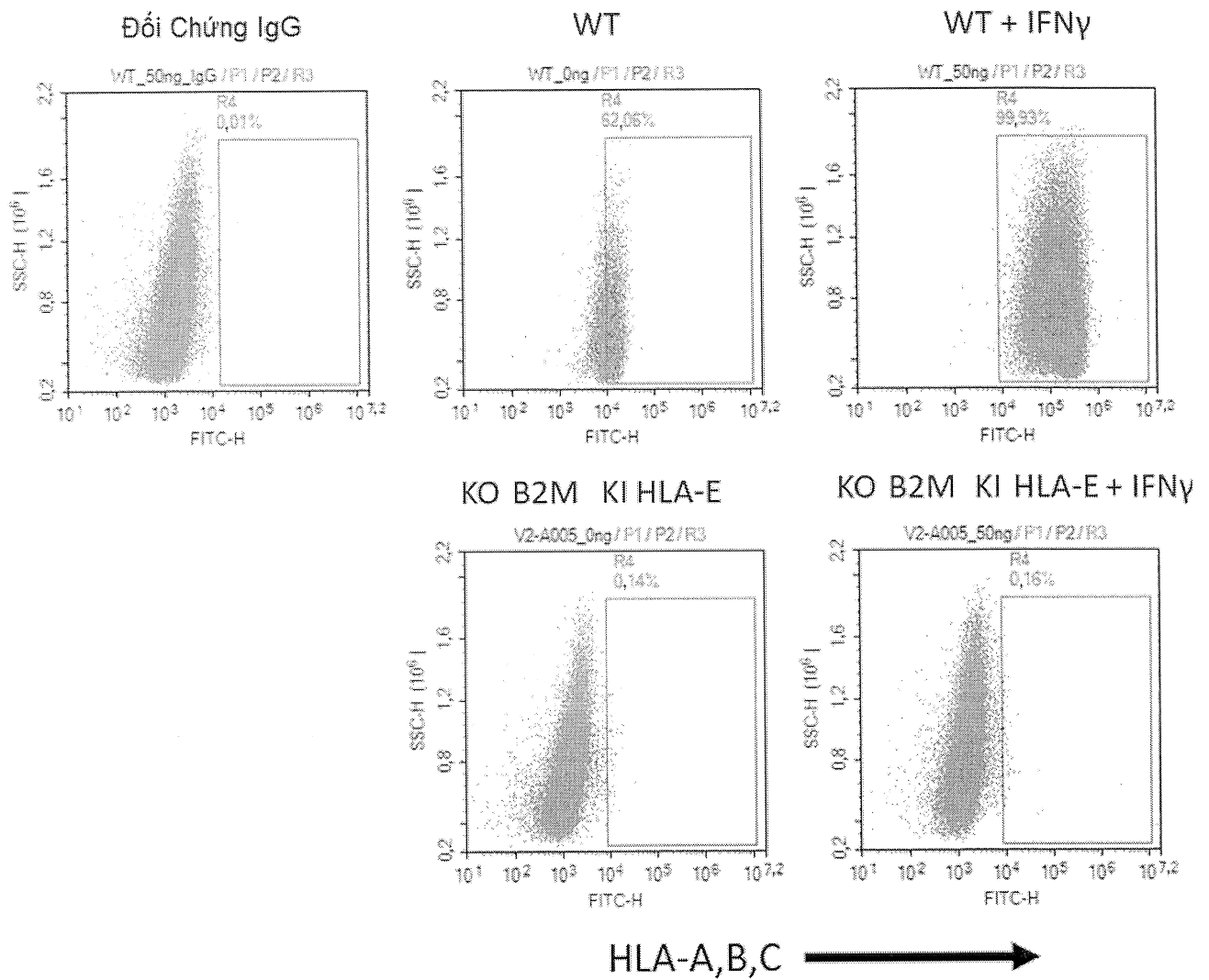
Created with SnapGene®



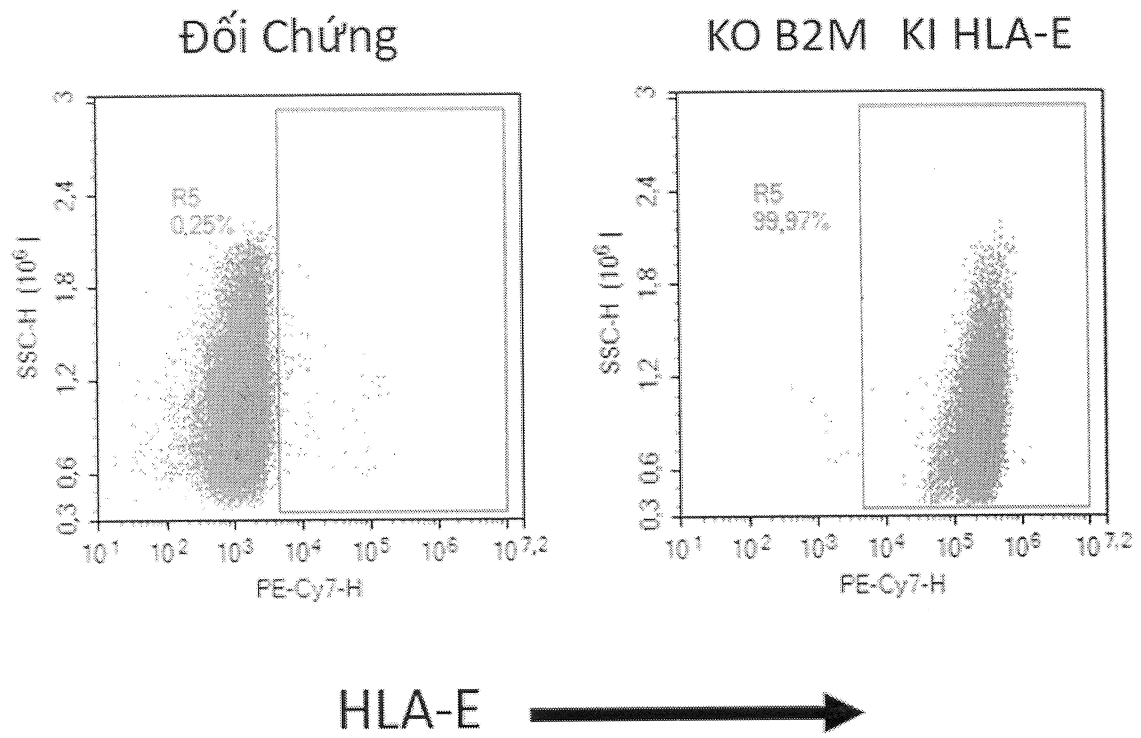
HÌNH 13



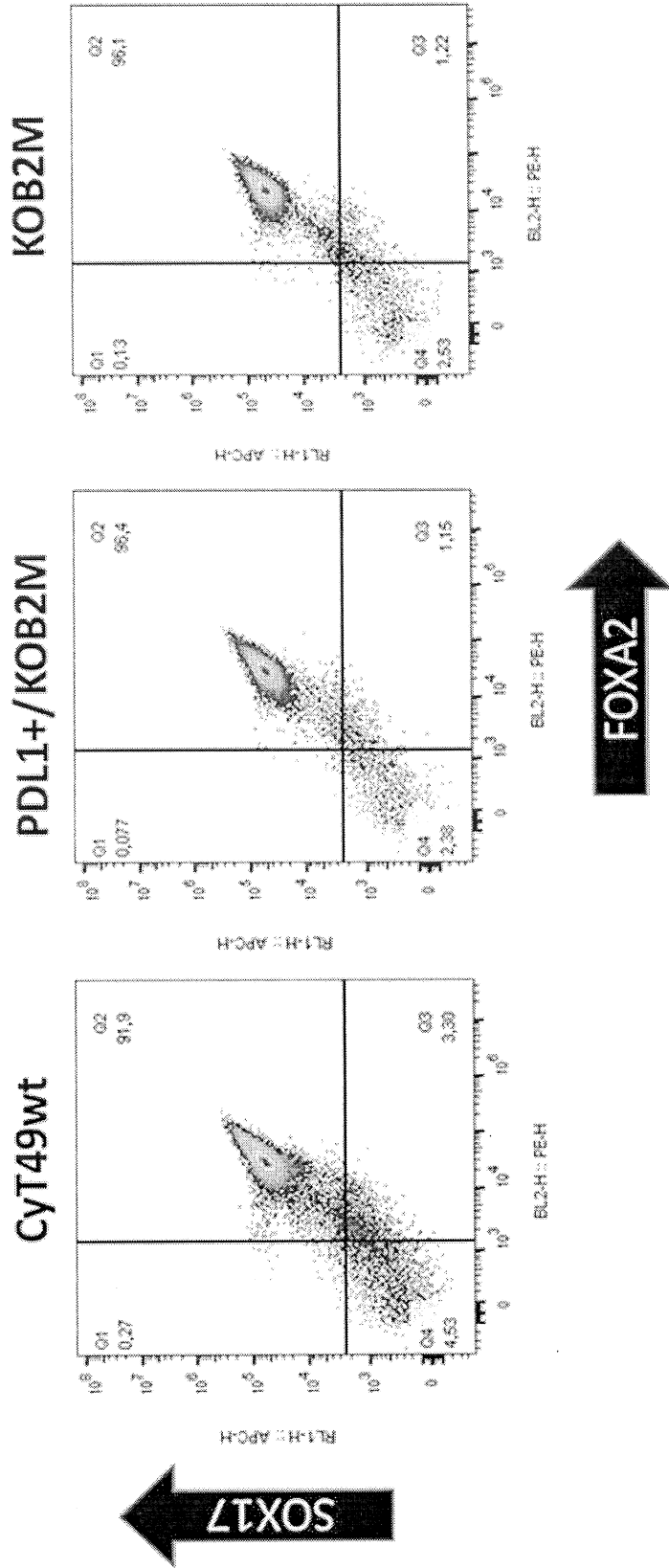
HÌNH 14



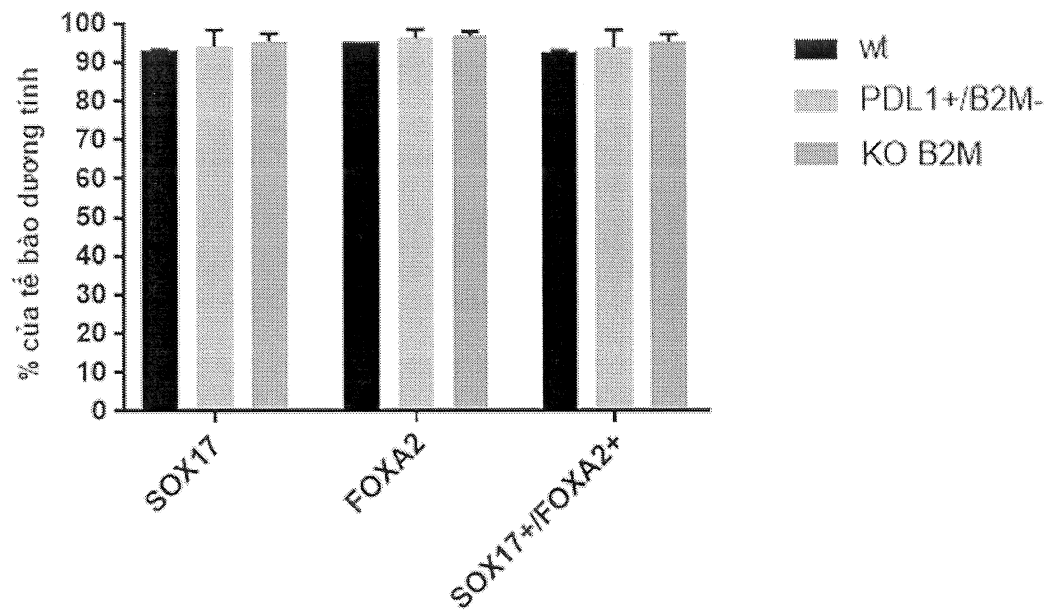
HÌNH 15



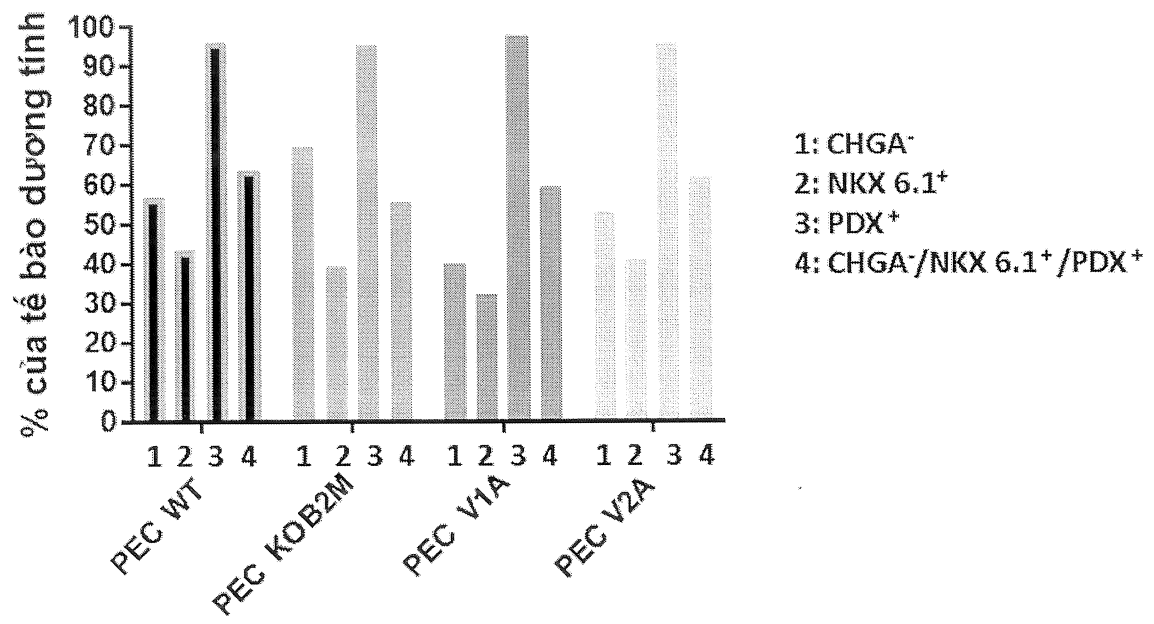
HÌNH 16



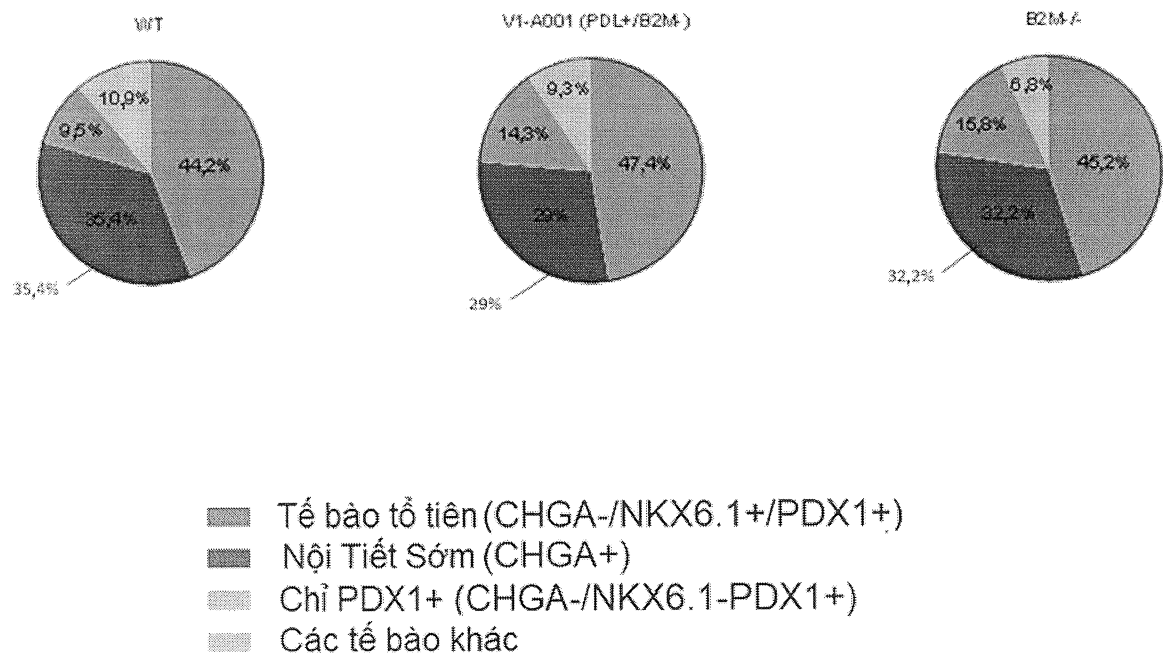
HÌNH 17



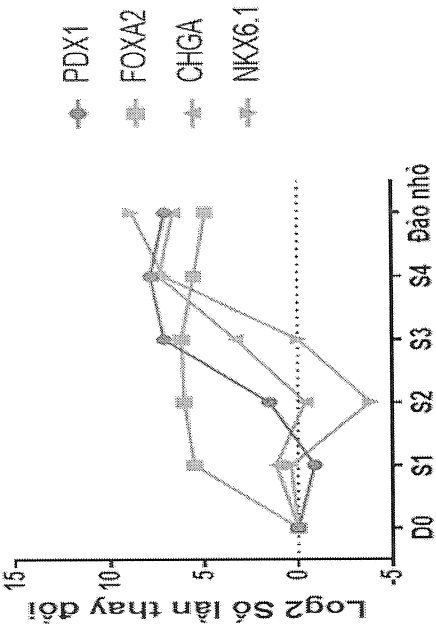
HÌNH 18



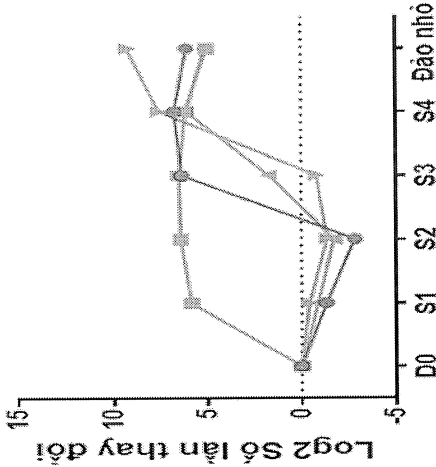
HÌNH 19

**HÌNH 20**

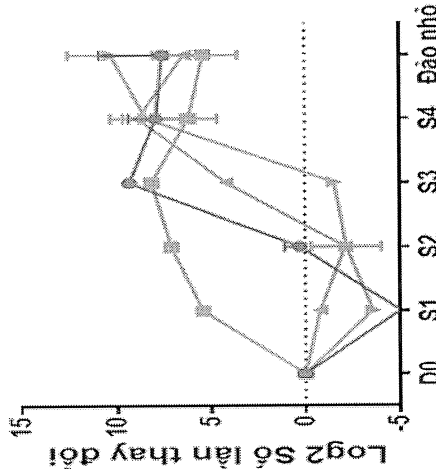
B2M-/-



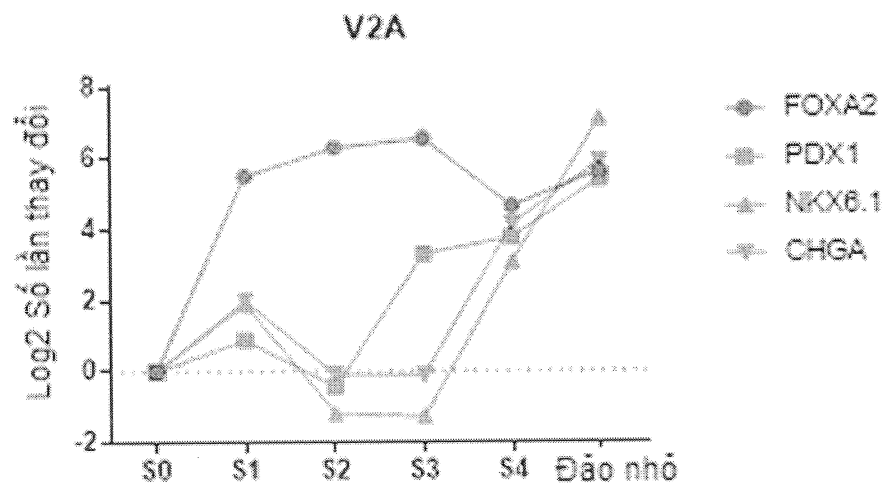
B2M-/PDL1+

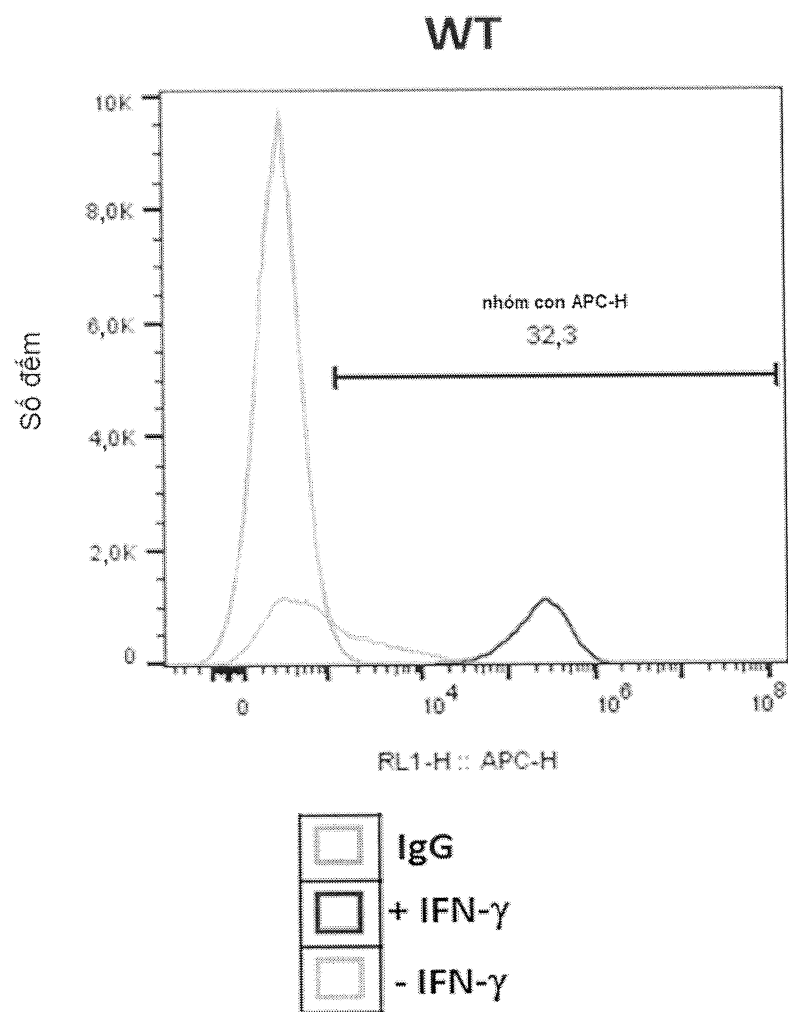


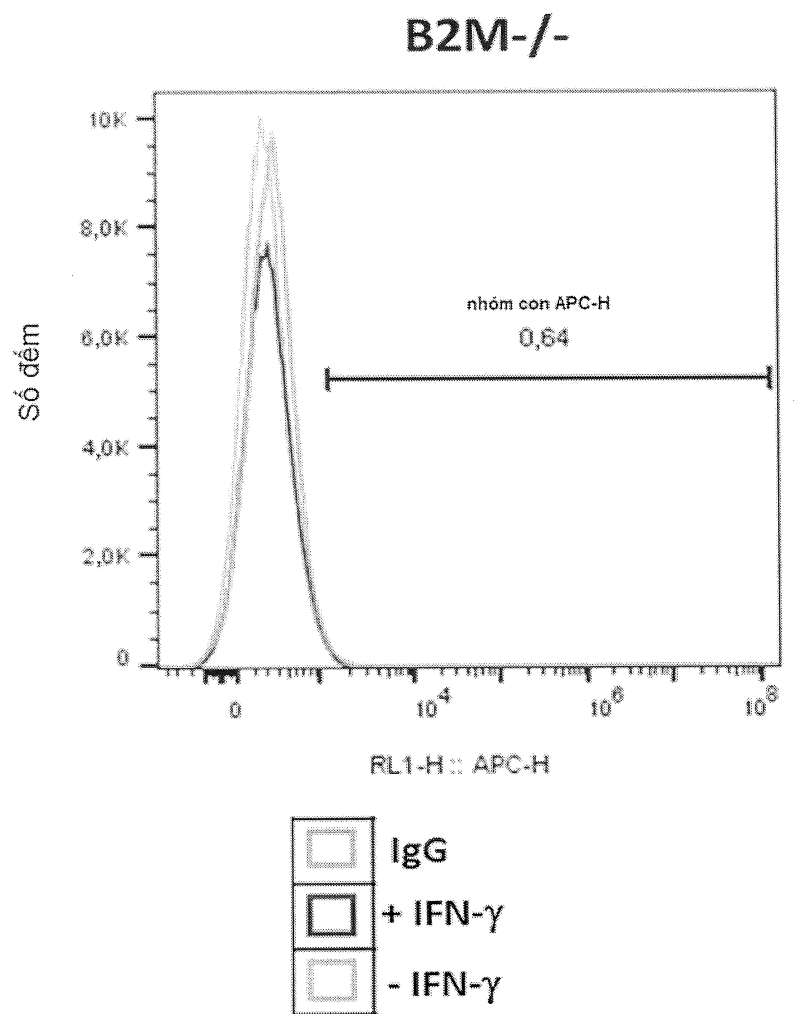
WT

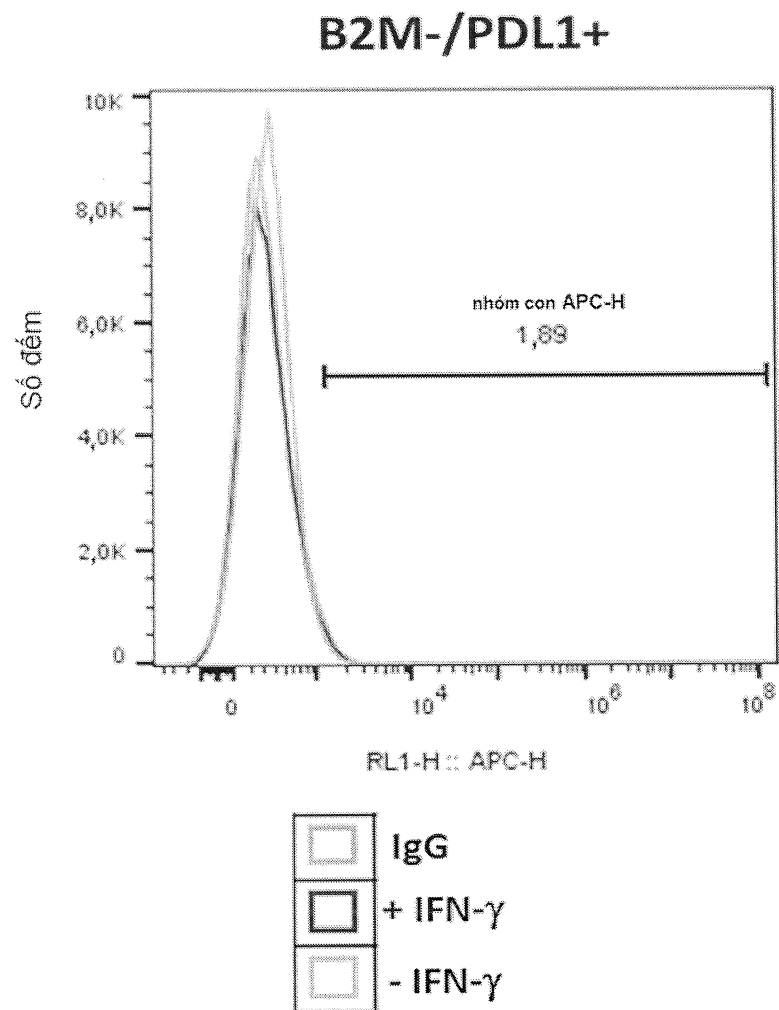


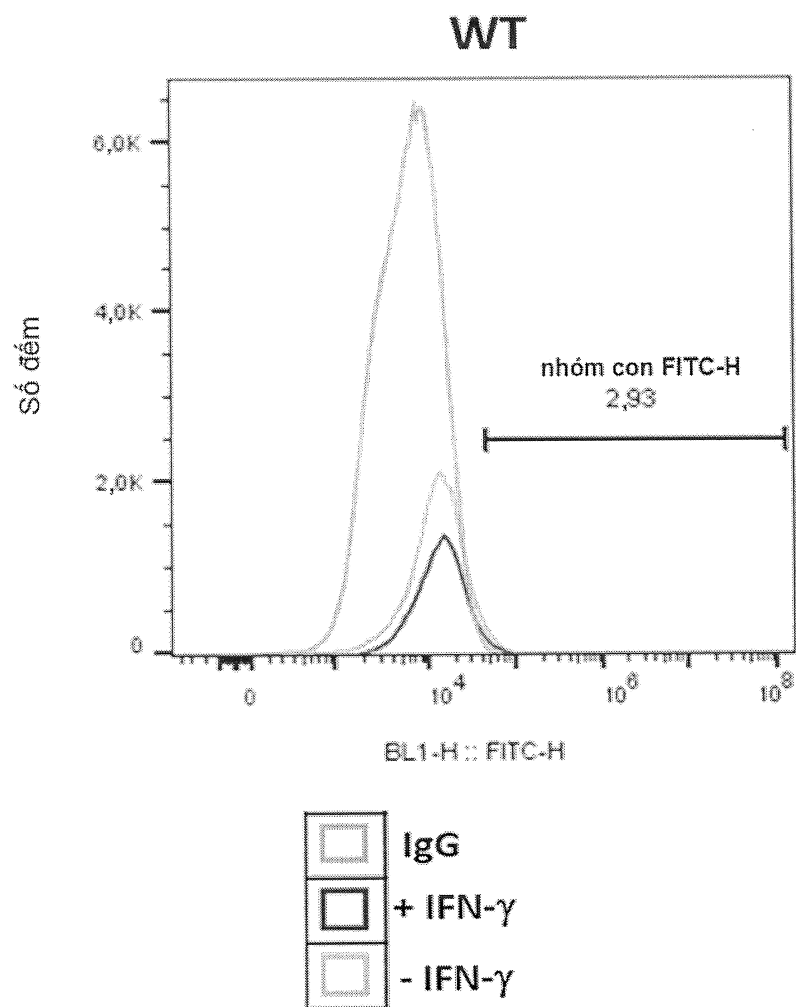
HÌNH 21A

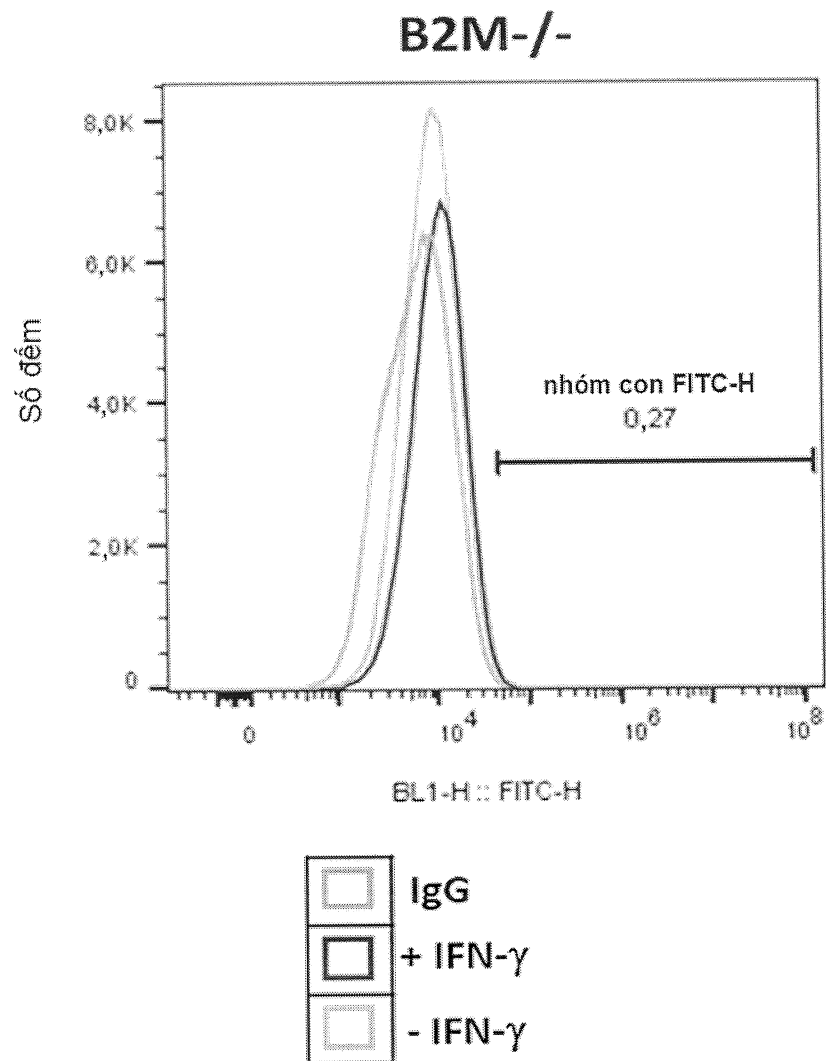
**HÌNH 21B**

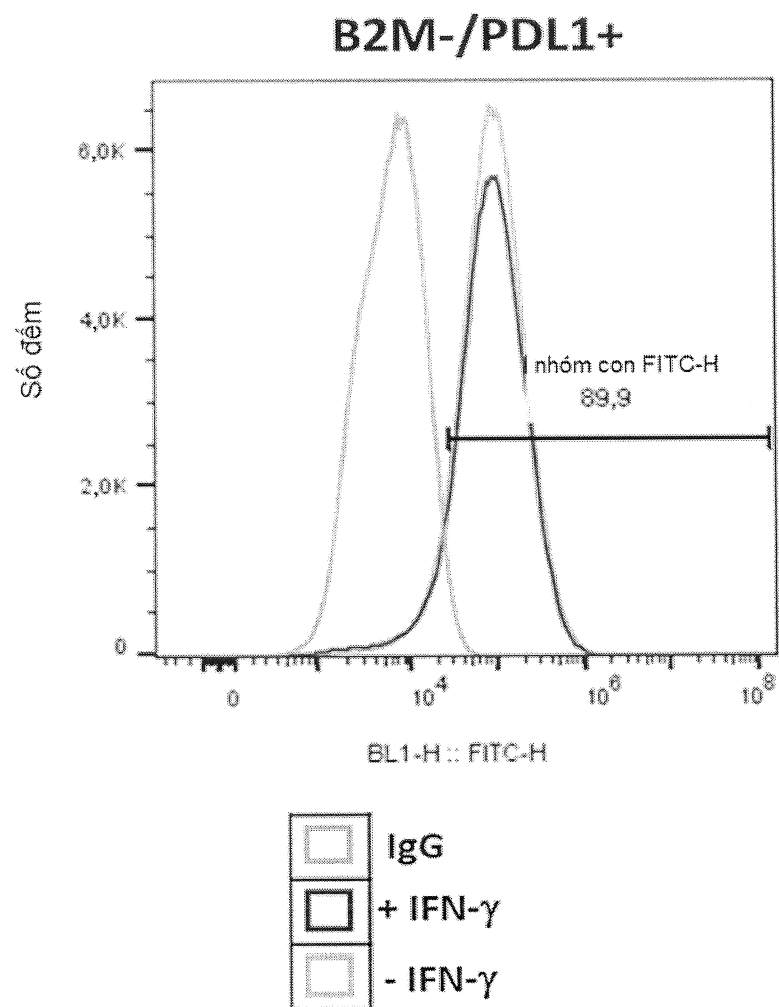
**HÌNH 22A**

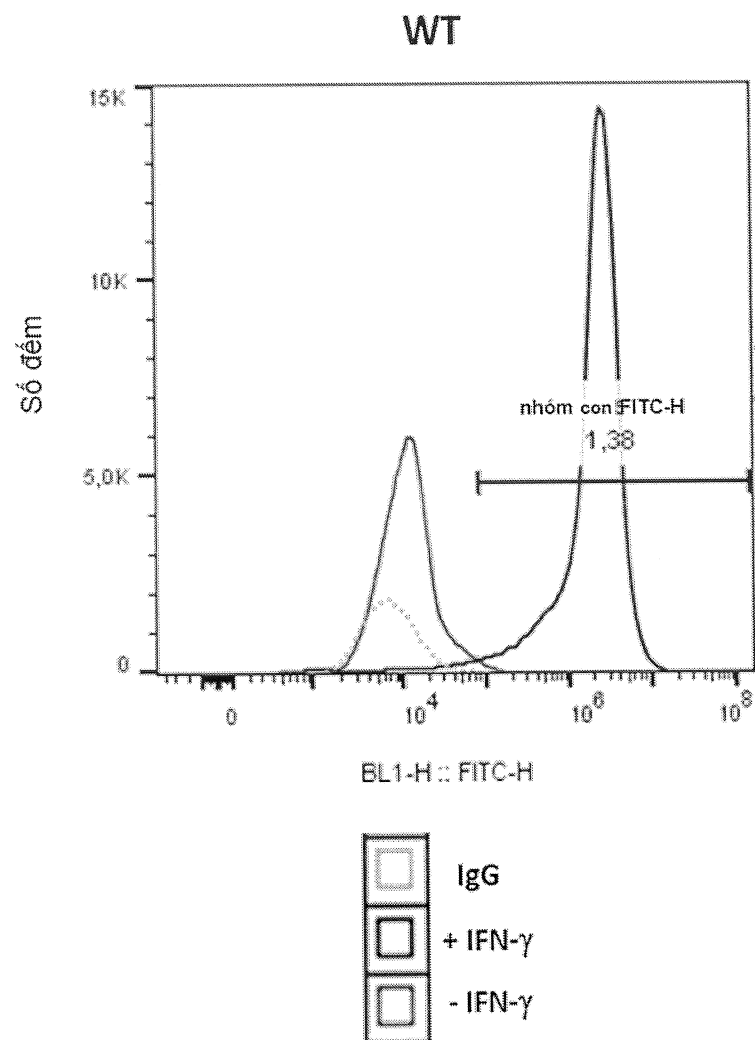
**HÌNH 22B**

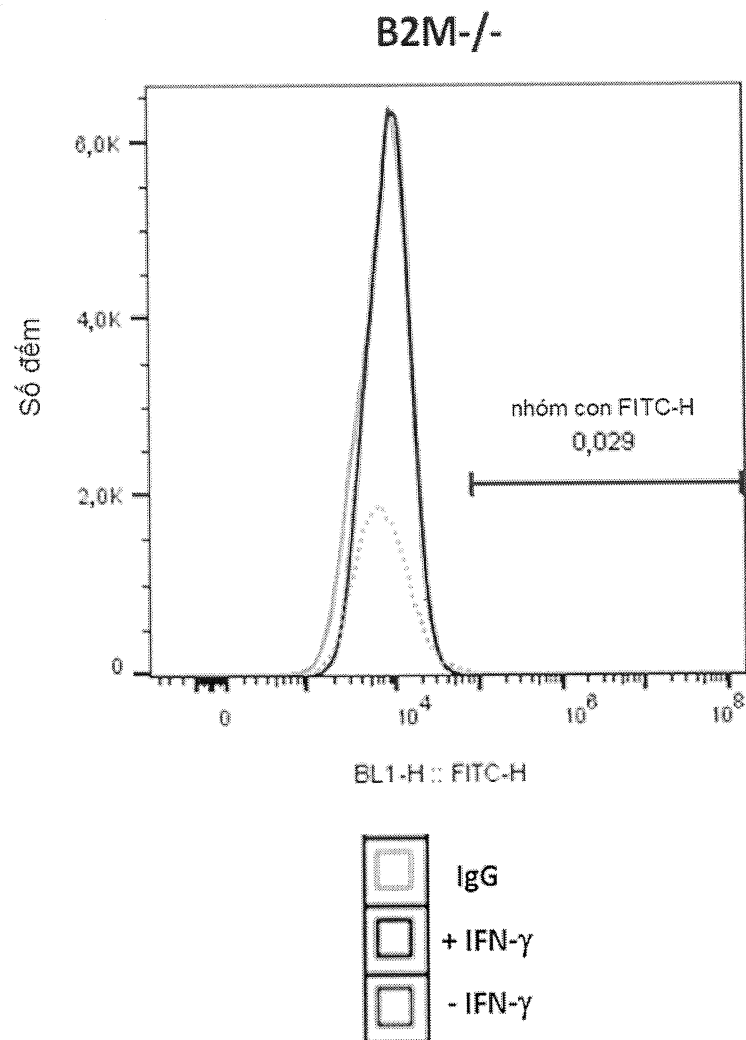
**HÌNH 22C**

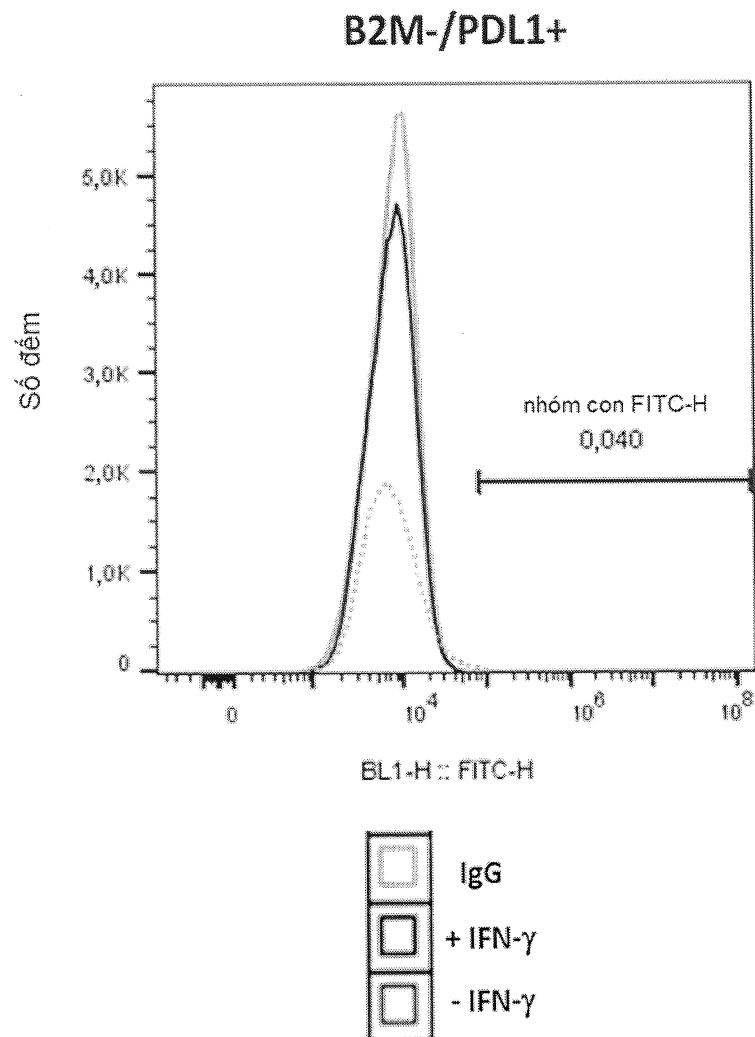
**HÌNH 22D**

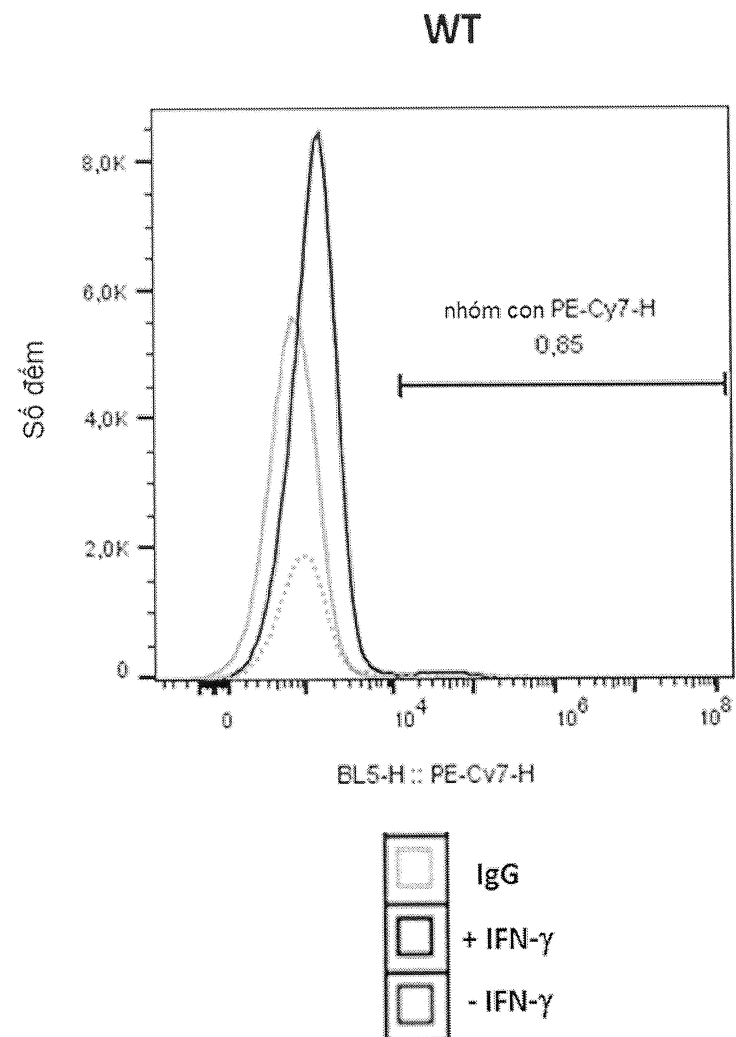
**HÌNH 22E**

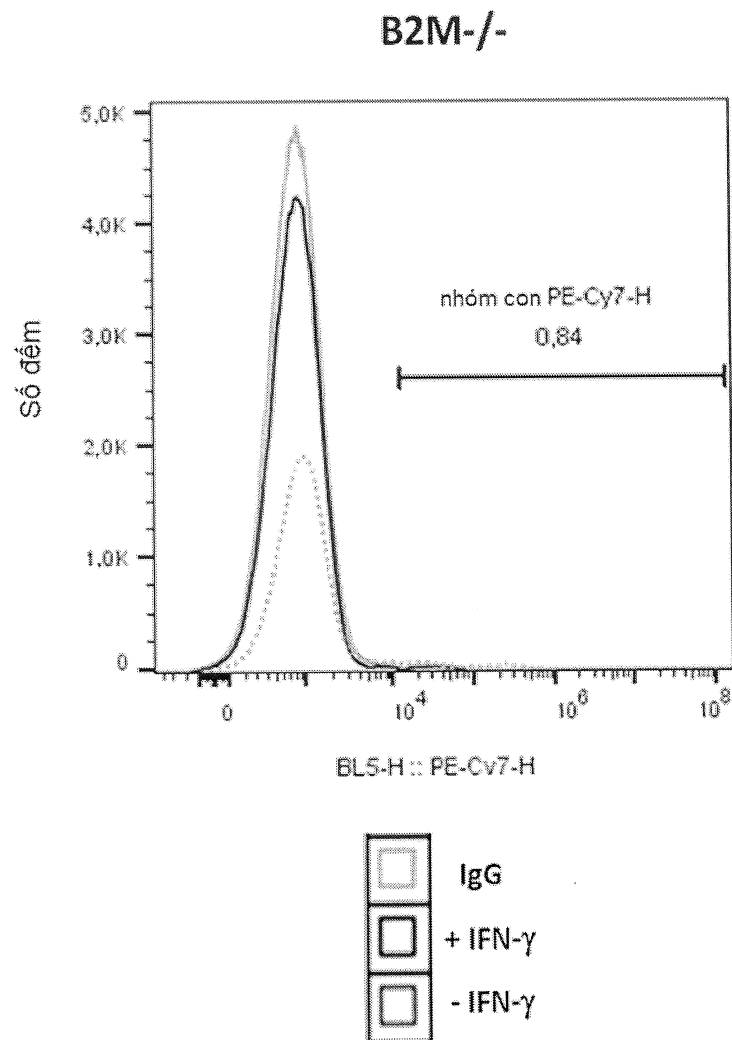
**HÌNH 22F**

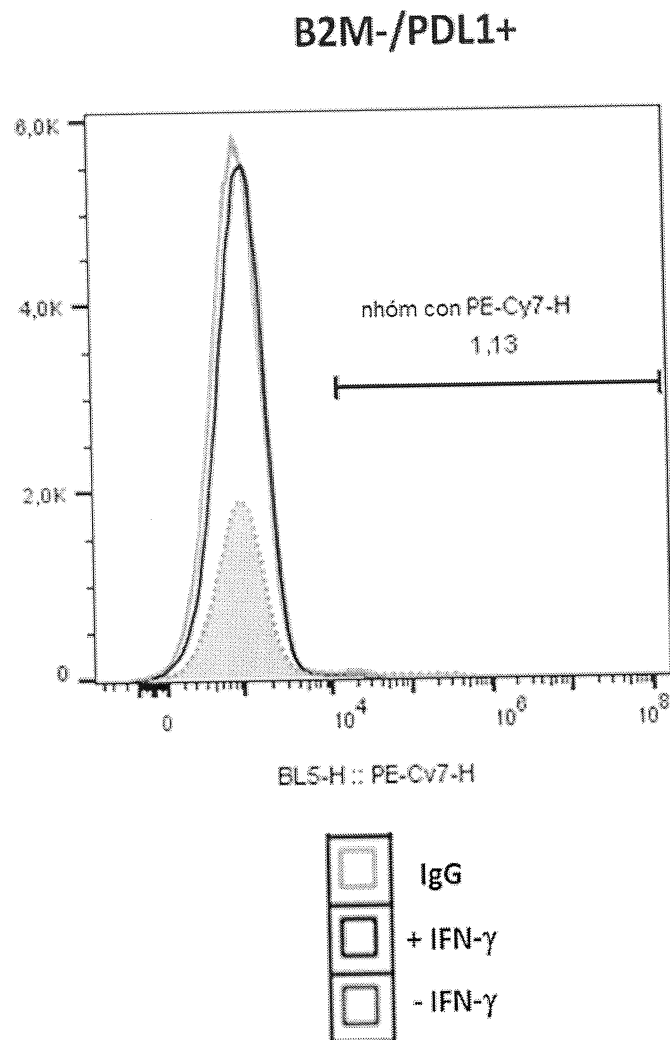
**HÌNH 23A**

**HÌNH 23B**

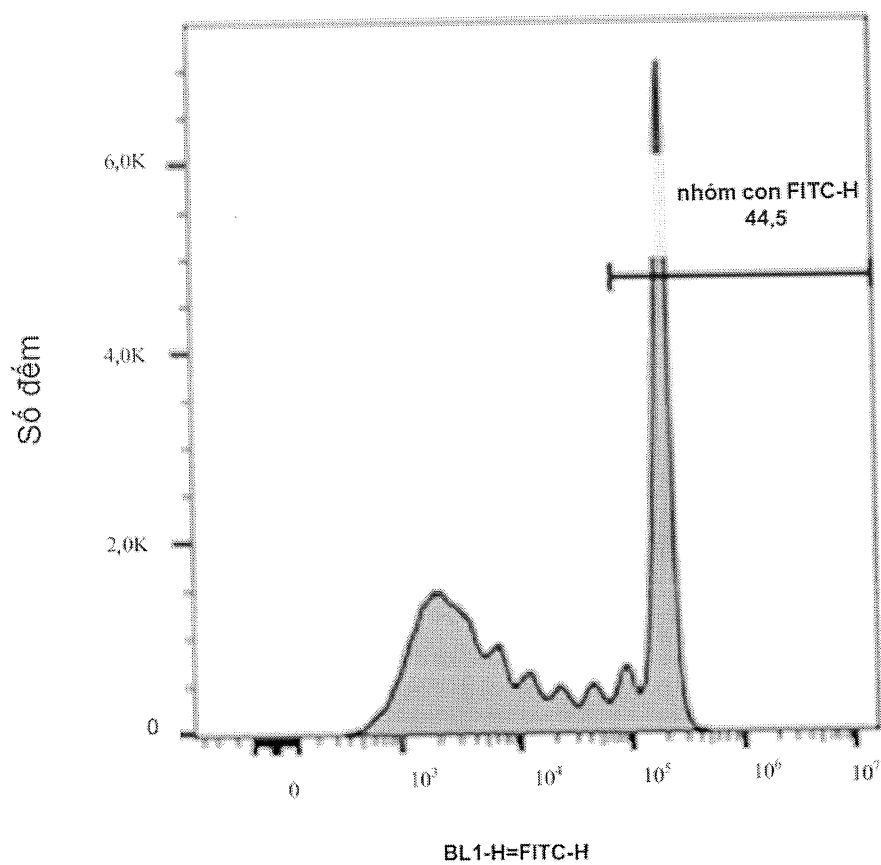
**HÌNH 23C**

**HÌNH 23D**

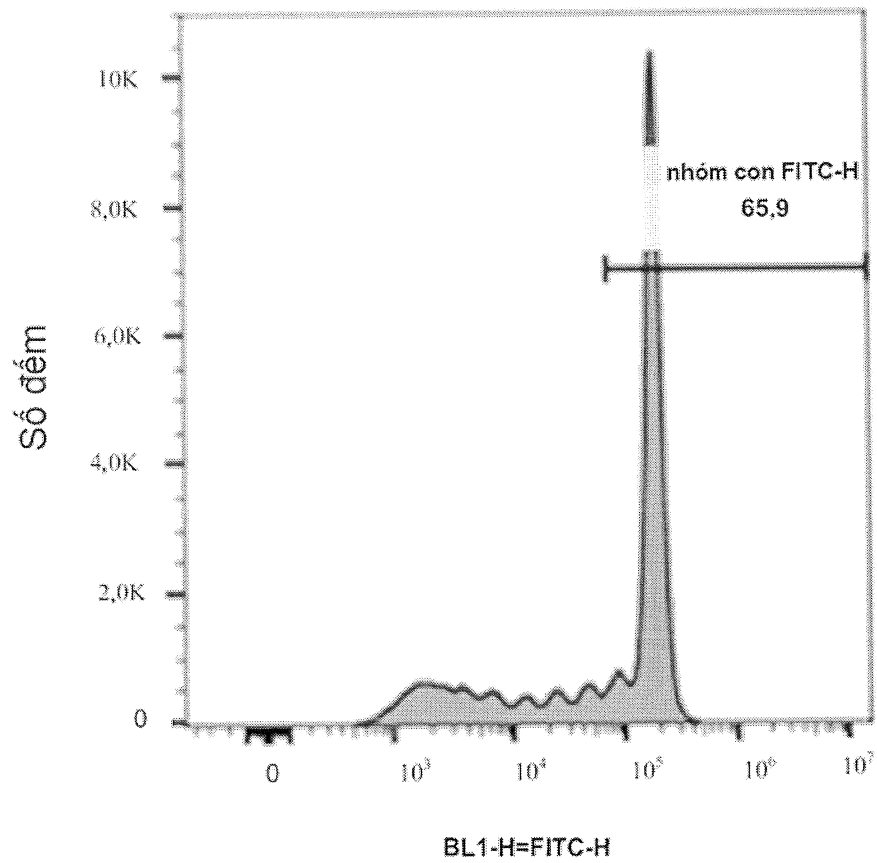
**HÌNH 23E**

**HÌNH 23F**

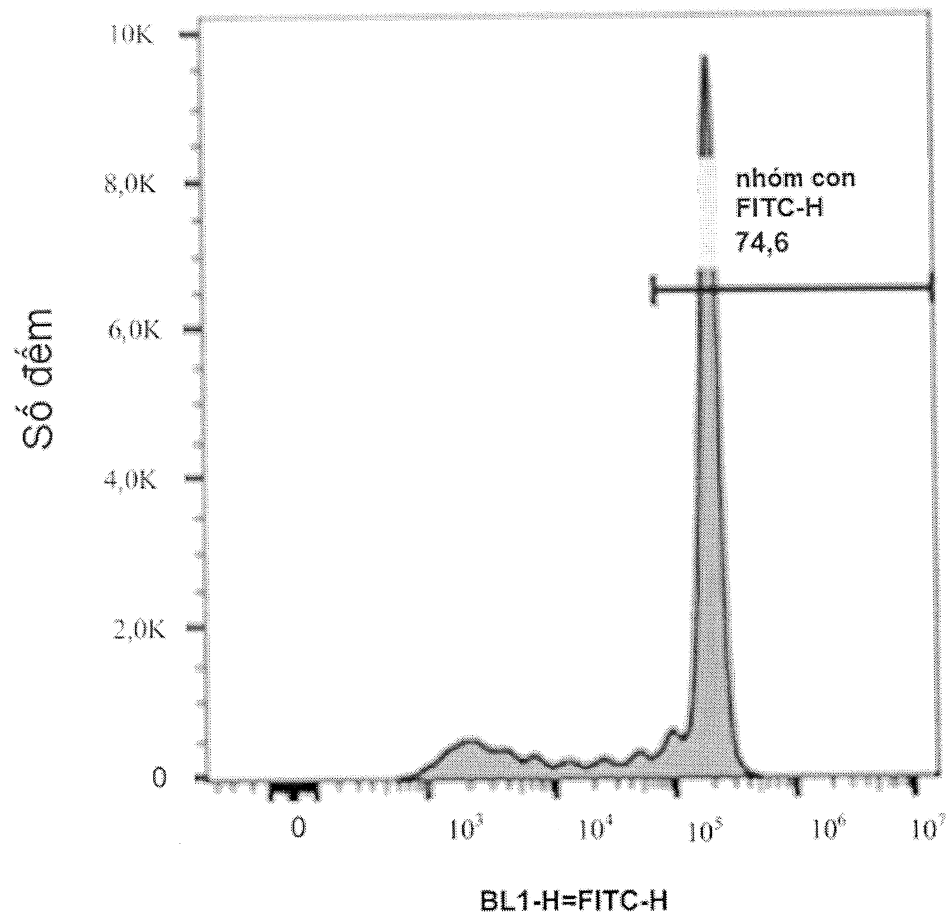
PEC-WT



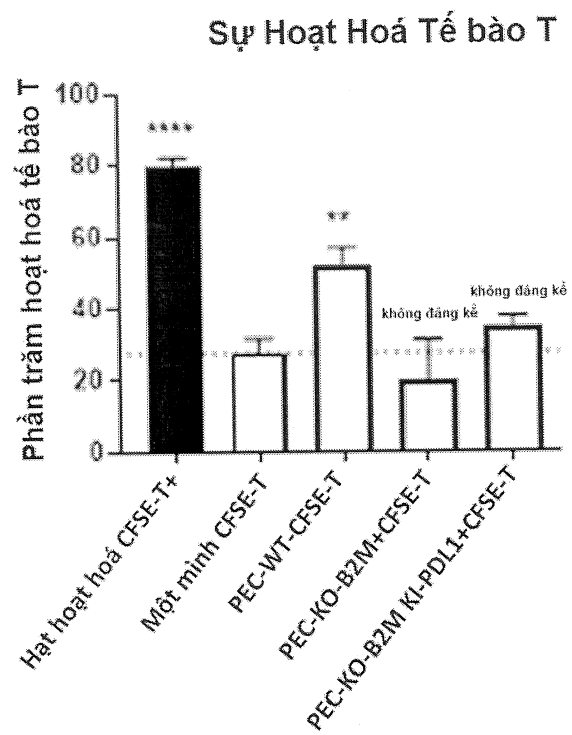
HÌNH 24A

PEC- KO B2M KI PDL1**HÌNH 24B**

PEC-KO B2M



HÌNH 24C

**HÌNH 24D**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CRISPR Therapeutics AG	
<120>	PHƯƠNG PHÁP TẠO RA TẾ BÀO CHO VẬN NẮNG	
<130>	CT109-PCT (100867-635546)	
<150>	62/728,529	
<151>	2018-09-07	
<160>	44	
<170>	PatentIn phiên bản 3.5	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	1	
	gctactctct ctttctggcc	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
	ggccgagatg tctcgctccg	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Homo sapiens	
<400>	3	
	cgcgagcaca gctaaggcca	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự Nhân tạo	
<220>		
<223>	Được tổng hợp	
<400>	4	
	cagacagcaa actcaccag	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự Nhân tạo	
<220>		

<223> Được tổng hợp

<400> 5
aaactttgtc ccgacctcc 20

<210> 6
<211> 638
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
cctagaatga gcgcccgggtg tccaagctg gggcgcgcac ccagatcgg cgggcgcga 60
tgtacagaca gaaaactcac ccagtctagt gcatgccttc ttaaacaatca cgagactcta 120
gaaaaggaaa ctgaaaacgg gaaagtcct ctctctaacc tggcactgcg tcgctggctt 180
ggagacaggt gacggtcctt gcgggccttg tcctgattgg ctgggcacgc gtttaataata 240
agtggaggcg tcgcgctggc gggcattcct gaagctgaca gcattcgggc cgagatgtct 300
cgctccgtgg ccttagctgt gctcgcgcta ctctctcttt ctggcctgga ggctatccag 360
cgtgagtctc tcctaccctc ccgctctggc ccttcctctc ccgtctgcac cctctgtggc 420
cctcgtgtg ctctctcgct ccgtgacttc ccttcctcaa gttctccttg gtggcccgcc 480
gtggggctag tccagggtg gatctcgggg aagcggcggg gtggcctggg agtggggaag 540
gggtgacgca ccggggacgc gcgctacttg ccccttcgg cggggagcag gggagacctt 600
tgccctacgg cgacgggagg gtcgggacaa agtttagg 638

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

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 7
tctgcagaag gctacccta 20

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 8
tgctgtgtct aagacctctt tcat 24

<210> 9

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 9
 gatttgacc tgcgagcg 18

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 10
 caagcctggc aataaacaat ga 22

<210> 11
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 11
 ctgctgcctg aacat 15

<210> 12
 <211> 130
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 12
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact 120

aggggttcct 130

<210> 13
 <211> 800
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gttctagggt ggaaactaag agaattgatgt acctagagg cgctggaagc tctaaagccc 60

tagcagttac tgcttttact attagtggtc gtttttttct cccccccgcc ccccgacaaa 120

tcaacagaac aaagaaaatt acctaaacag caaggacata gggaggaact tcttggcaca 180
 gaactttcca aacacttttt cctgaaggga tacaagaagc aagaaaggta ctcttttact 240
 aggaccttct ctgagctgtc ctgaggatgc ttttgggact atttttctta cccagagaat 300
 ggagaaaccc tgcagggaat tccaagctg tagttataaa cagaagttct ctttctgcta 360
 ggtagcattc aaagatctta atcttctggg tttccgtttt ctgaaatgaa aaatgcaggt 420
 ccgagcagtt aactggctgg ggcaccatta gcaagtcact tagcatctct ggggccagtc 480
 tgcaaagcga gggggcagcc ttaatgtgcc tccagcctga agtcctagaa tgagcgccc 540
 gtgtcccaag ctggggcgcg caccacagat cggagggcgcg cgatgtacag acagcaaact 600
 caccacgtct agtgcagtc ttcttaaaca tcacgagact ctaagaaaag gaaactgaaa 660
 acgggaaagt cctctctctt aacctggcac tgcgtcgctg gcttggagac aggtgacggt 720
 ccctgcgggc cttgtcctga ttggctgggc acgcgtttta tataagtga ggcgtcgcg 780
 tggcgggcat tcctgaagct 800

<210> 14
 <211> 380
 <212> ADN
 <213> Cytomegalovirus

<400> 14
 gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60
 catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccc 120
 acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttc catagtaacg ccaataggga 180
 ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240
 aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt 300
 ggcatatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360
 tagtcatcgc tattaccatg 380

<210> 15
 <211> 276
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus

<400> 15
 tcgaggtgag cccacgttc tgcttcactc tccccatctc cccccctcc ccacccccaa 60
 ttttgtatth atthatttht taattattht gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120
 cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcgggggc gggcgaggcg gagaggcg 180
 gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcgggcg 240

cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcg

276

<210> 16
<211> 1009
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 16
ggagtcgctg cgttgcccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg ccgcccggcc 60
cggctctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg 120
ggctgtaatt agcgcttggg ttaatgacgg ctcgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 180
cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240
gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgtgc ccggcggctg tgagcgtgc 300
gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc gtgtgcgga ggggagcg gcggggggcg 360
gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 420
gggggggtga gcaggggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taacccccct ctgaccccc 480
ctccccagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg 540
cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 600
cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg ccggcggctg 660
tcgaggcgcg gcgagccga gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga gggcgaggg 720
acttcctttg tcccaaatct ggcgagccg aaatctggga ggcgcgcg caccctct 780
agcggcgcg ggcgaagcgg tgccgcgcg gcaggaagga aatggcggg gagggccttc 840
gtgcgtgcc gcgcccgct ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc gcaggggga 900
cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcg 960
ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttctt ttctacag 1009

<210> 17
<211> 873
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgtgaa cgcatttact 60
gtcacggttc ccaaggacct atatgtgga gagtatgga gcaatatgac aattgaatgc 120
aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180

gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc 240
 tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
 atcacagatg tgaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360
 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaga 420
 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggttac 480
 cccaaggccg aagtcatctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
 accaccaatt ccaagagaga ggagaaactt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
 acaacaacta atgagatttt ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaaccat 660
 acagctgaat tggatcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720
 ttggttaattc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt 780
 ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840
 aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg taa 873

<210> 18
 <211> 225
 <212> ADN
 <213> Bos taurus

<400> 18
 ctgtgccttc tagttgccag ccattctgtt tttgcccctc ccccgctgcct tccttgacct 60
 tggaagggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180
 gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgg 225

<210> 19
 <211> 800
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 ccagcgtgag tctctcctac cctcccgtc tggctccttc tctcccgtc tgcaccctct 60
 gtggccctcg ctgtgctctc tcgctccgtg acttcccttc tccaagttct cttggtggc 120
 ccgccgtggg gctagtccag ggctggatct cggggaagcg gcgggggtggc ctgggagtg 180
 ggaagggggt ggcacccgg gacgcgcgct acttgccctt ttcggcgggg agcaggggag 240
 acctttggcc tacggcgacg ggaggggtcg gacaaagttt agggcgctga taagcgtcag 300
 agcgccgagg ttgggggagg gtttctcttc cgctctttcg cggggcctct ggctcccca 360
 gcgcagctgg agtgggggac gggtaggctc gtcccaaagg cgcggcgctg aggtttgtga 420

acgcgtggag gggcgcttgg ggtctggggg aggcgtcgcc cgggtaagcc tgtctgctgc 480
ggctctgctt cccttagact ggagagctgt ggacttcgtc taggcgcccg ctaagttcgc 540
atgtcctagc acctctgggt ctatgtgggg ccacaccgtg gggaggaaac agcacgcgac 600
gtttgtagaa tgcttggtg tgatacaaag cggtttcgaa taattaactt atttgttccc 660
atcacatgtc acttttaaaa aattataaga actaccggtt attgacatct ttctgtgtgc 720
caaggacttt atgtgctttg cgtcatttaa ttttgaaaac agttatcttc cgccatagat 780
aactactatg gttatcttct 800

<210> 20
<211> 141
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 20
aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60
ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgccg ggccgctca gtgagcgagc 120
gagcgcgcag ctgcctgcag g 141

<210> 21
<211> 60
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 60

<210> 22
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
gtcatggcgc cccgaaccct cttcctg 27

<210> 23
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Được tổng hợp

<400> 23
gggtgaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcg 45

<210> 24
 <211> 297
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca 60
 aatttcctga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg 120
 aagaatggag agagaattga aaaagtgag cttcagact tgtctttcag caaggactgg 180
 tctttctatc tcttgacta cactgaattc accccactg aaaaagatga gtatgcctgc 240
 cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatg 297

<210> 25
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 25
 ggtggtggtg gttctggtgg tgggtgttct ggcgggcgcg gctccggtgg tgggtgatcc 60

<210> 26
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 ggctccact cctgaagta tttccacact tccgtgtccc ggcccggccg cggggagccc 60
 cgcttcatct ctgtgggcta cgtggacgac acccagttcg tgcgcttca caacgacgcc 120
 gcgagtccga ggatggtgcc gcgggcgccc tggatggagc aggaggggtc agagtattgg 180
 gaccgggaga cacggagcgc cagggacacc gcacagattt tccgagtga tctgcggacg 240
 ctgcgaggct actacaatca gagcgaggcc gggtctcaca ccctgcagtg gatgcatggc 300
 tgcgagctgg ggcccgacgg gcgcttcctc cgcggtatg aacagttcgc ctacgacggc 360
 aaggattatc tcacctgaa tgaggacctg cgctcctgga ccgcggtgga cacggcggct 420
 cagatctccg agcaaaagtc aaatgatgcc tctgaggcgg agcaccagag agcctacctg 480
 gaagacacat gcgtggagtg gctccacaaa tacctggaga aggggaagga gacgtgctt 540
 cacctggagc ccccaaagac acacgtgact caccaccca tctctgacca tgaggccacc 600
 ctgaggtgct gggccctggg cttctaccct gcggagatca cactgacctg gcagcaggat 660
 ggggagggcc ataccagga cacggagctc gtggagacca ggcctgcagg ggaatggaacc 720

```

ttccagaagt gggcagctgt ggtggtgcct tctggagagg agcagagata cacgtgccat      780
gtgcagcatg aggggctacc cgagcccgct accctgagat ggaagccggc ttcccagccc      840
accatcccca tcgtgggcat cattgctggc ctggttctcc ttggatctgt ggtctctgga      900
gctgtggttg ctgctgtgat atggaggaag aagagctcag gtggaaaagg agggagctac      960
tctaaggctg agtgagcga cagtgccag gggtctgagt ctcacagctt g                  1011

```

```

<210> 27
<211> 67
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Được tổng hợp

```

```

<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (3)..(32)
<223> n là a, c, g, hoặc t

```

```

<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (43)..(58)
<223> n là a, c, g, hoặc t

```

```

<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (63)..(63)
<223> n là a, c, g, hoặc t

```

```

<400> 27
ctnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncgctccgt ggnnnnnnnn nnnnnnnngc      60
tanacgt                                                                    67

```

```

<210> 28
<211> 64
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Được tổng hợp

```

```

<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (3)..(32)
<223> n là a, c, g, hoặc t

```

```

<220>
<221> đặc điểm_hỗn tạp
<222> (45)..(60)
<223> n là a, c, g, hoặc t

```

<400> 28	
ctnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncgcgctac ttagnnnnnn nnnnnnnnnn	60
gcta	64
<210> 29	
<211> 63	
<212> ADN	
<213> Trình tự Nhân tạo	
<220>	
<223> Được tổng hợp	
<220>	
<221> đặc điểm_hỗn tạp	
<222> (3)..(32)	
<223> n là a, c, g, hoặc t	
<220>	
<221> đặc điểm_hỗn tạp	
<222> (44)..(59)	
<223> n là a, c, g, hoặc t	
<400> 29	
ctnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncgcttcg tggnnnnnnn nnnnnnnng	60
cta	63
<210> 30	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Trình tự Nhân tạo	
<220>	
<223> Được tổng hợp	
<220>	
<221> đặc điểm_hỗn tạp	
<222> (7)..(22)	
<223> n là a, c, g, hoặc t	
<400> 30	
ctaaggnnnn nnnnnnnnnn nngcta	26
<210> 31	
<211> 39	
<212> ADN	
<213> Trình tự Nhân tạo	
<220>	
<223> Được tổng hợp	
<220>	
<221> đặc điểm_hỗn tạp	

<222> (3)..(32)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 31
 ctnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncgcgcta

39

<210> 32
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (3)..(32)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<220>
 <221> đặc điểm_hỗn tạp
 <222> (42)..(57)
 <223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 32
 ctnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncgcccgtg gnnnnnnnnn nnnnnngct

60

a

61

<210> 33
 <211> 7133
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 33
 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
 ggctgccccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
 aggggttcct gcggccgcac gcgtgttcta ggggtgaaac taagagaatg atgtacctag 180
 agggcgctgg aagctctaaa gccctagcag ttactgcttt tactattagt ggtcgttttt 240
 ttctcccccc cgcccccca caaatcaaca gaacaaagaa aattacctaa acagcaagga 300
 cataggagg aacttcttgg cacagaactt tccaaacact ttttctgaa gggatacaag 360
 aagcaagaaa ggtactcttt cactaggacc ttctctgagc tgtcctcagg atgcttttgg 420
 gactatTTTT cttaccaga gaatggagaa accctgcagg gaattcccaa gctgtagtta 480
 taaacagaag ttctcttct gctaggtagc attcaaagat cttaatcttc tgggtttccg 540
 ttttctcgaa tgaaaaatgc aggtccgagc agttaactgg ctggggcacc attagcaagt 600

cacttagcat ctctggggcc agtctgcaaa gcgagggggc agccttaatg tgcctccagc 660
 ctgaagtcct agaagtagcg cccggtgtcc caagctgggg cgcgaccccc agatcggagg 720
 gcgccgatgt acagacagca aactcaccca gtctagtgcg tgccttctta aacatcacga 780
 gactctaaga aaaggaaact gaaaacggga aagtccctct ctctaacctg gactgcgtc 840
 gctggcttgg agacaggtag cggtccctgc gggccttgtc ctgattggct gggcacgcgt 900
 ttaataataag tggaggcgtc gcgctggcgg gatttctga agctaagctt gtggacgata 960
 tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat 1020
 tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaact ggccgcctg 1080
 gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 1140
 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta tttacggtaa actgcccact 1200
 tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 1260
 aatggcccgc ctggcattat gccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt 1320
 acatctacgt attagtcacg gctattacca tgggtcgagg tgagccccc gttctgcttc 1380
 actctcccca tctccccccc ctccccacc ccaattttgt atttatttat tttttaatta 1440
 ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1500
 cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct 1560
 ccgaaagttt ctttttatgg cgaggcggcg gcggcgcgcg ccctataaaa agcgaagcgc 1620
 gcggcgggcg ggagtcgctg cgttgcttc gcccggtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg 1680
 ccgcccgcgc cggtctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc 1740
 ttctctccg ggctgtaatt agcgcttggg ttaatgacgg ctcttttctt ttctgtggct 1800
 gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg 1860
 gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgcgg cccgcgctgc ccggcggctg 1920
 tgagcgctgc gggcgcgcg cggggctttg tgcgctccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg 1980
 gccggggcg gtgccccgc gtgcggggg gctgcgagg gaacaaaggc tgcgtgcggg 2040
 gtgtgtgcgt ggggggggta gcaggggggt tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc 2100
 ctgcaccccc ctccccaggt tgctgagcac ggcccggtt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160
 gggcggtggc cggggctcgc cgtgcgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc 2220
 ggggcggggc cgcctcgggc cggggagggc tcggggagg ggcgcggcg ccccgagcg 2280
 ccggcggctg tcgagcgcg gcgagccga gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga 2340
 gggcgaggg acttcctttg tcccaaatct ggcggagccg aaatctggga ggcgcggcg 2400

caccctctt agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg 2460
gagggccttc gtgcgtcgcc gcgccgccgt ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc 2520
cgaggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 2580
tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttcttt ttcctacagg 2640
ggggatccgt ttatctgcag aattcgccct tgacgtcgcc accatgagga tatttgctgt 2700
ctttatatc atgacctact ggcatttgct gaacgcattt actgtcacgg ttcccaagga 2760
cctatatgtg gtagagtatg gtagcaatat gacaattgaa tgcaaatcc cagtagaaaa 2820
acaattagac ctggctgcac taattgtcta ttgggaaatg gaggataaga acattattca 2880
atgtgtgcat ggagaggaag acctgaaggt tcagcatagt agctacagac agagggcccg 2940
gtgtttgaag gaccagctct ccctgggaaa tgctgcactt cagatcacag atgtgaaatt 3000
gcaggatgca ggggtgtacc gctgcatgat cagctatggt ggtgccgact acaagcgaat 3060
tactgtgaaa gtcaatgccc catacaacaa aatcaacaa agaattttgg ttgtggatcc 3120
agtcacctct gaacatgaac tgacatgtca ggctgagggc taccccaagg ccgaagtcac 3180
ctggacaagc agtgaccatc aagtcctgag tggtgaagacc accaccacca attccaagag 3240
agaggagaaa cttttcaatg tgaccagcac actgagaatc aacacaacaa ctaatgagat 3300
tttctactgc acttttagga gattagatcc tgaggaaaac catacagctg aattggatcat 3360
cccagaacta cctctggcac atcctccaaa tgaaaggact cacttggtta ttctgggagc 3420
catcttatta tgccttggtg tagcactgac attcatcttc cgtttaagaa aagggagaat 3480
gatggatgtg aaaaaatgtg gcatccaaga tacaaactca aagaagcaaa gtgatacaca 3540
tttgaggag acgtaaccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgtc cagccatctg 3600
ttgtttgccc ctccccgtg ctttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt 3660
cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 3720
gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 3780
atgcggtggg ctctatgggt cgaccagcg tgagtctctc ctaccctccc gctctggtcc 3840
ttctctccc gctctgcacc ctctgtggcc ctgctgtgc tctctcgtc cgtgacttcc 3900
cttctccaag ttctccttgg tggccgccc tggggctagt ccagggtg atctcgggga 3960
agcggcgggg tggcctggga gtggggaagg ggggtcgcac ccgggacgcg cgctacttgc 4020
ccctttcggc ggggagcagg ggagacctt ggccacggc gacgggaggg tcgggacaaa 4080
gttagggcg tcgataagcg tcagagcgcc gaggttggg gagggtttct cttccgctct 4140
ttcgcggggc ctctggctcc ccagcgag ctggagtggg ggacgggtag gctcgtccca 4200

aaggcgggc gctgaggttt gtgaacgcgt ggaggggagc ttgggggtctg ggggaggcgt 4260
cgcccgggta agcctgtctg ctgcggctct gcttccctta gactggagag ctgtggactt 4320
cgtctaggcg cccgctaagt tcgcatgtcc tagcacctct gggctctatgt ggggccacac 4380
cgtggggagg aaacagcacg cgacgtttgt agaatgcttg gctgtgatac aaagcggttt 4440
cgaataatta acttatttgt tcccatcaca tgtcactttt aaaaaattat aagaactacc 4500
cgttattgac atctttctgt gtgccaagga ctttatgtgc tttgcgtcat ttaattttga 4560
aaacagttat cttccgcat agataactac tatggttatc ttctggtaac cacgtgcgga 4620
ccgaggctgc agcgtcgtcc tccctaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct 4680
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgcg cccgggcttt 4740
gcccggggcg cctcagttag cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagggggcg cctgatgcgg 4800
tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tacgtcaaag caaccatagt 4860
acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 4920
ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca 4980
cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct ccctttaggg ttccgattta 5040
gtgctttacg gcacctgcac ccaaaaaaac ttgatttggg tgatggttca cgtagtgggc 5100
catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttga gtccacgttc tttaatagt 5160
gactcttggt ccaaactgga acaactca accctatctc gggctattct tttgatttat 5220
aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 5280
acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caattttatg gtgcactctc agtacaatct 5340
gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacaccgccc aacaccgct gacgcgccct 5400
gacgggcttg tctgctccc gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 5460
gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaacgcgc gagacgaaag ggctcgtga 5520
tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga acaataaac tgtctgctta cataaacgt 5580
aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt cgaggccgag attaaattcc 5640
aacatggatg ctgatttata tgggtataaa tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt 5700
gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc 5760
aaaggtagcg ttgccaatga tgttacagat gagatggtca gactaaactg gctgacggaa 5820
tttatgcctc ttccgacat caagcatttt atccgtactc ctgatgatgc atggttactc 5880
accactgcga tccccgaaa aacagcattc caggtattag aagaatatcc tgattcaggt 5940
gaaaatattg ttgatgcgct ggacgtgttc ctgcgccggt tgcattcgat tcctgtttgt 6000

aattgtcctt ttaacagcga tcgctgtattt cgtctcgtc aggcgcaatc acgaatgaat 6060
aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa 6120
gtctggaag aaatgcataa acttttgcca ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt 6180
gatttctcac ttgataacct tatttttgac gaggggaaat taataggttg tattgatgtt 6240
ggacgagtcg gaatcgaga ccgataccag gatcttgcca tcctatggaa ctgcctcgg 6300
gagttttctc cttcattaca gaaacggctt tttcaaaaat atggatttga taatcctgat 6360
atgaataaat tgcagtttca ttgatgctc gatgagtttt tctaatttca tgacaaaat 6420
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 6480
ttcttgagat ctttttttgc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 6540
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 6600
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca 6660
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc 6720
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggaac tcaagacgat agttaccgga 6780
taaggcgag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 6840
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga 6900
agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 6960
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg 7020
acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag 7080
caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgt 7133

<210> 34

<211> 7763

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 34

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgacctt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact 120
aggggttctc gcggccgcac gcgtgttcta ggggtgaaac taagagaatg atgtacctag 180
agggcgctgg aagctctaaa gccctagcag ttactgcttt tactattagt ggtcgttttt 240
tttcccccc cgcccccca caaatcaaca gaacaaagaa aattacctaa acagcaagga 300
catagggagg aacttcttgg cacagaactt tccaaacact ttttctgaa gggatacaag 360

aagcaagaaa ggtactcttt cactaggacc ttctctgagc tgcctcagg atgcttttgg 420
gactatTTTT cttaccaga gaatggagaa accctgcagg gaattccaa gctgtagtta 480
taaacagaag ttctccttct gctaggtagc attcaaagat cttaatcttc tgggtttccg 540
ttttctcgaa tgaaaaatgc aggtccgagc agttaactgg ctggggcacc attagcaagt 600
cacttagcat ctctggggcc agtctgcaaa gcgagggggc agccttaatg tgcctccagc 660
ctgaagtctt agaatgagcg cccggtgtcc caagtgggg cgcgaccccc agatcggagg 720
gcgccgatgt acagacagca aactcaccca gtctagtgc tgccttctta aacatcacga 780
gactctaaga aaaggaaact gaaaacggga aagtccctct ctctaactg gcactgcgtc 840
gctggccttg agacaggtga cgggtccctgc gggccttgct ctgattggct gggcacgcgt 900
ttaatataag tggaggcgct gcgctggcgg gattctctga agctaagctt gtggacgata 960
tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat 1020
tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg 1080
gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 1140
cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta ttacggtaa actgcccact 1200
tggcagtaca tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 1260
aatggccgc ctggcattat gcccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt 1320
acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc 1380
actctcccca tctccccccc ctccccacc ccaattttgt atttatttat tttttaatta 1440
ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1500
cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgt 1560
ccgaaagttt ctttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc 1620
gcggcgggcg ggagtcgctg cgttgcttc gcccgtgcc ccgctcgcg ccgcctcgcg 1680
ccgcccgcc cggtctgac tgaccgctt actccacag gtgagcgggc gggacggccc 1740
ttctcctccg ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctgtttctt ttctgtggct 1800
gctgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg 1860
gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtgggagcg ccgctgcgg cccgcgctgc ccggcggctg 1920
tgagcgtgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg 1980
gccgggggcg gtccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg 2040
gtgtgtgcgt gggggggtga gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc 2100
ctgcaccccc ctccccgagt tgctgagcac ggcccggtt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160

gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggaggtggg ggtgccgggc 2220
 ggggcggggc cgctcgggc cggggagggc tgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg 2280
 ccggcggctg tcgaggcgcg gcgagccgca gccattgcct ttatggtaa tcgtgcgaga 2340
 gggcgcaggg acttcctttg tcccaaactt ggaggagccg aaatctggga ggcgcggccg 2400
 caccctctct agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagg aatgggcggg 2460
 gagggccttc gtgcgtcgcc gcgcggcgt ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc 2520
 cgaggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 2580
 tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttcttt ttcctacagg 2640
 ggggatccgt ttatctgcag aattcgccct tgacgtcgcc accatgtctc gctccgtggc 2700
 cttagcttg ctcgcgtac tctctctttc tggcctggag gctgtcatgg cggccgaac 2760
 cctcttcctg ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggagggtggc gatcgatcca 2820
 gcgtactcca aagattcagg ttactcacg tcatccagca gagaatggaa agtcaaattt 2880
 cctgaattgc tatgtgtctg ggtttcatcc atccgacatt gaagttagt tactgaagaa 2940
 tggagagaga attgaaaaag tggagcattc agacttgtct ttcagcaagg actggtcttt 3000
 ctatctcttg tactacactg aattcaccac cactgaaaaa gatgagtatg cctgccgtgt 3060
 gaaccatgtg actttgtcac agccaagat agttaagtgg gatcgagaca tgggtgggtg 3120
 tggttctggt ggtgggtggt ctggcggcgg cggctccggt ggtgggtggat ccggctccca 3180
 ctcttgaag tatttccaca cttcgtgtc cgggccggc cggggggagc ccgcttcat 3240
 ctctgtgggc tacgtggacg acaccagtt cgtgcgctt gacaacgacg ccgagagtcc 3300
 gaggatggtg ccgcgggcgc cgtggatgga gcaggagggg tcagagtatt gggaccggga 3360
 gacacggagc gccagggaca ccgcacagat ttccgagtg aatctgcgga cgctgcgcgg 3420
 ctactacaat cagagcgagg ccgggtctca caccctgcag tggatgcatg gctgcgagct 3480
 ggggcccagc gggcgcttcc tccgcgggta tgaacagttc gcctacgacg gcaaggatta 3540
 tctcaccctg aatgaggacc tgcgtcctg gaccgcgtg gacacggcgg ctcatctc 3600
 cgagcaaaag tcaaatgatg cctctgaggc ggagcaccag agagcctacc tggaagacac 3660
 atgcgtggag tggctccaca aatacctgga gaagggaag gagacgtgc ttacctgga 3720
 gccccaaaag acacacgtga ctaccaccc catctctgac catgaggcca ccctgaggtg 3780
 ctgggccctg ggcttctacc ctgcggagat cacactgacc tggcagcagg atggggaggg 3840
 ccatacccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca ggggatggaa cttccagaa 3900
 gtgggcagct gtggtggtgc cttctggaga ggagcagaga tacacgtgcc atgtgcagca 3960

tgaggggcta cccgagcccg tcaccctgag atggaagccg gcttcccagc ccaccatccc	4020
catcgtgggc atcattgctg gcctggttct cttggatct gtggtctctg gagctgtggt	4080
tgctgctgtg atatggagga agaagagctc aggtggaaaa ggaggagct actctaaggc	4140
tgagtggagc gacagtgcgc aggggtctga gtctcacagc ttgtaaccgc tgatcagcct	4200
cgactgtgcc ttctagtgtc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ctttccttga	4260
ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgatt	4320
gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg	4380
attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcgggtggg ctctatgggt cgaccagcg	4440
tgagtctctc ctaccctccc gctctggtcc ttctctctcc gctctgcacc ctctgtggcc	4500
ctcgtgtgc tctctcgtc cgtgacttcc cttctccaag ttctccttgg tggcccgccg	4560
tggggctagt ccagggtcgg atctcgggga agcggcgggg tggcctggga gtggggaagg	4620
gggtgcgcac ccgggacgcg cgctacttgc ccctttcggc ggggagcagg ggagacctt	4680
ggcctacggc gacgggaggg tcgggacaaa gtttagggcg tcgataagcg tcagagcgcc	4740
gaggttgggg gagggtttct cttcgcgtct ttgcggggc ctctggctcc ccagcgag	4800
ctggagtggg ggacgggtag gctcgtccca aaggcgggc gctgaggtt gtgaacgcgt	4860
ggaggggcgc ttggggtctg ggggaggcgt cggcgggta agcctgtctg ctgcggctct	4920
gcttccctta gactggagag ctgtggactt cgtctaggcg cccgctaagt tcgcatgtcc	4980
tagcacctct ggtctatgt ggggccacac cgtggggagg aaacagcac cgacgttgt	5040
agaatgcttg gctgtgatac aaagcgggtt cgaataatta acttatttgt tccatcaca	5100
tgtcactttt aaaaaattat aagaactacc cgttattgac atctttctgt gtgccaagga	5160
ctttatgtgc ttgctcat ttaattttga aaacagttat cttccgcat agataactac	5220
tatggttatc ttctgtaac cacgtgcgga ccgaggctgc agcgtcgtcc tccctaggaa	5280
cccctagtga tggagtggc cactccctct ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg	5340
cgaccaaagg tcgcccagc cccgggcttt gcccggcg cctcagttag cgagcgagcg	5400
cgcagctgcc tgaggggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt	5460
tcacaccgca tacgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg	5520
cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc	5580
ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgccg ctttccccgt caagctctaa	5640
atcgggggct ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaac	5700
ttgatttggg tgatggttca cgtagtggg catcgccctg atagacggtt tttcgccctt	5760

tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca	5820
accctatctc gggctattct tttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt	5880
taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta	5940
caattttatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc	6000
gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt	6060
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac	6120
cgaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga	6180
acaataaaac tgtctgctta cataaacagt aatacaagggt gtgttatgag ccatattcaa	6240
cgggaaacgt cgaggccgcg attaaattcc aacatggatg ctgatttata tgggtataaa	6300
tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc	6360
gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcg ttgccaatga tgttacagat	6420
gagatggtca gactaaactg gctgacggaa tttatgcctc ttccgaccat caagcatttt	6480
atccgtactc ctgatgatgc atggttactc accactgcga tccccggaaa aacagcattc	6540
caggatttag aagaatatcc tgattcaggt gaaaatattg ttgatgcgct ggagtggttc	6600
ctgcgccggt tgcattcgat tcctgtttgt aattgtcctt ttaacagcga tcgcgtattt	6660
cgtctcgctc aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat	6720
gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca	6780
ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt gattttctac ttgataacct tatttttgac	6840
gaggggaaat taataggttg tattgatgtt ggacgagtcg gaatcgaga ccgataccag	6900
gatcttgcca tcctatggaa ctgcctcgggt gagttttctc cttcattaca gaaacggctt	6960
tttcaaaaat atggatttga taatcctgat atgaataaat tgcagtttca tttgatgctc	7020
gatgagtttt tctaatttca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc	7080
gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cttttttttc tgcgcgtaat	7140
ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga	7200
gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt	7260
ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata	7320
cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac	7380
cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg	7440
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg	7500
tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag	7560

cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggatatct 7620
ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 7680
aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt 7740
ttgctggcct tttgctcaca tgt 7763

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 35
tataagtgga ggcgtcgcgc 20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 36
gagtagcgcg agcacagcta 20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 37
actggacgcg tcgcgctggc 20

<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 38
aagtggaggc gtcgcgctgg 20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39
ggccacggag cgagacatct 20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 40
gcccgaatgc tgtcagcttc 20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 41
ctcgcgtac tctctctttc 20

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 42
tcctgaagct gacagcattc 20

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 43
ttcctgaagc tgacagcatt 20

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 44
actctctctt tctggcctgg 20