



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

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

(11)



1-0048158

(51)^{2022.01} C12N 15/113; A61P 7/06; C12N 5/10; (13) B
C12N 15/67; C12N 15/85; A61K 35/28;
C12N 15/12

(21) 1-2022-08430

(22) 14/07/2020

(86) PCT/CN2020/101936 14/07/2020

(87) WO2022/000572 06/01/2022

(30) 202010616648.7 01/07/2020 CN

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/04/2023 421A

(73) GUANGZHOU REFORGENE MEDICINE CO., LTD. (CN)

Room 801#Building 4#No.188, Kaiyuan Road, Huangpu District Guangzhou,
Guangdong 510700, China

(72) LIANG, Junbin (CN); GU, Bo (CN); XU, Hui (CN).

(74) Công ty TNHH Trường Xuân (AGELESS CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP KÍCH HOẠT SỰ BIỂU HIỆN GEN Γ -GLOBIN, CHẾ PHẨM
CHỈNH SỬA GEN, KIT KÍCH HOẠT GEN Γ -GLOBIN VÀ TẾ BÀO GỐC TẠO
MÁU

(21) 1-2022-08430

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp kích hoạt sự biểu hiện gen gama-globin. Phương pháp này sử dụng oligonucleotit sợi đơn (ssODN) chứa GATA hoặc trình tự bổ sung đối nghĩa TATC của nó làm thông tin dẫn đường, và thực hiện chỉnh sửa gen trong vùng điều biến gen gama-globin để tạo ra yếu tố tăng cường chứa GATA, mà có thể khởi đầu sự biểu hiện gen gama-globin trong tế bào hồng cầu trưởng thành. Tế bào gốc tạo máu được chỉnh sửa gen bằng phương pháp có chức năng bình thường, có thể cải thiện đáng kể sự biểu hiện của huyết sắc tố bào thai sau khi biệt hóa thành hồng cầu, do đó có thể được sử dụng trong điều trị lâm sàng bệnh tan máu bẩm sinh beta (beta-thalassemia) và bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất chế phẩm chỉnh sửa gen, kit kích hoạt gen γ -globin và tế bào gốc tạo máu.

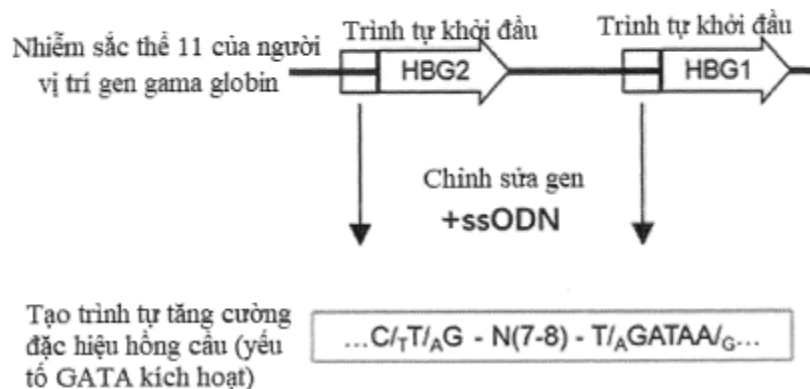


Fig. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực kỹ thuật về công nghệ chỉnh sửa gen, và đề cập đến chế phẩm và ứng dụng để kích hoạt sự biểu hiện gen γ -globin. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chỉnh sửa gen, kit kích hoạt gen γ -globin và tế bào gốc tạo máu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hemoglobin (gọi tắt là Hb) là một loại protein đặc biệt mang và vận chuyển oxy trong hồng cầu. Hemoglobin bao gồm globin và hem. Huyết sắc tố ở người trưởng thành chủ yếu là một tetrame ($\alpha_2\beta_2$) bao gồm 2 α -globin và 2 β -globin, trở thành một huyết sắc tố trưởng thành (HbA). Đột biến trong gen β -globin (HBB) có thể gây ra rối loạn β -hemoglobin (còn được biết đến là bệnh β -hemoglobin), bao gồm bệnh hồng cầu hình liềm (SCD) và β -thalassemia (β -thal). Bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm là do các đột biến điểm trong cấu trúc gen của β -globin, dẫn đến việc sản xuất huyết sắc tố bất thường (HbS). β -thalassemia gây ra do khiếm khuyết một phần hoặc hoàn toàn trong biểu hiện gen β -globin, dẫn đến thiếu hoặc không có HbA. Việc giảm hoặc không có sợi globin của huyết sắc tố có thể dẫn đến cấu trúc huyết sắc tố bất thường, hồng cầu chứa sợi này giảm khả năng biến dạng, tuổi thọ ngắn và có thể bắt đầu tán huyết tại chỗ khi ở trong tủy xương và có thể bị phá hủy trước bởi nội tạng. các cơ quan như lá lách sau khi đi vào tuần hoàn máu ngoại vi, dẫn đến thiếu máu, tích tụ sắt trong cơ thể và thậm chí loạn sản. Bệnh huyết sắc tố ảnh hưởng đến hàng triệu người trên thế giới. Hiện nay, có khoảng 330.000 trẻ em được sinh ra với bệnh huyết sắc tố mỗi năm, đe dọa nghiêm trọng đến sức khỏe con người và thậm chí cả tính mạng. Bệnh nhân mắc tan máu bẩm sinh và bệnh hồng cầu hình liềm chủ yếu truyền giảm nhờ truyền máu dài hạn tiêu chuẩn và liệu pháp thải sắt, không những không thể chữa khỏi mà còn có rủi ro an toàn cao. Ghép tế bào gốc tạo máu đồng loại là công nghệ điều trị duy nhất hiện nay có thể chữa khỏi bệnh tan máu bẩm sinh và bệnh hồng cầu

hình liềm. Tuy nhiên, nó không thể được áp dụng lâm sàng trên quy mô lớn do những hạn chế do các yếu tố như tỷ lệ ghép tủy xương thành công thấp và nguy cơ đào thải miễn dịch. Vì vậy, cần cấp thiết phải phát triển các phương pháp điều trị mới an toàn và hiệu quả.

Trong quá trình phát triển của con người, huyết sắc tố không phải lúc nào cũng bao gồm hai α -globin và hai β -globin. Trong quá trình phát triển phôi thai và ngay sau khi sinh, huyết sắc tố tồn tại ở dạng tetrame ($\alpha_2\gamma_2$) bao gồm hai sợi α -globin và hai sợi γ -globin, được gọi là huyết sắc tố bào thai (HbF), có ái lực với oxy mạnh hơn HbA. Với sự phát triển của bào thai, γ -globin dần dần im lặng và không được biểu hiện, trong khi sự biểu hiện của gen β -globin gần cùng một vị trí gen tăng dần. Khoảng nửa năm sau khi sinh, chế phẩm và tỷ lệ huyết sắc tố trong máu dần trở nên ổn định và HbF được thay thế bằng huyết sắc tố trưởng thành (HbA), chỉ còn lại mức HbF cực kỳ thấp (dưới 1% tổng số huyết sắc tố).

Các nghiên cứu đã phát hiện ra rằng vài quần thể có đột biến tại các vị trí cụ thể nơi quá trình phiên mã của gen γ -globin được kích hoạt, dẫn đến sự gia tăng tỷ lệ HbF trong huyết sắc tố, được gọi là sự tồn tại di truyền của huyết sắc tố bào thai (HPFH). Ví dụ, một số loại khác nhau của đột biến được phát hiện trong vùng khởi động của gen γ -globin như -114 đến -102 13bp del c., 4bp del c. -225 đến -222, c. -114C>T, c. -117G>A, c. -158C>T, c. -167C>T, c. -170G>A, c. -175T>G, c. -175T>C, c. -195C>G, c. -196C>T, c. -198T>C, c. -201C>T, v.v. Đột biến xuất hiện tự nhiên làm tăng tỷ lệ HbF trong tổng số huyết sắc tố ở các mức độ khác nhau. Các nghiên cứu lâm sàng đã phát hiện ra rằng ở một số bệnh nhân mắc bệnh tan máu bẩm sinh beta (β -thalassemia) hoặc thiếu máu hồng cầu hình liềm, các triệu chứng thiếu máu giảm hoặc thuyên giảm ở một mức độ nhất định hoặc nhu cầu truyền máu giảm do sự biểu hiện của HbF tạo nên sự thiếu hụt HbA kết quả từ sự hiện diện thích hợp của các biến thể HPFH trong bộ gen của chúng. Lấy cảm hứng từ phát hiện này, các nhà khoa học tiếp tục khám phá nhiều cách khác nhau để tạo ra biểu hiện HbF nhằm đạt được mục đích điều trị bệnh β -hemoglobin. Ví dụ, hydroxyurea và các loại thuốc khác hiện đang được sử dụng trong lâm sàng để tạo ra biểu hiện HbF nhằm điều trị bệnh

β -hemoglobin. Tuy nhiên, mức HbF gây ra ở hầu hết bệnh nhân là quá thấp để cải thiện hoàn toàn tình trạng của bệnh nhân.

Công nghệ chỉnh sửa gen mang lại hy vọng mới và phương pháp mới để điều trị các bệnh di truyền như bệnh huyết sắc tố. Trong những năm gần đây, sự phát triển mang tính đột phá của công nghệ chỉnh sửa gen đã giúp việc thay đổi nhân tạo trình tự bazơ của các vị trí cụ thể trong bộ gen trở nên khả thi và dễ dàng hơn. Các công nghệ chỉnh sửa gen được phát triển tương đối tốt là ZFN (nucleaza ngón tay kềm), TALEN (nuclease effector giống như bộ kích hoạt phiên mã) và CRISPR (cụm lặp lại palindromic ngắn xen kẽ đều đặn)/hệ thống Cas (hệ thống CRISPR-Cas). Bằng cách thiết kế hệ thống chỉnh sửa gen đặc hiệu, các vị trí ADN bộ gen mục tiêu trong một tế bào sống được phân tách để tạo thành các đứt gãy sợi đôi (DSB). Các tế bào có thể sử dụng cơ chế sửa chữa nối đầu không tương đồng (NHEJ) để sửa chữa các vết nứt ADN, cơ chế này có thể tạo ra các biến ngẫu nhiên, chẳng hạn như chèn trình tự, xóa, thay thế bazơ, v.v. Nếu mẫu cho ADN được thiết kế nhân tạo (mẫu cho) là được cung cấp cùng lúc với chỉnh sửa gen, các tế bào có thể sử dụng cơ chế sửa chữa theo hướng tương đồng (HDR) để hoàn thành việc sửa chữa, từ đó đưa ra dạng đột biến bazơ dự kiến tại vị trí mục tiêu.

Hiện tại, có một số cách tiếp cận khác nhau trên phạm vi quốc tế đối với chiến lược điều trị nhằm tăng cường biểu hiện HbF trong hồng cầu bằng cách chỉnh sửa gen. (1) Xóa hoặc phá hủy yếu tố tăng cường tạo hồng cầu trong intron của gen BCL11A trên nhiễm sắc thể số 2 của người và biểu hiện BCL11A trong hồng cầu bị giảm, do đó tác dụng ức chế phiên mã của BCL11A trên gen γ -globin giảm đi. (2) Xóa hoặc hủy một số trình tự trong vùng khởi động gen γ -globin để ngăn chặn sự gắn kết của các chất ức chế phiên mã hoặc đưa vào các loại đột biến HPFH xuất hiện tự nhiên, chẳng hạn như xóa 13 cặp bazơ (13bp del c.) ở vị trí -114 đến -102. (3) Tạo ra thao tác xóa của một đoạn ADN lớn có kích thước từ 3,5 kb đến 13,6 kb và xóa trình tự chứa một chất ức chế chưa biết giữa gen γ -globin và β -globin để thúc đẩy sự gắn kết của gen γ -globin với trình tự tăng cường LCR ở xa. Các phương pháp đã cho thấy hiệu quả của việc kích hoạt biểu hiện HbF, nhưng hiệu quả lâu dài hoặc/và tính an toàn của các

phương pháp này là không rõ ràng. Vì vậy, các phương pháp tiếp cận mới cần được phát triển hơn nữa.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp kích hoạt sự phiên mã gen γ -globin bằng cách chỉnh sửa gen. Sáng chế sử dụng oligonucleotit sợi đơn (ssODN) chứa yếu tố GATA hoạt động hiệu quả hoặc trình tự bổ sung đối nghĩa, để tạo ra vài đột biến bazơ (xóa, thay thế, chèn, v.v.) ở vị trí thích hợp của vùng khởi động gen γ -globin bằng công nghệ chỉnh sửa gen (như hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR-Cas). Sau khi chỉnh sửa, vùng tăng cường erythroit chứa chi tiết phần tử GATA hoạt động hiệu quả được tạo ra trên mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của vùng khởi động gen γ -globin, phần tử GATA hoạt động hiệu quả bao gồm cấu trúc trình tự của NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR. Nó có thể thúc đẩy quá trình phiên mã gen γ -globin trong hồng cầu trưởng thành và tăng biểu hiện HbF trong hồng cầu. Ở đây, W là T hoặc A; R là A hoặc G; N là A, G, C hoặc T, tốt nhất là C hoặc T; N(7-8) đề cập đến 7 đến 8 bazơ ngẫu nhiên.

Như được thể hiện trong Fig. 1, nguyên tắc của sáng chế là tiến hành chỉnh sửa gen hiệu quả trong tế bào gốc hoặc tế bào tiền thân (như tế bào gốc tạo máu CD34+, v.v.) với khả năng biệt hóa hồng cầu dựa trên công nghệ chỉnh sửa gen như CRISPR-Cas, kết hợp với oligonucleotit sợi đơn (ssODN) được thiết kế theo sáng chế. Các đột biến được tạo ra trong vùng khởi động của các gen HBG1 và HBG2 (được đặt trên nhiễm sắc thể người 11) mã hóa γ -globin người, và cấu trúc trình tự của NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR được tạo ra nhân tạo trên mạch có nghĩa hoặc đối nghĩa của vùng khởi động. Trình tự này hoạt động như một trình tự tăng cường và có thể tuyển chọn các yếu tố kích hoạt như GATA1 và TAL1 để khởi động sự biểu hiện γ -globin sau khi tế bào đích biệt hóa thành hồng cầu.

Sáng chế đề xuất ssODN chứa trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR, trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR hoặc trình tự bổ sung ngược chiều của nó, mà có thể được sử dụng để chỉnh sửa gen của gen γ -globin. Trong sáng chế này, cấu trúc ssODN bao

gồm nhánh tương đồng 5', trình tự thể (được sử dụng để thể trình tự bazơ của gen HBG1 hoặc HBG2) và nhánh tương đồng 3'. Ở đây, trình tự GATA hoặc TATC trong trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR, trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR hoặc trình tự bổ sung ngược chiều của nó của cấu trúc ssODN có thể được đặt ở vị trí bất kỳ trong ssODN, bao gồm trình tự thể, nhánh tương đồng 5', nhánh tương đồng 3', chỗ nối của nhánh tương đồng 5' và trình tự thể, và chỗ nối của nhánh tương đồng 3' và trình tự thể. Chiều dài của nhánh tương đồng một chiều có thể là 20 đến 300 nt. Trong các phương án của sáng chế, chiều dài của nhánh tương đồng ssODN là khoảng 40 nt. Trong vài phương án của sáng chế, ssODN là trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 40 đến SEQ ID NO: 65. Trong vài phương án của sáng chế, 5' và 3' của ssODN được biến đổi phosphorothioat.

Sáng chế bộc lộ chế phẩm để sử dụng trong chỉnh sửa gen γ -globin, bao gồm ssODN, sgARN và CRISPR-Cas nucleaza. Trong vài phương án của sáng chế, vị trí được hướng đích bởi sgARN của hệ thống chỉnh sửa gen được đặt trong các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 đến SEQ ID NO: 39. Theo vài phương án của sáng chế, sgARN là trình tự được thể hiện trong bất kỳ trong số SEQ ID NO: 69 đến SEQ ID NO: 76. Theo vài phương án của sáng chế, protein Cas9 là protein Cas 9 có nguồn gốc từ *Streptococcus pyogenes*.

Trong sáng chế, gARN (ARN dẫn đường) là ARN có khả năng gắn kết và dẫn đường nucleaza, như sgARN (ARN dẫn đường đơn).

Sáng chế đề xuất phương pháp xung điện (xung điện) để sử dụng trong chỉnh sửa gen γ -globin. Phương pháp này sử dụng công nghệ xung điện để chuyển nhiễm hiệu quả tế bào gốc tạo máu người với chế phẩm được tạo ra bởi ssODN, sgARN, và CRISPR-Cas nucleaza để làm trung gian chỉnh sửa gen có hiệu quả.

Sáng chế còn bộc lộ tế bào gốc tạo máu. Chế phẩm bao gồm ssODN, sgARN và CRISPR-Cas nucleaza được chuyển vào tế bào gốc tạo máu bằng phương pháp xung điện. Vùng khởi động gen γ -globin trong tế bào chứa yếu tố GATA hoạt tính, mà có thể làm tăng sự biểu hiện gen γ -globin trong suốt quá trình biệt hóa hồng cầu

(ethyroid).

So với các giải pháp hiện có, sáng chế có các hiệu quả có lợi sau:

ssODN của sáng chế được đưa vào các tế bào cùng với hệ thống chỉnh sửa gen (như CRISPR-Cas, TALEN, ZFN, v.v.), mà dẫn đường sự chỉnh sửa gen của vùng khởi động gen γ -globin, và đột biến ở các vị trí đặc hiệu để tạo ra thành phần GATA (như trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR) có tác dụng kích hoạt hiệu quả. Theo vài phương án của sáng chế, hệ thống chỉnh sửa gen ssODN và CRISPR-Cas được đưa vào tế bào gốc tạo máu người bằng công nghệ xung điện, và đạt được sự chỉnh sửa gen hiệu quả trong vùng khởi động gen γ -globin. Đột biến được đưa vào ở các vị trí đặc hiệu để tạo ra yếu tố tăng cường hồng cầu mong muốn chứa trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR. Sau khi các tế bào gốc tạo máu biệt hóa thành tế bào hồng cầu, sự biểu hiện gen γ -globin tăng đáng kể và phần trăm HbF trong hemoglobin tăng đáng kể.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 minh họa nguyên tắc kỹ thuật của sáng chế.

Fig. 2A thể hiện rằng vùng hướng đích chỉnh sửa gen là trình tự đại giữa -92 và -66 của gen HBG1 và HBG2, cũng thể hiện vị trí của trình tự hướng đích gARN được sử dụng và trình tự đột biến dự kiến sau khi chỉnh sửa gen. Fig. 2B thể hiện rằng vùng hướng đích chỉnh sửa gen là trình tự loại đại -129 và -98 của gen HBG1 và HBG2, cũng thể hiện vị trí của trình tự hướng đích gARN được sử dụng và trình tự đột biến dự kiến sau khi chỉnh sửa gen.

Fig. 2C thể hiện rằng vùng hướng đích chỉnh sửa gen là trình tự loại đại giữa -175 và -153 của gen HBG1 và HBG2, cũng thể hiện vị trí của trình tự hướng đích gARN được sử dụng và trình tự đột biến dự kiến sau khi chỉnh sửa gen.

Fig. 2D thể hiện rằng vùng hướng đích chỉnh sửa gen là trình tự loại đại giữa -192 và -160 của gen HBG1 và HBG2, cũng thể hiện vị trí của trình tự hướng đích

gARN được sử dụng và trình tự đột biến dự kiến sau khi chỉnh sửa gen.

Fig. 2E thể hiện rằng vùng hướng đích chỉnh sửa gen là trình tự loại đại giữa -428 và -406 của gen HBG1 và -432 và -410 của gen HBG2, còn thể hiện rằng vị trí của trình tự hướng đích gARNA và trình tự đột biến dự kiến sau khi chỉnh sửa gen.

Fig. 3 thể hiện dữ liệu hiệu quả chỉnh sửa của bộ gen HBG1 và HBG2 bằng sự chuyển nhiễm của plasmid CRISPR-Cas trong các tế bào 293T. Dữ liệu này lấy từ các kết quả dò INDEL của ADN bộ gen bốn ngày sau khi chuyển nhiễm plasmid CRISPR-Cas trong tế bào 293T sử dụng Lipofectamine 2000™. Hình vẽ này thể hiện phần trăm đột biến indel (chèn xóa) tổng số (% của tổng đột biến).

Fig. 4 thể hiện dữ liệu hiệu quả chỉnh sửa của bộ gen HBG2 bằng chuyển nhiễm đồng thời của plasmid CRISPR-Cas và ssODN trong các tế bào 293T. Dữ liệu này lấy từ các kết quả dò INDEL của HBG2 bốn ngày sau khi chuyển nhiễm của plasmid CRISPR-Cas và ssODN trong tế bào 293T sử dụng Lipofectamine 2000™.

Fig. 5 thể hiện dữ liệu hiệu quả chỉnh sửa của bộ gen HBG2 bằng cách chuyển nhiễm đồng thời plasmid CRISPR-Cas và ssODN trong các tế bào K562. Dữ liệu này lấy từ các kết quả dò INDEL của HBG2 bốn ngày sau khi chuyển nhiễm của plasmid CRISPR-Cas và ssODN trong tế bào K562 sử dụng xung điện Lonza 4D.

Fig. 6 thể hiện dữ liệu hiệu quả chỉnh sửa của bộ gen HBG2 sau khi tải nạp của ribonucleoprotein (RNP) và ssODN trong các tế bào K562 bằng xung điện. Dữ liệu này thu được từ kết quả dò INDEL của HBG2 bốn ngày sau khi tải nạp của ssODN và CRISPR-Cas/sgARN RNP trong tế bào K562 sử dụng xung điện.

Fig. 7A-7C thể hiện dữ liệu hiệu quả chỉnh sửa của gen HBG2 sau khi tải nạp và RNP và ssODN trong các tế bào CD34+ máu ngoại vi sau huy động (mPBSC) bằng xung điện. Dữ liệu này thu được từ kết quả dò INDEL của ADN bộ gen 5 ngày sau cảm ứng biệt hóa hồng cầu, sau đó là tải nạp ssODN và CRISPR-Cas/sgARN RNP trong mPBSC bằng xung điện. Fig. 7A và 7B là bản đồ trình tự Sanger và Fig. 7C là kết quả tỷ lệ INDEL sau khi phân tích bằng phần mềm.

Fig. 8 thể hiện dữ liệu phiên mã mARN γ -globin sau khi chỉnh sửa gen của các tế bào CD34+ máu ngoại vi sau huy động (mPBSC). Dữ liệu này thu được từ kết quả dò qRT-PCR của mARN 18 ngày sau khi cảm ứng sự biệt hóa hồng cầu, sau đó là sự tải nạp của ssODN và CRISPR-Cas/sgARN RNP trong mPBSC bằng xung điện. Mức độ biểu hiện GAPDH được thiết lập làm tham chiếu nội tại cho sự biểu hiện mARN γ -globin trong hình vẽ, và sự biểu hiện mARN γ -globin được chuẩn hóa bằng sự biểu hiện mARN γ -globin trong các tế bào mà không cần chỉnh sửa làm tham chiếu, $n=3$.

Fig. 9 thể hiện dữ liệu biểu hiện HbF sau khi chỉnh sửa gen của các tế bào CD34+ máu ngoại vi sau huy động (mPBSC). Dữ liệu này thu được từ kết quả dò HPLC của hemoglobin sau 18 ngày sau khi cảm ứng sự biệt hóa hồng cầu, sau đó là sự tải nạp của ssODN và CRISPR-Cas/sgARN RNP trong mPBSC bằng xung điện. Sự biểu hiện HbF trong hình vẽ là phần trăm của HbF trong hemoglobin tổng số.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để tạo điều kiện hiểu rõ về sáng chế hiện tại, sáng chế hiện tại sẽ được mô tả toàn diện hơn với sự tham chiếu đến các hình vẽ liên quan. Các phương án ưu tiên của sáng chế được thể hiện trong hình vẽ, nhưng sáng chế có thể được thể hiện ở nhiều dạng khác nhau và không giới hạn ở đó. Ngược lại, mục đích của việc đưa ra các phương án này là để hiểu rõ và toàn diện sáng chế hiện tại.

Trừ khi trường hợp khác được nêu rõ, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như được hiểu chung bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các thuật ngữ được sử dụng ở đây trong phần mô tả của sáng chế hiện tại chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không nhằm mục đích giới hạn sáng chế hiện tại. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "và/hoặc" bao gồm bất kỳ và tất cả các kết hợp của một hoặc nhiều các yếu tố được liệt kê kết hợp.

Vật liệu thô được sử dụng trong các ví dụ sau đều có sẵn trên thị trường.

Sáng chế đề xuất bằng cách sử dụng công nghệ chỉnh sửa gen (như công nghệ chỉnh sửa gen qua trung gian CRISPR-Cas), kết hợp với sợi đơn oligonucleotit

(ssODN) được thiết kế bởi sáng chế, thực hiện chỉnh sửa gen hiệu quả trên các tế bào gốc và tế bào tiền thân với khả năng biệt hóa erythroid như tế bào gốc tạo máu CD34+. Đột biến được tạo ra trong trình tự khởi đầu của gen HBG1 và HBG2 (được đặt trong nhiễm sắc thể người 11) mã hóa γ -globin người, và cấu trúc trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR được tạo nhân tạo trên mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của trình tự khởi đầu (Fig. 1). Trình tự có vai trò như trình tự tăng cường và có thể tuyển chọn có yếu tố kích hoạt như GATA1 và TAL1 để khởi đầu sự biểu hiện γ -globin sau khi các tế bào đích được biệt hóa thành tế bào hồng cầu.

GATA-1 là yếu tố điều biến phiên mã mà được biểu hiện đặc hiệu và cao trong hệ thống hồng cầu và đóng vai trò quan trọng trong quy trình biệt hóa hồng cầu. Các gen mà được biểu hiện đặc biệt cao trong tế bào hồng cầu, như α - và β -globin và enzym sinh tổng hợp hem, được kích hoạt trực tiếp bằng phiên mã GATA-1. Là một yếu tố phiên mã, GATA-1 gắn kết chọn lọc với yếu tố trình tự WGATAR trên ADN chất nhiễm sắc (trong đó W là T hoặc A, R là A hoặc G, và có thể cũng được thể hiện bằng T/A(GATA)A/G; trình tự bổ sung đối nghĩa là YTATCW, trong đó Y là T hoặc C, và có thể cũng được thể hiện là T/C(TATC)T/A). Có thể thấy rằng “bổ sung đối nghĩa” được sử dụng ở đây để chỉ “sự bổ sung ngược” đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, nhiều vị trí GATA cũng được phát hiện trong vùng khởi động của gen β -globin người. Đáng chú ý, không phải tất cả các gen chứa trình tự GATA đều được kích hoạt bởi GATA-1. Điều này là do trình tự GATA được phân bố rộng rãi trong bộ gen và thường hoạt động với nhu cầu hình thành một dạng nhất định của hỗn hợp trình tự (hỗn hợp yếu tố) với trình tự ngược dòng và xuôi dòng (yếu tố *cis*). Ví dụ, có các yếu tố điều biến *cis* như CACCC hoặc hộp GC gần với trình tự GATA, mà thường tuyển chọn GATA-1 để gắn kết cùng với yếu tố phiên mã EKLF. Ví dụ, có yếu tố hộp E (CAGNTG, trong đó N là bazơ bất kỳ) hoặc yếu tố nửa hộp E (NTG) gần trình tự GATA mà tuyển chọn GATA-1 để gắn kết cùng với sự kiện phiên mã TAL1. Các nghiên cứu ChIP-seq về các vị trí gắn kết của GATA-1 và TAL1 ở mức độ bộ gen đã thể hiện rằng khoảng ba phần tư các vị trí đồng liên kết GATA-1/TAL1 có trình tự đều đặn rõ ràng, thường có một nửa yếu tố hộp E (NTG) là 7-8 bazơ nằm phía trước (upstream) của trình tự WGATAR, mà có thể được thể hiện bằng

NTG-N(7-8)-WGATAR. Các thử nghiệm đã thể hiện rằng trình tự này là yếu tố GATA kích hoạt mà khởi đầu một số sự biểu hiện gen trong tế bào hồng cầu. Ví dụ, trình tự tăng cường +58 trong intron BCL11A chứa trình tự CTG-N(7)-TGATAA và sự phá vỡ môđun GATA trong trình tự này có thể dẫn đến giảm đáng kể sự biểu hiện BCL11A trong hồng cầu.

Các trình tự của 1400 bazơ nằm phía trước (upstream) vị trí khởi đầu phiên mã của gen HBG1 và HBG2 có độ tương đồng rất cao và được coi là vùng khởi động. Tác giả sáng chế đã phát hiện ra từ các nghiên cứu là vùng khởi động của chính γ -globin chứa nhiều trình tự GATA (hoặc TATC) và lượng lớn trình tự TG, nhưng γ -globin khó được biểu hiện ở tế bào hồng cầu trưởng thành. Tác giả của sáng chế đã phát hiện ra thông qua các nghiên cứu sâu rằng GATA (hoặc TATC) và các trình tự TG của trình tự khởi đầu gen γ -globin không tạo ra yếu tố GATA hoạt động hiệu quả ở vị trí và hướng (như TG-N (7-8) -WGATAR), và do đó không thể tuyển chọn yếu tố kích hoạt phiên mã như GATA-1/TAL1 mà được biểu hiện cao trong tế bào hồng cầu trưởng thành để gắn kết (đồng gắn kết) với vùng khởi động của gen γ -globin, nên γ -globin bị câm và khó được biểu hiện trong tế bào hồng cầu trưởng thành.

Thông qua các nghiên cứu sâu, tác giả của sáng chế đã phát hiện ra rằng có vài vị trí ở các vùng khởi động của HBG1 và HBG2, mà trình tự của mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của nó có thể tạo ra cấu trúc trình tự của NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR bằng cách thay đổi (như thay thế, xóa, chèn, v.v.) vài bazơ. Tác giả của sáng chế xem xét rằng có khả năng chỉnh sửa một tỷ lệ nhất định của bộ gen thành cấu trúc trình tự dự kiến nếu hệ thống chỉnh sửa gen được sử dụng để cắt các vị trí tạo ra DSB, bằng cách bổ sung mỗi ADN nhận (như oligonucleotit sợi đơn ssODN) để dẫn đường tới các vị trí cho việc sửa chữa HDR. Cuối cùng, vùng khởi động gen γ -globin, có thể hoạt động như trình tự tăng cường để tuyển chọn yếu tố kích hoạt phiên mã được biểu hiện cao trong tế bào hồng cầu trưởng thành như GATA-1/TAL1, v.v. để gắn kết (đồng gắn kết) với vùng khởi động của gen γ -globin do việc tạo ra trình tự như NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR, nhờ đó khởi đầu sự biểu hiện cao của γ -globin trong tế bào hồng cầu trưởng thành.

Chỉnh sửa gen có thể được chia thành hai loại theo mục đích. Một loại là phá hủy trình tự hoặc cấu trúc của vị trí đích, mà được gọi là loại bỏ (knock out). Mục đích của loại kia là đưa vào đột biến trình tự cụ thể ở vị trí đích, mà được gọi là đưa vào (knock in). Để đưa vào đột biến có trình tự cụ thể, phương pháp chung nhất là đưa vào môi nhận ADN ở cùng một thời điểm, và các tế bào có thể sử dụng cơ chế tái tổ hợp tương đồng để thay thế trình tự trong môi trong bộ gen để đạt được việc đưa vào. Môi ADN cho HDR có thể là ADN plasmid, ADN sợi đôi được đuôi thẳng, và ADN phân phối AAV, hoặc oligonucleotit sợi đơn (ssODN). ssODN được sử dụng ngày càng nhiều trong chỉnh sửa gen, vì nó có hiệu quả cao và dễ tổng hợp, đặc biệt thích hợp để chỉnh sửa gen trong các tế bào nuôi cấy trong ống nghiệm.

Cấu trúc ssODN chứa nhánh tương đồng 5', trình tự thể, và nhánh tương đồng 3'. Nhánh tương đồng là các trình tự mà tương đối với vùng ADN bên cạnh vị trí đích dự định chỉnh sửa và được sử dụng để định vị vị trí đích trên nhiễm sắc thể. Trình tự tương đồng của nhánh tương đồng 5' và nhánh tương đồng 3' trên nhiễm sắc thể thường không liên tục trong vị trí, với một khoảng trống nhất định giữa chúng, chẳng hạn như đoạn đệm gồm 1-20 nucleotit và các trình tự đệm này là mục tiêu (trình tự chỉnh sửa dự kiến) của quá trình chỉnh sửa gen, tức là trình tự mong muốn được thay thế bằng chỉnh sửa gen. "Trình tự thể" giữa đầu cuối 3' của nhánh tương đồng 5' và đầu cuối 5' của nhánh tương đồng 3' trên ssODN là kết quả mong muốn của việc chỉnh sửa gen. Có khả năng thực hiện sửa chữa tái tổ hợp tương đồng trong khi cảm ứng việc chỉnh sửa gen bằng việc bổ sung ssODN trong khi thực hiện chỉnh sửa gen. Kết quả của việc sửa chữa là, trình tự chỉnh sửa dự định trong bộ gen tế bào được sửa chữa thành trình tự thể. Chiều dài của trình tự thể trong ssODN có thể được rút ngắn hơn so với của trình tự chỉnh sửa dự định, trong đó, trường hợp mà kết quả việc chỉnh sửa gen là xóa và/hoặc thể của trình tự chỉnh sửa dự định trong bộ gen gốc. Chiều dài của trình tự thể trong ssODN có thể là 0 bazơ, trong đó, trường hợp mà trình tự chỉnh sửa dự định trong bộ gen được xóa. Chiều dài của trình tự thể trong ssODN có thể dài hơn so với của trình tự chỉnh sửa dự định, trong đó, trường hợp mà kết quả của chỉnh sửa gen là trình tự mà được thay thế và/hoặc chèn trình tự.

Sáng chế thích hợp cho hệ thống chỉnh sửa gen trung gian bởi các nucleaza vị trí cụ thể như “CRISPR-Cas”, TALEN và ZFN. “CRISPR-Cas” là công nghệ chỉnh sửa gen, bao gồm nhưng không giới hạn ở bao gồm nhưng không giới hạn ở các hệ thống CRISPR-Cas được thiết kế nhân tạo hoặc tự nhiên khác nhau, chẳng hạn như hệ thống CRISPR-Cas9, hệ thống CRISPR-Cas12, v.v. Nguyên tắc hoạt động của CRISPR-Cas9 là crARN (ARN có nguồn gốc từ CRISPR) kết hợp với tracrARN (ARN kích hoạt chuyển hóa) thông qua ghép nối cơ sở để tạo thành phức hợp tracrARN/crARN, dẫn đường protein nucleaza Cas9 để phân cắt ADN sợi đôi tại các vị trí đích trình tự được ghép cặp với crARN. Vai trò của tracrRNA và crRNA có thể cũng được thể bởi sgARN tổng hợp nhân tạo với nguyên tắc dẫn đường. Khi sử dụng hệ CRISPR-Cas khác, cần thiết để thiết kế sgARN hoặc crARN tương đồng. Khi sử dụng hệ thống như TALEN hoặc ZFN, nucleaza TALEN hoặc ZFN tương đồng cần được thiết kế theo vị trí chỉnh sửa được bộc lộ trong sáng chế này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sàng lọc hệ ssODN và CRISPR-Cas để đưa vào yếu tố GATA kích hoạt trong trình tự khởi đầu gen γ -globin

Bằng cách phân tích trình tự (SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2) trong khoảng 1,4 kb nằm phía trước (upstream) của vị trí khởi đầu phiên mã của HBG1 và HBG2, tác giả phát hiện ra rằng các trình tự của nhiều đoạn thỏa mãn rằng việc tạo cấu trúc trình tự của NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR bằng cách thay đổi vài bazơ như thay thế, xóa, chèn, v.v. Bằng cách phân tích liệu có trình tự NGG (PAM được nhận dạng bởi spCas9) ở gần bazơ đột biến đích trong các đoạn này hay không và liệu vị trí phân cắt là ở trên đích của trình tự đích được chỉnh sửa hay không, năm vùng hướng đích ứng viên ó nhiều khả năng đạt được hiệu quả chỉnh sửa gen nhất (Fig. 2A đến 2E). Theo khoảng cách từ vị trí khởi đầu phiên mã, chúng là: Vùng 1, giữa -92 đến -66 của trình tự khởi đầu HBG1 và HBG2 (Fig. 2A); Vùng 2, giữa -129 đến -98 của trình tự khởi đầu HBG1 và HBG2 (Fig. 2B); Vùng 3, giữa -175 và -153 của trình tự khởi đầu HBG1 và HBG2 (Fig. 2C); Vùng 4, giữa -192 và -160 của HBG1 và gen HBG2 (Fig. 2D); Vùng 5, giữa -428 đến -406 của gen HBG1 và -432

đến -410 của gen HBG2 (Fig. 2E).

Theo đặc điểm trình tự của năm vùng ứng viên và vị trí phân cắt dự đoán của hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR-Cas9, các loại đích đột biến thích hợp trong mỗi vùng thu được bằng cách phân tích, như được thể hiện trong bảng 1 (SEQ ID NO: 3 đến SEQ ID NO: 31). Gạch chân ở đây chỉ bazơ mà cần được thay thế, mà nó là kết quả mong muốn sau khi chỉnh sửa gen. Trong sáng chế này, chiều dài của bazơ thế là 0-6 bazơ, và hiệu quả đạt được là xóa, thay thế, chèn, hoặc kết hợp xóa, thay thế và chèn.

Bảng 1: Trình tự loại đại của trình tự khởi đầu HBG1 và HBG2 và các trình tự thu được sau khi chỉnh sửa

SEQ ID	Số	Vị trí đích và trình tự được chỉnh sửa (5' -3')
SEQ ID NO:3	Vùng 1, loại đại	TTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGT
SEQ ID NO:4	Đột biến_01	TTGACCAATAGT <u>G</u> ATAGAGTATCCAGT
SEQ ID NO:5	Đột biến_02	TTGACCAATAG <u>A</u> GATAGAGTATCCAGT
SEQ ID NO:6	Đột biến_03	TTGACCAATA <u>A</u> GATAGAGTATCCAGT
SEQ ID NO:7	Đột biến_04	TTGACCAATAT <u>G</u> ATAGAGTATCCAGT
SEQ ID NO:8	Vùng 2, loại đại	CAGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:9	Đột biến_05	CAGCCTTGCCTTGAC <u>A</u> GATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:10	Đột biến_06	CAGCCTTGCCTTGACT <u>G</u> ATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:11	Đột biến_07	CAGCCTTGCCTTGAG <u>A</u> GATAGCCTTGACAAGG

SEQ ID NO:12	Đột biến_08	CAGCCTTGCCTTGAG <u>T</u> GATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:13	Đột biến_09	CAGCCTTGCCTTGAA <u>A</u> GATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:14	Đột biến_10	CAGCCTTGCCTTGA <u>A</u> TGATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:15	Đột biến_11	CAGCCTTGCCTTGAT <u>A</u> GATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:16	Đột biến_12	CAGCCTTGCCTTGAT <u>T</u> GATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:17	Đột biến_13	CAGCCTTGCCTTGAT <u>A</u> AAATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:18	Đột biến_14	CAGCCTTGCCTTGATA <u>A</u> AAATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:19	Đột biến_15	CAGCCTTGCCTTGAT <u>A</u> AATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:20	Đột biến_16	CAGCCTTGCCTTGATAGCCTTGACAAGG
SEQ ID NO:21	Đột biến_17	CAGCCTTGCCTTGAT <u>A</u> AAGG
SEQ ID NO:22	Đột biến_18	CAGCCTTGCCTTGAT <u>A</u> AAAGG
SEQ ID NO:23	Vùng 3, loại đại	TATCTGTCTGAAACGGTCCCTGG
SEQ ID NO:24	Đột biến_19	TATCTGTCTGAAACGGT <u>A</u> GATA <u>A</u> CCCTGG
SEQ ID NO:25	Vùng 4, loại đại	CACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAACGG
SEQ ID NO:26	Đột biến_20	CACTATCTCAATGCAAC <u>A</u> GAAACGG

SEQ ID NO:27	Vùng 5, loại đại	TCCCTGAACTTTTCAAAAATTGG
SEQ ID NO:28	Đột biến_21	TCCCTGAACTTTTCAGATAATTGG
SEQ ID NO:29	Đột biến_22	TCCCTGAACTTTTCAGATAAATTGG
SEQ ID NO:30	Đột biến_23	TCCCTGAACTTTTCAGATAAAATTGG
SEQ ID NO:31	Đột biến_24	TCCCTGAACTTTTCAGATAGAATTGG

Để phân cắt sợi kép ADN gần với vị trí chỉnh sửa của các vùng được thể hiện trong bảng 1 để tạo ra DSB, hệ thống spCas9 CRISPR-Cas có hiệu quả phân cắt cao hơn (có nguồn gốc từ *Streptococcus pyogenes*) được chọn trong sáng chế để phân tích các vị trí đích với hiệu quả phân cắt cao hơn. Vị trí_1 đến vị trí_8 được lựa chọn làm các vị trí đích ứng viên. Vị trí đích tương đồng của trình tự ADN và trình tự PAM (NGG) được thể hiện trong bảng 2 (SEQ ID NO: 32 đến SEQ ID NO: 39).

Bảng 2: Các vị trí đích được xác nhận bởi sgARN trên trình tự khởi đầu HBG1 và HBG2

SEQ ID	Vị trí	Vị trí nhận biết sgARN và PAM (5'-3')	Sợi ADN
SEQ ID NO:32	vị trí_1	ACTGGATACTCTAAGACTAT TGG	mạch đối nghĩa
SEQ ID NO:33	vị trí_2	CTTGTCAAGGCTATTGGTCA AGG	mạch đối nghĩa
SEQ ID NO:34	vị trí_3	GTTTGCCTTGTCAAGGCTAT TGG	mạch đối nghĩa
SEQ ID NO:35	vị trí_4	TGGTCAAGTTTGCCTTGTCA AGG	mạch đối nghĩa
SEQ ID NO:36	vị trí_5	CTTGACCAATAGCCTTGACA	mạch có nghĩa

		AGG	
SEQ ID NO:37	vị trí_6	TATCTGTCTGAAACGGTCCC TGG	mạch có nghĩa
SEQ ID NO:38	vị trí_7	ATGCAAATATCTGTCTGAAA CGG	mạch có nghĩa
SEQ ID NO:39	vị trí_8	TCCCTGAACTTTTCAAAAAT TGG	mạch có nghĩa

Theo loại đột biến dự định được thể hiện trong bảng 1, và mạch ADN (mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa) được xác nhận bởi sgARN trong bảng 2, ssODN tương đồng được thiết kế để dẫn đường việc chỉnh sửa và sửa chữa gen (Bảng 3, SEQ ID NO: 40 đến SEQ ID NO: 65). Trong sáng chế, cấu trúc ssODN bao gồm nhánh tương đồng 5', trình tự thể và nhánh tương đồng 3'. Trình tự GATA hoặc TATC trong trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR, trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR, hoặc trình tự bổ sung ngược chiều tương đồng của nó của cấu trúc ssODN có thể được đặt ở vị trí bất kỳ trên ssODN, bao gồm trình tự thể, nhánh tương đồng 5', nhánh tương đồng 3', chỗ tiếp giáp của nhánh tương đồng 5' và trình tự thể, và chỗ tiếp giáp của nhánh tương đồng 3' và trình tự thể. Nhánh tương đồng trên cả hai bên của ssODN có thể đối xứng hoặc không đối xứng (độ dài ở cả hai bên là khác nhau). ssODN với nhánh tương đồng đối xứng được sử dụng thống nhất cho các thử nghiệm theo sáng chế để thuận tiện cho việc so sánh hệ thống. Chiều dài của nhánh tương đồng ở cả hai phía của ssODN là 20 đến 300 nt. ssODN với nhánh tương đồng xấp xỉ 40 nt trên cả hai phía được sử dụng để minh họa các ví dụ của sáng chế để thuận tiện cho việc so sánh hệ thống. ssODN có thể là mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của vùng ADN được chỉnh sửa (trình tự nhánh tương đồng giống với mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa tương ứng). Trong sáng chế này, mạch ADN có cùng một vị trí nhận biết sgARN được lựa chọn thống nhất ssODN làm trình tự mỗi ssODN. Ngoại trừ trình tự của nhánh tương đồng trên cả hai phía, bazơ thể của trình tự của ssODN có thể là 0, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 bazơ, và hiệu quả đạt được là xóa, thay thế, chèn, hoặc kết hợp xóa, thay thế, và chèn. Hiệu quả đạt được có thể thay đổi nhiều hơn 1 bazơ trên bộ gen, như xóa hoặc thay thế 1-20 bazơ. Trong các trình tự được thể hiện trong bảng 3 (SEQ ID NO:

40 đến SEQ ID NO: 65), bazơ gạch chân là các nhánh tương đồng trên cả hai phía với chiều dài khoảng 40 nt, bazơ không gạch chân giữa nhánh tương đồng là bazơ thay thế, trong đó ssODN_16 có 0 bazơ thay thế giữa nhánh tương đồng trên cả hai phía. Ba nucleotit thứ nhất ở cả hai đầu cuối của ssODN được cải biến bằng phosphorothioat để tăng cường độ ổn định của ssODN và cải thiện hoạt tính của nó trong chỉnh sửa gen.

Bảng 3: Trình tự ssODN và số gARN khớp

SEQ ID	ssODN	Trình tự ssODN (5'-3')	Vùng có khả năng áp dụng
SEQ ID NO:40	ssODN_1	<u>CCTAGCCAGCCGCCGGCCCCCTGGCCTCACT</u> <u>GGATACTCTATCACTATTGGTCAAGTTTGC</u> <u>CTTGTCAAGGCTATTGGTCAAGGC</u>	Vùng 1
SEQ ID NO:41	ssODN_2	<u>CCTAGCCAGCCGCCGGCCCCCTGGCCTCACT</u> <u>GGATACTCTATCTCTATTGGTCAAGTTTGC</u> <u>CTTGTCAAGGCTATTGGTCAAGGC</u>	Vùng 1
SEQ ID NO:42	ssODN_3	<u>CCTAGCCAGCCGCCGGCCCCCTGGCCTCACT</u> <u>GGATACTCTATCTTATTGGTCAAGTTTGCC</u> <u>TTGTCAAGGCTATTGGTCAAGGC</u>	Vùng 1
SEQ ID NO:43	ssODN_4	<u>CCTAGCCAGCCGCCGGCCCCCTGGCCTCACT</u> <u>GGATACTCTATCATATTGGTCAAGTTTGCC</u> <u>TTGTCAAGGCTATTGGTCAAGGC</u>	Vùng 1
SEQ ID NO:44	ssODN_5	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCTGTCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:45	ssODN_6	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCAGTCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID	ssODN_7	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCTCTCAAGGCAAGGCTGGCC</u>	Vùng 2

NO:46		<u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	
SEQ ID NO:47	ssODN_8	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCACTCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:48	ssODN_9	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCTTTCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:49	ssODN_1 0	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCATTCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:50	ssODN_1 1	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCTATCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:51	ssODN_1 2	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATCAATCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:52	ssODN_1 3	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATTTATCAAGGCAAGGCTGGCC</u> <u>AACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:53	ssODN_1 4	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATTTTATCAAGGCAAGGCTGGC</u> <u>CAACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:54	ssODN_1 5	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTATTATCAAGGCAAGGCTGGCCA</u> <u>ACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:55	ssODN_1 6	<u>CTCTAAGACTATTGGTCAAGTTTGCCTTGT</u> <u>CAAGGCTA</u> <u>TCAAGGCAAGGCTGGCCAACCCATGGGTG</u> <u>GAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2

SEQ ID NO:56	ssODN_1 7	<u>CCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCA</u> <u>AGTTTGCCTTATCAAGGCAAGGCTGGCCA</u> <u>ACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:57	ssODN_1 8	<u>CCTCACTGGATACTCTAAGACTATTGGTCA</u> <u>AGTTTGCCTTTATCAAGGCAAGGCTGGCCA</u> <u>ACCCATGGGTGGAGTTTAGCCA</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:58	ssODN_1 9	<u>TGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAG</u> <u>CCTTGCCTTGATAAGGCAAACCTTGACCAAT</u> <u>AGTCTTAGAGTATCCAGTGAGG</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:59	ssODN_2 0	<u>TGGCTAAACTCCACCCATGGGTTGGCCAG</u> <u>CCTTGCCTTGATAAAGGCAAACCTTGACCA</u> <u>ATAGTCTTAGAGTATCCAGTGAGG</u>	Vùng 2
SEQ ID NO:60	ssODN_2 1	<u>TCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGT</u> <u>CTGAAACGGTAGATAACCCTGGCTAAACT</u> <u>CCACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCT</u>	Vùng 3
SEQ ID NO:61	ssODN_2 2	<u>TATCCTCTTGGGGGCCCCCTTCCCCACACTA</u> <u>TCTCAATGCAACAGAAACGGTCCCTGGCT</u> <u>AAACTCCACCCATGGGTTGGCCAGC</u>	Vùng 4
SEQ ID NO:62	ssODN_2 3	<u>CCTATGCCTAAAACACATTTTACAATCCCT</u> <u>GAACTTTTCAGATAATTGGTACATGCTTTA</u> <u>ACTTTAAACTACAGGCCTCACTG</u>	Vùng 5
SEQ ID NO:63	ssODN_2 4	<u>CCTATGCCTAAAACACATTTTACAATCCCT</u> <u>GAACTTTTCAGATAAATTGGTACATGCTTT</u> <u>AACTTTAAACTACAGGCCTCACTG</u>	Vùng 5
SEQ ID NO:64	ssODN_2 5	<u>CCTATGCCTAAAACACATTTTACAATCCCT</u> <u>GAACTTTTCAGATAAAATTGGTACATGCTT</u> <u>TAACTTTAAACTACAGGCCTCACTG</u>	Vùng 5
SEQ ID NO:65	ssODN_2 6	<u>CCTATGCCTAAAACACATTTTACAATCCCT</u> <u>GAACTTTTCAGATAGAATTGGTACATGCTT</u> <u>TAACTTTAAACTACAGGCCTCACTG</u>	Vùng 5

Vector sgARN-spCas9 (PX459, pSpCas9(BB)-2A-Puro) được sử dụng để biểu hiện sgARN tương ứng với vị trí đích trong bảng 2. Vector biểu hiện protein spCas9 và có thể biểu hiện sgARN với chiều dài 100 nt. Đầu cuối 5' của sgARN là trình tự dẫn đường 20 nt, và cái sau là trình tự xương sống sgARN chung của 80 nt (SEQ ID NO: 66,

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU). Phương pháp tách dòng sgARN là: tổng hợp oligo trình tự sợi dẫn đường tương ứng (giống như trình tự vị trí đích 20nt trong bảng 2) của sgARN và oligo sợi bổ sung (cacc được bổ sung vào đầu 5' của trình tự sợi dẫn đường, nếu nucleotit thứ nhất ở đầu 5' của sợi dẫn đường không phải là guanin G, sau đó caccG được bổ sung vào đầu 5' của sợi dẫn đường; cacc được bổ sung vào đầu 5' của sợi bổ sung; nếu G được bổ sung vào đầu 5' của sợi dẫn đường, sau đó C được bổ sung vào đầu 3' của sợi bổ sung để cặp đôi bổ sung). Hai oligo được trộn với lượng bằng nhau, được xử lý biến dạng nhiệt và ủ ở 95°C, và sau đó được lai (ligate vào vector PX459 được cắt bằng enzym giới hạn Bbs I. Sự thành công tách dòng được xác định bằng PCR khuôn lạc và giải trình tự Sanger. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng SEQ ID NO: 67 (5'-3': GGACTATCATATGCTTACCGTAAC) và SEQ ID NO: 68 (5'-3': GGCGGGCCATTACCGTAAG) làm mẫu. Sau khi tách dòng thành công, thu được 8 plasmid, biểu hiện sgARNs từ SEQ ID NO: 69 đến SEQ ID NO: 76 tương ứng (bảng 4).

Bảng 4: sgARN được biểu hiện bằng vector PX459

SEQ ID	sgARN	Trình tự sgARN 5' - 3')
SEQ ID NO:69	sgARN-1	ACUGGAUACUCUAAGACUAU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID	sgARN-2	CUUGUCAAGGCUAUUGGUCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA

NO:70		GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID NO:71	sgARN- 3	GUUUGCCUUGUCAAGGCUAU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID NO:72	sgARN- 4	UGGUCAAGUUUGCCUUGUCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID NO:73	sgARN- 5	CUUGACCAAUAGCCUUGACA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID NO:74	sgARN- 6	UAUCUGUCUGAAACGGUCCC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID NO:75	sgARN- 7	AUGCAAAUAUCUGUCUGAAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
SEQ ID NO:76	sgARN- 8	UCCCGAACUUUUCAAAAAU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU

8 plasmid biểu hiện được chuyển nhiễm vào các tế bào 293T và phương pháp này được đề cập đến là phương pháp của kit Lipofectamine 2000™. Các tế bào đã chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 4 ngày, và các tế bào được thu thập để chiết ADN bộ gen. SEQ ID NO: 77 và SEQ ID NO: 78, và SEQ ID NO: 79 và SEQ ID NO: 78

được sử dụng lần lượt để khuếch đại các mảnh của gen khởi đầu HBG1 và HBG2 bằng phương pháp PCR dùng enzym trung thực cao KOD Plus. Sản phẩm PCR thu được được tinh chế và giải trình tự sử dụng SEQ ID NO: 77 và SEQ ID NO: 79. Các tệp thu được từ kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm synthego về hiệu quả chỉnh sửa gen. Như được thể hiện trong Fig. 3, ngoại trừ sgARN-8 với hiệu quả chỉnh sửa tương đối thấp (khoảng 20%), hiệu quả đột biến (indel) tổng thể về chỉnh sửa trong các nhóm khác khoảng 40-50%.

Bảng 5: PCR và môi trình tự Sanger

SEQ ID	Vị trí	Vị trí nhận biết sgARN và PAM (5'-3')
SEQ ID NO:77	HBG1_F	TACTGCGCTGAACTGTGGCT T
SEQ ID NO:78	HBG1/2_R	CTTCCCAGGGTTTCTCCTCCAG
SEQ ID NO:79	HBG2_F	TGCACTGAACTGTTGCTTTAT AGGA

Ví dụ 2: Đồng chuyển nhiễm của ssODN và vector sgARN-spCas9 vào các tế bào 293T để chỉnh sửa gen

Tám vector sgARN-spCas9 được đồng chuyển nhiễm với ssODN thích hợp vào tế bào 293T để kiểm tra liệu việc bổ sung ssODN có thể cảm ứng sự chỉnh sửa gen để tạo ra loại đột biến dự định hay không (xảy ra sửa chữa HDR). Theo vị trí của điểm phân cắt sgARN, 8 vector sgARN-spCas9 được kết hợp theo phương pháp kết hợp sgARN + ssODN được thể hiện trong bảng 6 để tạo ra 30 hỗn hợp tương ứng. Sử dụng chất phản ứng Lipofectamine 2000™, bổ sung ssODN trong khi chuyển nhiễm plasmid, và ssODN và plasmid được phân phối vào tế bào cùng nhau. Tế bào đã được chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 4 ngày, và thu thập các tế bào để chiết ADN bộ gen. Vì hiệu quả chỉnh sửa gen của HBG1 và HBG2 tương quan gần như dương, và hiệu quả chỉnh sửa gen của HBG2 luôn cao hơn một chút so với của HBG1 (Fig. 3), chỉ hiệu quả chỉnh sửa gen của bộ gen HBG2 đã được lựa chọn để so sánh trong các thử

nghiệm tiếp theo. Mảnh của gen khởi đầu HBG2 được khuếch đại bằng PCR, tinh chế và giải trình tự theo phương pháp được mô tả trong ví dụ 1. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm synthego đối với hiệu quả chỉnh sửa gen, thể hiện rằng việc bổ sung ssODN và đồng chuyển nhiễm với vector sgARN-spCas9 có thể cải thiện hiệu quả chỉnh sửa và hầu hết các nhóm gây ra khoảng 10-20% chỉnh sửa gen để tạo ra loại đột biến dự định ở cùng thời điểm (Fig. 4).

Bảng 6: Đồng chuyển nhiễm hỗn hợp của ssODN với vector sgARN-spCas9

Hỗn hợp	Phức chuyển nhiễm	Hỗn hợp	Phức chuyển nhiễm
Hỗn hợp 1	sgARN-1 + ssODN_1	Hỗn hợp 16	sgARN-2 + ssODN_16
Hỗn hợp 2	sgARN-1 + ssODN_2	Hỗn hợp 17	sgARN-2 + ssODN_17
Hỗn hợp 3	sgARN-1 + ssODN_3	Hỗn hợp 18	sgARN-2 + ssODN_18
Hỗn hợp 4	sgARN-1 + ssODN_4	Hỗn hợp 19	sgARN-3 + ssODN_17
Hỗn hợp 5	sgARN-2 + ssODN_5	Hỗn hợp 20	sgARN-3 + ssODN_18
Hỗn hợp 6	sgARN-2 + ssODN_6	Hỗn hợp 21	sgARN-4 + ssODN_17
Hỗn hợp 7	sgARN-2 + ssODN_7	Hỗn hợp 22	sgARN-4 + ssODN_18
Hỗn hợp 8	sgARN-2 + ssODN_8	Hỗn hợp 23	sgARN-5 + ssODN_19
Hỗn hợp 9	sgARN-2 + ssODN_9	Hỗn hợp 24	sgARN-5 + ssODN_20
Hỗn hợp 10	sgARN-2 + ssODN_10	Hỗn hợp 25	sgARN-6 + ssODN_21
Hỗn hợp 11	sgARN-2 +	Hỗn hợp 26	sgARN-7 +

	ssODN_11		ssODN_22
Hỗn hợp 12	sgARN-2 + ssODN_12	Hỗn hợp 27	sgARN-8 + ssODN_23
Hỗn hợp 13	sgARN-2 + ssODN_13	Hỗn hợp 28	sgARN-8 + ssODN_24
Hỗn hợp 14	sgARN-2 + ssODN_14	Hỗn hợp 29	sgARN-8 + ssODN_25
Hỗn hợp 15	sgARN-2 + ssODN_15	Hỗn hợp 30	sgARN-8 + ssODN_26

Ví dụ 3: Đồng chuyển nhiễm của ssODN và vector sgARN-spCas9 vào các tế bào K562 bằng xung điện để chỉnh sửa gen

Chuyển nhiễm plasmid vào tế bào huyền phù sử dụng liposom (hạt mỡ) (ví dụ, chất phản ứng Lipofectamine 2000™) tương đối kém hiệu quả, và chuyển nhiễm tế bào huyền phù là đưa vào bằng xung điện. Vài kết hợp của sgARN và ssODN trong ví dụ 2 được lấy để đưa vào tế bào K562 bằng máy điện di lonza-4D, với quy trình chuyển nhiễm tế bào K562 mà đã được tích hợp sẵn. Các tế bào chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 4 ngày và các tế bào được thu thập để chiết ADN bộ gen. Mảnh gen trình tự khởi đầu HBG2 được khuếch đại bằng PCR để giải trình tự. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm synthego về hiệu quả chỉnh sửa gen, thể hiện rằng xung điện hỗn hợp sgARN-1, sgARN-2, sgARN-5 và ssODN trong K562 có thể đạt được hiệu quả chỉnh sửa gen cao hơn (Fig. 5), mà cao hơn một chút so với trong tế bào 293T. Và loại đột biến dự định được cảm ứng bởi xung điện của ssODN và vector sgARN-spCas9 cũng cao hơn một chút so với trong tế bào 293T.

Ví dụ 4: Đồng chuyển nhiễm của ssODN và protein spCas9/sgARN RNP vào các tế bào K562 bằng xung điện để chỉnh sửa gen hiệu quả

So với hệ CRISPR-Cas biểu hiện plasmid, sự phân phối của hệ CRISPR-Cas ở dạng ribonucleoprotein (RNP) đã được cải thiện để có hiệu quả cao trong chỉnh sửa gen và không dễ để cảm ứng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis).

Protein spCas9 thương mại và sgARN-1, sgARN-2, và sgARN-5 tổng hợp hóa học được sử dụng (các trình tự giống với các sgARN tương ứng trong bảng 4, với đầu cuối được cải biến hóa học) để ủ và đóng gói RNP-1, RNP-2 và RNP-5 trong ống nghiệm, tương ứng. RNP đã được phân phối kết hợp với vài ssODN vào trong tế bào K562 bằng xung điện. Các tế bào được chuyển nhiễm được nuôi cấy trong 4 ngày, và các tế bào được thu thập để chiết AND bộ gen. Mảnh gen trình tự khởi đầu HBG2 đã được khuếch đại bằng PCR để thực hiện giải trình tự. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm synthego đối với hiệu quả chỉnh sửa gen, thể hiện rằng (Fig. 6) so với sự kết hợp không bổ sung ssODN, việc bổ sung ssODN khi cảm ứng RNP trong K562 bằng xung điện đã cải thiện đáng kể toàn bộ hiệu quả chỉnh sửa gen khoảng hai lần (Fig. 6). Trong khi đó, tải nạp ssODN và RNP bằng xung điện có thể cảm ứng tỷ lệ chỉnh sửa gen cao hơn để tạo ra loại đột biến dự định (Fig. 6).

Ví dụ 5: Đưa ssODN và protein spCas9/sgARN RNP vào tế bào gốc/tế bào tiền thân tạo máu người bằng xung điện để chỉnh sửa gen hiệu quả và tăng đáng kể biểu hiện HBG

Sau khi hồi lại, tế bào dương CD34 người có nguồn gốc từ máu ngoại vi đã huy động (mPBSC) được nuôi cấy trong hai ngày trong môi trường mở rộng không huyết thanh StemSpan (SFEM) làm giàu với các xytokin của con người (mỗi SCF, TPO, Flt3L, 100 ng/ml). ssODN và spCas9/sgARN RNP được phân phát vào trong mPBSC bằng chương trình EO-100 được xây dựng trong máy xung điện lonza-4D. Sau khi xung điện, các tế bào được nuôi cấy trong SFEM được làm giàu với các xytokin người (mỗi SCF/TPO/Flt3L, 100 ng/ml) trong một ngày, và cảm ứng để biệt hóa tế bào hồng cầu trong ba giai đoạn. Giai đoạn thứ nhất: nuôi cấy trong môi trường IMDM chứa phụ gia như EPO, SCF, huyết thanh AB người, insulin, transferin, heparin, IL-3, hydrocortison, v.v trong 7 ngày. Vào ngày thứ năm của quá trình biệt hóa được cảm ứng, lấy 2×10^5 tế bào ra để chiết ADN bộ gen, và sau đó mảnh trình tự khởi đầu HBG2 đã được khuếch đại bằng PCR và gửi đi giải trình tự Sanger. Tương tự với các kết quả trong tế bào K562, tải nạp của ssODN và spCas9/sgARN RNP bằng xung điện trong mPBSC dẫn đến việc chỉnh sửa gen hiệu quả, với chỉnh sửa bộ gen dẫn đến 30%

loại đột biến dự định (Fig. 7A-7C).

Các tế bào mPBSC được xung điện và các tế bào mPBSC không được xử lý (đối chứng, NC) được cảm ứng trong 7 ngày ở giai đoạn biệt hóa đầu tiên, và sau đó được nuôi cấy trong môi trường IMDM chứa phụ gia như EPO, SCF, huyết thanh AB người, insulin, transferin, và heparin, v.v. trong 4 ngày, và cuối cùng được nuôi cấy trong môi trường IMDM chứa phụ gia như EPO, huyết thanh AB người, insulin, transferin, và heparin, v.v. trong 7 ngày. Sau 18 ngày cảm ứng biệt hóa, cả mPBSCs được xung điện và mPBSC không được xử lý đã được quan sát màu đỏ sẫm sau khi ly tâm, mà đã chứa lượng lớn tế bào hồng cầu, chỉ ra rằng mPBSC đã chuyển nhiễm bằng xung điện có thể biệt hóa thành hồng cầu bình thường.

Gần cuối quá trình cảm ứng biệt hóa, một số tế bào được lấy để tách chiết mARN và mức độ biểu hiện của HBG mARN được phát hiện bởi PCR định lượng thời gian thực trong phiên mã ngược (RT-qPCR). So với tế bào không chuyển nhiễm (NC), đồng chuyển nhiễm của RNP-2 với ssODN_6, ssODN_13, ssODN_14, ssODN_15 và ssODN_17 đều tăng mức độ biểu hiện HBG mARN (Fig. 8), và việc tăng HBG mARN có thể hơn 3-lần.

Hệ thống phát hiện A1c hemoglobin được glycosylat hóa (VARIANT II TURBO HbA1c kit-2.0) được sử dụng để phát hiện hemoglobin của tế bào hồng cầu được biệt hóa từ tế bào gốc tạo máu với xung điện tải nạp trong nhóm RNP-2 bởi HPLC. Các kết quả đã thể hiện rằng, so với các tế bào không có chỉnh sửa gen, các tế bào đã được bổ sung ssODN để chỉnh sửa gen có mức tăng đáng kể về hàm lượng huyết sắc tố thai nhi (HbF), từ 27% đến 36%, mà có điều biến tăng hơn hai lần so với nhóm đối chứng là 13,3% (Fig. 9).

Các kết quả của các phương án trên thể hiện rằng sáng chế cung cấp phương pháp chỉnh sửa gen để tăng cường sự biểu hiện gen γ -globin khác với các phương pháp hiện có. ssODN đã bộc lộ trong sáng chế để chỉnh sửa gen γ -globin có thể dẫn đường tự tạo thành đột biến dự định ở vị trí định trước trong vùng khởi động của gen HBG1 và HBG2 sau khi chỉnh sửa, nhờ đó tạo ra yếu tố GATA kích hoạt (ví dụ, trình

tự NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR). Yếu tố này đóng vai trò điều biến tích cực sau khi biệt hóa tế bào hồng cầu từ các tế bào đã được chỉnh sửa gen, như tế bào gốc tạo máu, kích hoạt hoặc làm tăng đáng kể sự biểu hiện gen γ -globin. Do đó, sáng chế có giá trị ứng dụng tiềm năng trong liệu pháp gen cho bệnh β -hemoglobin.

Các tính năng kỹ thuật của các phương án được mô tả ở trên có thể được kết hợp ngẫu nhiên. Không phải tất cả các kết hợp có thể có của các tính năng kỹ thuật trong các phương án ở trên đều được mô tả ngắn gọn. Tuy nhiên, miễn là không có mâu thuẫn trong sự kết hợp của các tính năng kỹ thuật này, chúng nên được coi là nằm trong phạm vi mô tả.

Các phương án được đề cập ở trên chỉ đại diện cho một số phương án của sáng chế hiện tại và các mô tả của nó là cụ thể và chi tiết, nhưng không nên được hiểu là giới hạn về phạm vi của sáng chế hiện tại. Cần lưu ý rằng đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, không lệch khỏi khái niệm của sáng chế, các sửa đổi và cải tiến cũng có thể được thực hiện, tất cả đều thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ của sáng chế phải tuân theo các điểm yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kích hoạt sự biểu hiện gen γ -globin, bao gồm các thao tác sau: sản xuất nhân tạo trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR hoặc NAG-N(7-8)-WGATAR trong mạch có nghĩa hoặc mạch đối nghĩa của vùng khởi động của gen γ -globin bằng công nghệ chỉnh sửa gen, tạo ra yếu tố tăng cường bao gồm trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR, trình tự NAG-N(7-8)-WGATAR hoặc trình tự bổ sung ngược chiều của nó trong vùng khởi động của gen γ -globin;

trong đó trình tự bổ sung ngược chiều của WGATAR là YTATCW, trong đó W là T hoặc A, R là A hoặc G, Y là T hoặc C, và N là A, G, C hoặc T;

trong đó phương pháp này sử dụng ssODN bao gồm một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4 đến SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 đến SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 đến SEQ ID NO: 31, và trình tự bổ sung ngược chiều của nó; và

trong đó phương pháp này sử dụng một hoặc nhiều sgARN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 69-SEQ ID NO: 75.

2. Chế phẩm chỉnh sửa gen của vùng khởi động gen γ -globin, bao gồm ssODN và sgARN, trong đó ssODN bao gồm trình tự NTG-N(7-8)-WGATAR,

trong đó trình tự bổ sung ngược chiều của WGATAR là YTATCW, trong đó W là T hoặc A, R là A hoặc G, Y là T hoặc C, và N là A, G, C hoặc T;

trong đó ssODN bao gồm một hoặc nhiều trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4 đến SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 đến SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 đến SEQ ID NO: 31, và trình tự bổ sung ngược chiều của nó; và

trong đó sgARN được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 69-SEQ ID NO: 75

3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó ssODN là trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 40

đến SEQ ID NO: 65, hoặc trình tự bổ sung ngược chiều của nó.

4. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó ssODN được cải biến hóa học, trong đó đầu 5' và/hoặc 3' là các nucleotit được biến đổi phosphorothioat.

5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó chỉnh sửa gen được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống chỉnh sửa chỉnh sửa CRISPR-Cas.

6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó hệ thống chỉnh sửa CRISPR-Cas là hệ thống CRISPR-Cas9 hoặc hệ thống CRISPR-Cas12.

7. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó hệ thống chỉnh sửa CRISPR-Cas là phức ribonucleoprotein cấu tạo từ ARN dẫn đường và protein Cas.

8. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó hệ thống chỉnh sửa CRISPR-Cas là phức ARN cấu tạo từ ARN mã hóa protein Cas và gARN.

9. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó hệ thống chỉnh sửa CRISPR-Cas là plasmid biểu hiện protein Cas và gARN.

10. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó sgARN được tổng hợp hóa học hoặc được phiên mã trong ống nghiệm.

11. Kit kích hoạt gen γ -globin, bao gồm:

(1) chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 10; và

(2) ít nhất một trong số vector biểu hiện protein Cas9 hoặc vector biểu hiện protein Cas12, protein Cas9 hoặc protein Cas12, và mARN tương ứng với protein Cas9 hoặc protein Cas12.

12. Tế bào gốc tạo máu thu được bằng cách chuyển chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 10 vào tế bào gốc tạo máu bằng phương pháp xung điện.

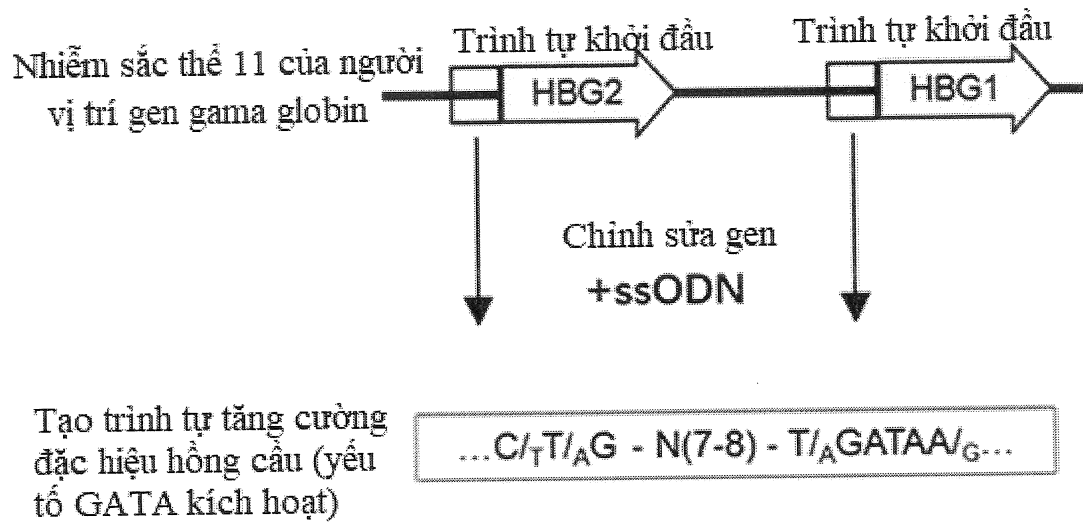
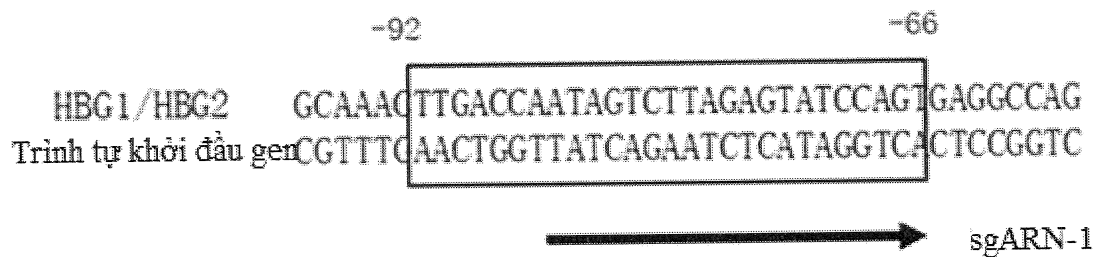
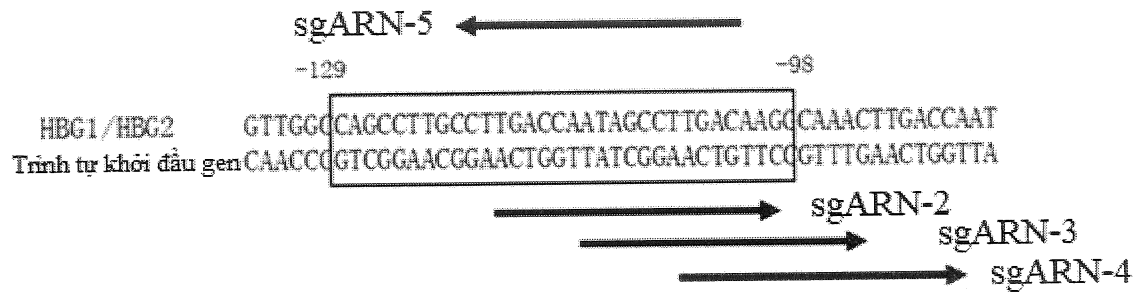


Fig. 1



Loại đại	TTGACCAATAGTCTTAGAGTATCCAGT
Đột biến 1	TTGACCAATAGT <u>G</u> ATAGAGTATCCAGT
Đột biến 2	TTGACCAATAG <u>A</u> GATAGAGTATCCAGT
Đột biến 3	TTGACCAATA <u>A</u> GATAGAGTATCCAGT
Đột biến 4	TTGACCAATA <u>T</u> GATAGAGTATCCAGT

Fig. 2A



Loại đại CAGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 5 CAGCCTTGCCTTGACAGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 6 CAGCCTTGCCTTGACTGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 7 CAGCCTTGCCTTGACAGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 8 CAGCCTTGCCTTGACTGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 9 CAGCCTTGCCTTGAAAGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 10 CAGCCTTGCCTTGAATGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 11 CAGCCTTGCCTTGATAGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 12 CAGCCTTGCCTTGATGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 13 CAGCCTTGCCTTGATAAATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 14 CAGCCTTGCCTTGATAAATAGCCTTGACAAGG

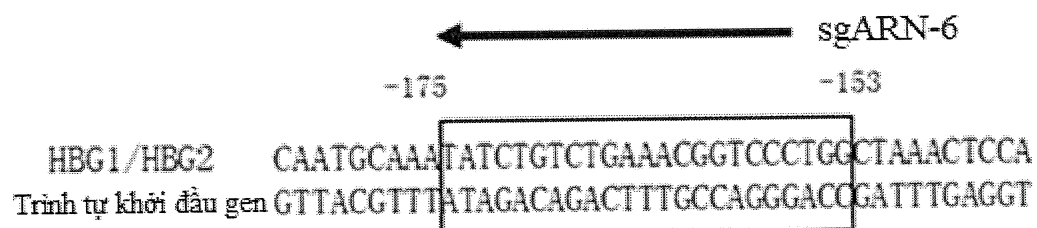
Đột biến 15 CAGCCTTGCCTTGATAATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 16 CAGCCTTGCCTTGATAGCCTTGACAAGG

Đột biến 17 CAGCCTTGCCTTGATAAGG

Đột biến 18 CAGCCTTGCCTTGATAAAGG

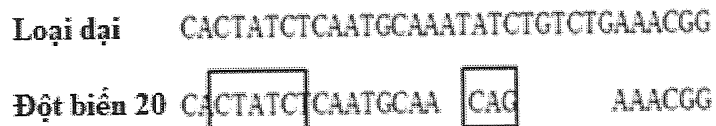
Fig. 2B



Loại đại TATCTGTCTGAAACGGT CCCTGG

Đột biến 19 TATCTGTCTGAAACGGTAGATAACCCTGG

Fig. 2C



sgARN-8 ←
-428/432 -406/410

HBG1/HBG2 AAAACACATTTACAAATCCCTGAACTTTCAAAAATTGGTACATGCTTT
Trình tự khởi đầu gen TTTTGTGTAAAGTGTAGGGACTTGAAAAGTTTTTAACCATGTACGAAA

Đột biến 21	TCCTC <u>GA</u> ACTTTTCAGATAAATTGG
Đột biến 22	TCCTC <u>GA</u> ACTTTTCAGATAAATTGG
Đột biến 23	TCCTC <u>GA</u> ACTTTTCAGATAAATTGG
Đột biến 24	TCCTC <u>GA</u> ACTTTTCAGATAAATTGG

Fig. 2E

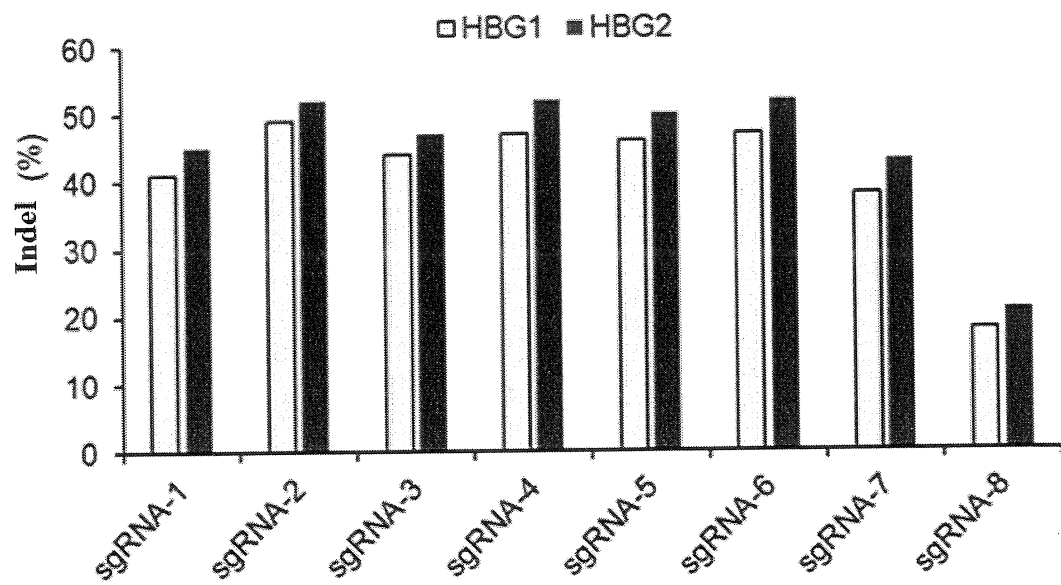


Fig. 3

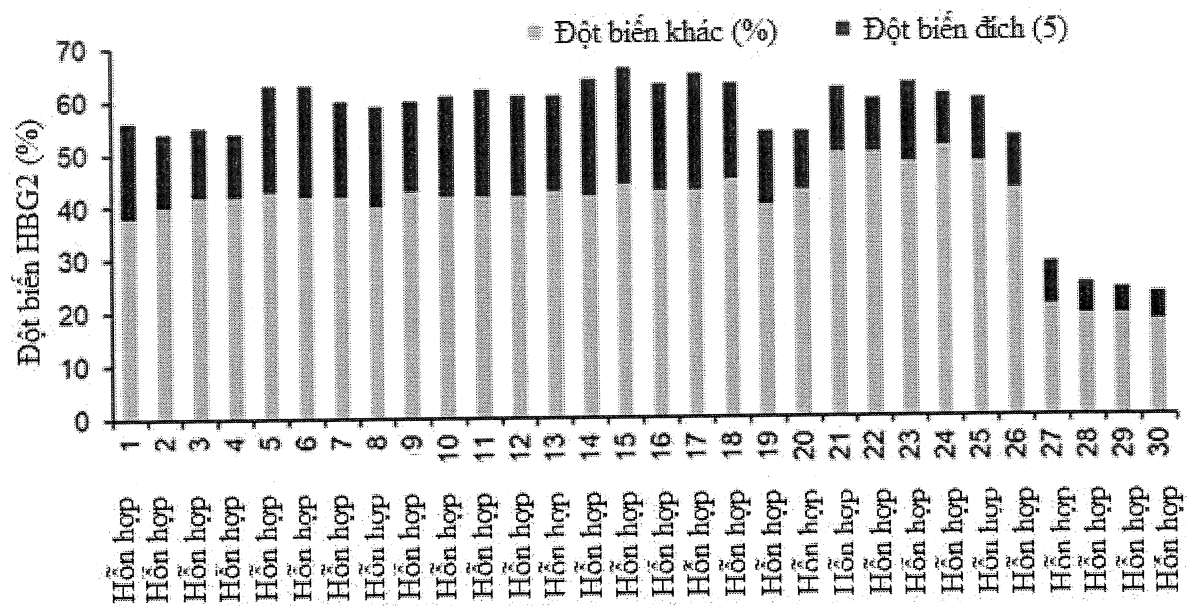


Fig. 4

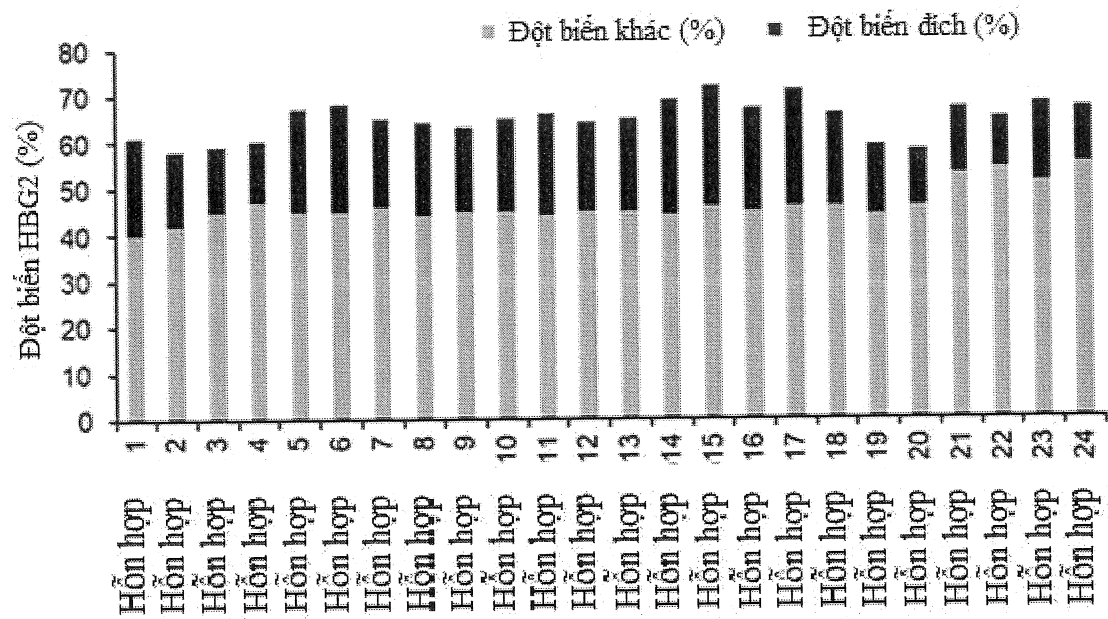


Fig. 5

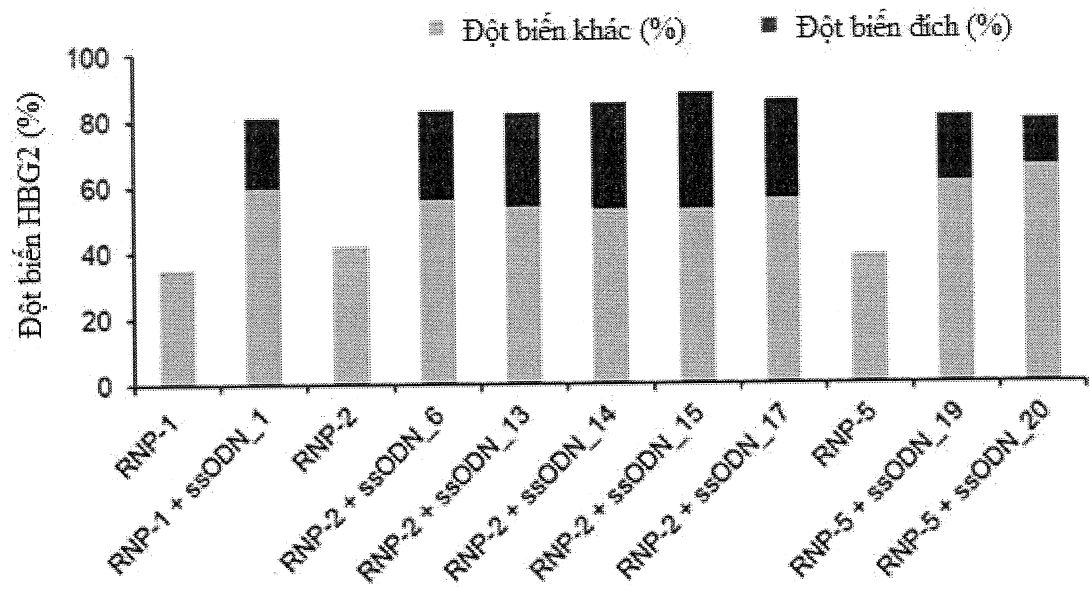


Fig. 6

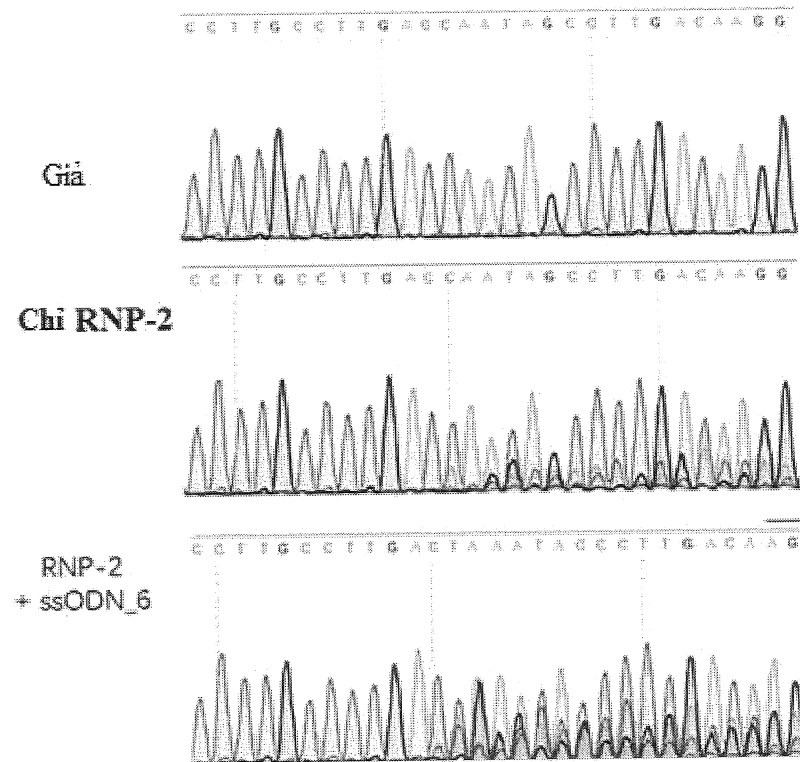


Fig. 7A

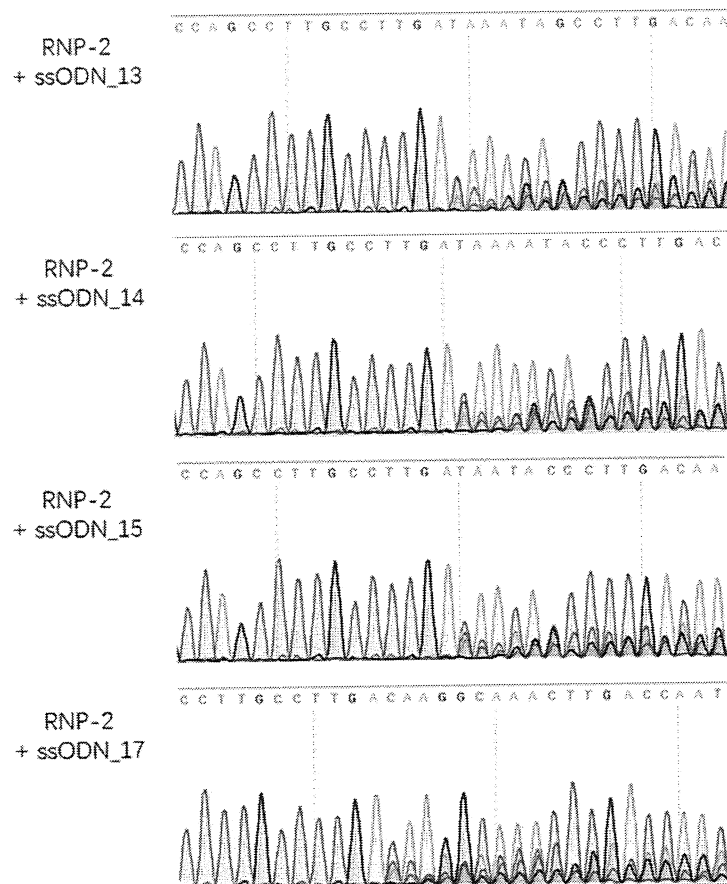


Fig. 7B

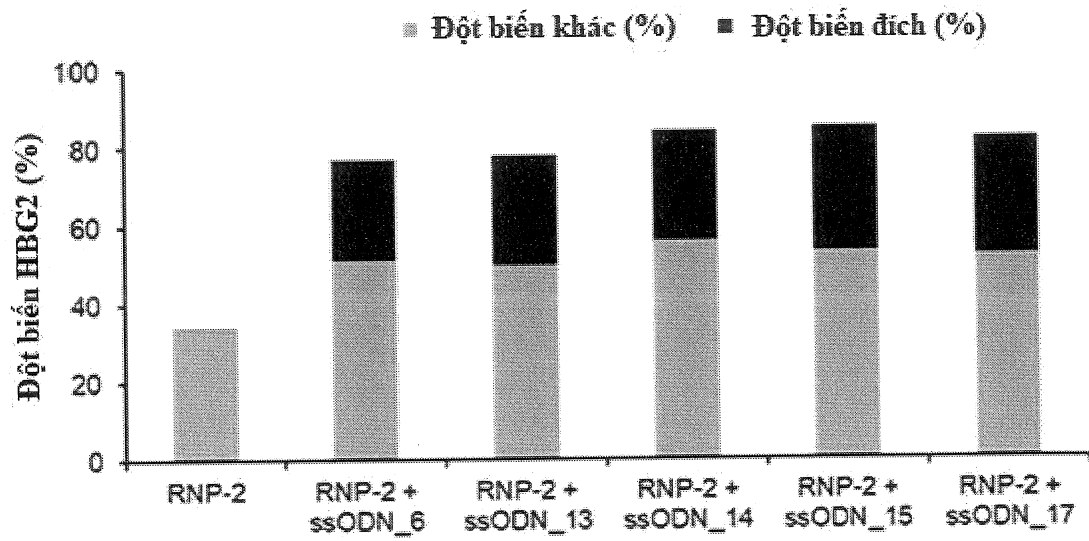


Fig. 7C

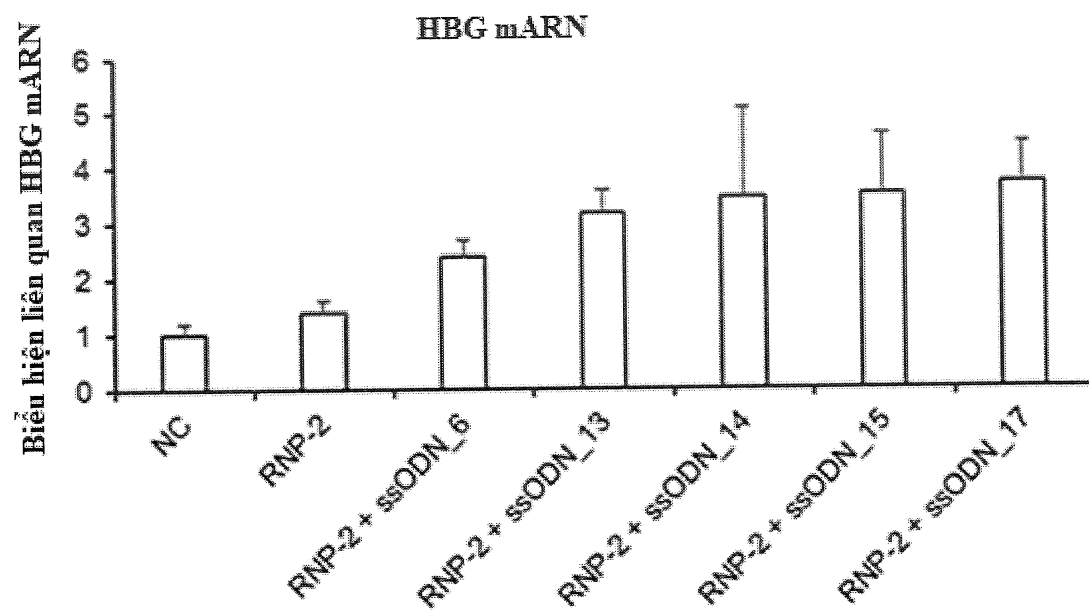


Fig. 8

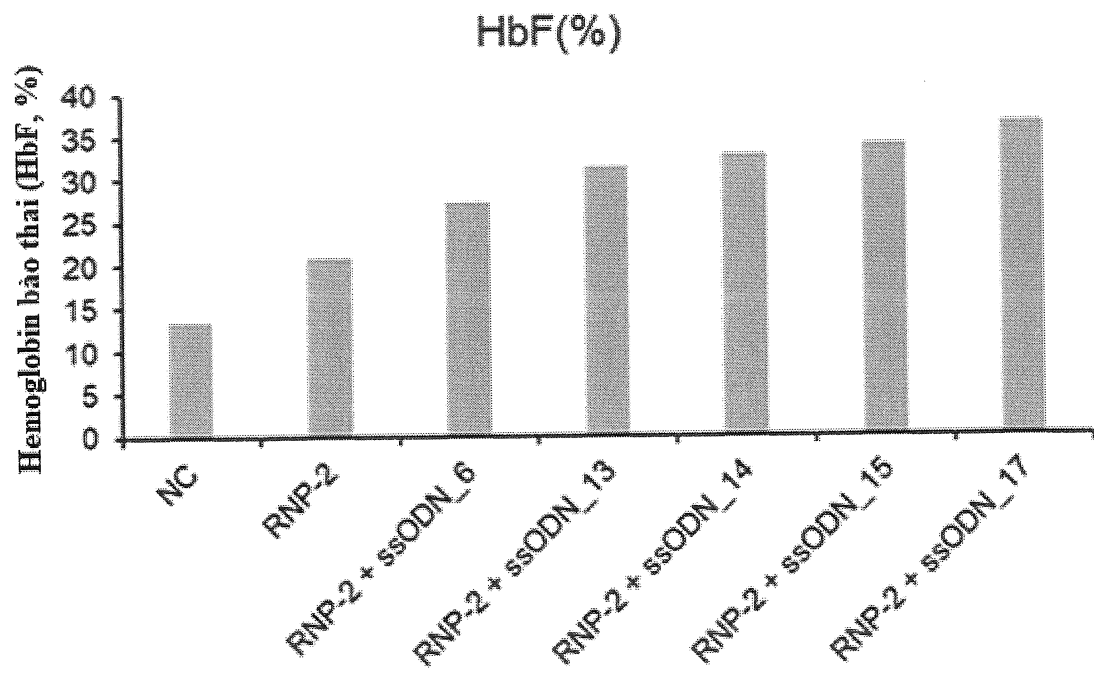


Fig. 9

Danh mục trình tự

<110> GUANGZHOU REFORGENE MEDICINE CO. , LTD.

<120> PHƯƠNG PHÁP KÍCH HOẠT SỰ BIỂU HIỆN GEN γ -GLOBIN, CHẾ PHẨM CHỈNH SỬA GEN, KIT KÍCH HOẠT GEN γ -GLOBIN VÀ TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU

<130> 2020

<160> 79

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1500

<212> ADN

<213> Người

<400> 1

```
tctttctggc cttttagcca tctgtatcaa tgagcagata taagctttac acaggatcat    60
gaaggatgaa agaatttcac caatattata ataatttcaa tcaacctgat agcttagggg    120
ataaactaat ttgaagatac agcttgccctc cgataagcca gaattccaga gcttctggca    180
ttataatcta gcaagggttag agatcatgga tcactttcag agaaaaacaa aaacaaacta    240
accaaaagca aaacagaacc aaaaaaccac cataaatact tctaccctg ttaatgggcc    300
aatatgtcag aaacagcact gtgtagaaa taaagctgtc taaagtacac taatattcga    360
gttataatag tgtgtggact attagtcaat aaaaacaacc ctgcctctt tagagttgtt    420
ttccatgtac acgcacatct tatgtcttag agtaagattc cctgagaagt gaacctagca    480
tttatacaag ataattaatt ctaatccaca gtacctgcca aagaacattc taccatcatc    540
tttactgagc atagaagagc tacgccaaaa ccctgggtca tcagccagca cacacactta    600
tccagtggta aatacacatc atctgggtga tacatacata cctgaatatg gaatcaaata    660
```


ttttctaag atgaaacagt catgatttat ttcaaataagg tacggataag tagatattga 720
 ggtaagcatt aggtcttata ttatgtaaca ctaatctatt actgcgctga aactgtggct 780
 ttatagaaat tgttttact gcactattga gaaattaaga gataatggca aaagtcacaa 840
 agagtatatt caaaaagaag tatagcactt ttctcttaga aaccactgct aactgaaaga 900
 gactaagatt tgtcccgctca aaaatcctgg acctatgcct aaaacacatt tcacaatccc 960
 tgaacttttc aaaaattggt acatgcttta gctttaaact acaggcctca ctggagctag 1020
 agacaagaag gtaaaaaacg gctgacaaaa gaagtcctgg taccctctat gatgggagaa 1080
 ggaaactagc taaagggaag aataaattag agaaaaactg gaatgactga atcggaacaa 1140
 ggcaaaggct ataaaaaaaa ttagcagtat cctcttgggg gcccttccc cacactatct 1200
 caatgcaaat atctgtctga aacggtcctt ggctaaactc cacccatggg ttggccagcc 1260
 ttgccttgac caatagcctt gacaaggcaa acttgaccaa tagtcttaga gtatccagt 1320
 aggccagggg ccggcggctg gctagggatg aagaataaaa ggaagcacc ttacagcagtt 1380
 ccacacactc gcttctggaa cgtctgaggt tatcaataag ctctagtcc agacgccatg 1440
 ggtcatttca cagaggagga caaggctact atcacaagcc tgtggggcaa ggtgaatgtg 1500

<210> 2

<211> 1500

<212> ADN

<213> Người

<400> 2

atctttctgg tcttttagcc gcctaacact ttgagcagat ataagcctta cacaggatta 60
 tgaagtctga aaggattcca ccaatattat tataattcct atcaacctga taggttaggg 120
 gaaggtagag ctctctcca ataagccaga ttccagagt ttctgacgtc ataactacc 180
 aaggctatgg atcgagttca gagaaaaaac aaaagcaaaa ccaaacctac caaaaaataa 240
 aaatcccaaa gaaaaaataa agaaaaaac agcatgaata ctctctgcca tgtaagtgg 300
 ccaatatgtc agaaacagca ctgagttaca gataaagatg tctaaactac agtgacatcc 360
 cagctgtcac agtgtgtgga ctattagtca ataaaacagt ccctgcctct taagagttgt 420
 ttccatgca aatacatgtc ttatgtctta gaataagatt ccctaagaag tgaacctagc 480
 atttatacaa gataattaat tctaattcat agtatctggg aaagagcatt ctaccatcat 540
 ctttaccgag catagaagag ctacacaaa accctgggtc atcagccagc acatacactt 600

atccagtgaat aaatacacat catcgggtgc ctacatacat acctgaatat aaaaaaata 660
 cttttgctga gatgaaacag gcggtgattta ttcaaataag gtacggataa gtagatattg 720
 aagtaaggat tcagtcttat attatattac ataacattaa tctattcctg cactgaaact 780
 gttgctttat aggatttttc actacactaa tgagaactta agagataatg gcctaaaacc 840
 acagagagta tattcaaaga taagtatagc acttcttatt tggaaccaa tgcttactaa 900
 atgagactaa gacgtgtccc atcaaaaatc ctggacctat gcctaaaaca catttcacaa 960
 tcctgaact ttcaaaaat tggtagatgc tttaacttta aactacaggc ctactggag 1020
 ctacagacaa gaagggtgaaa aacggctgac aaaagaagtc ctggtatctt ctatggtggg 1080
 agaagaaaac tagctaaagg gaagaataaa ttagagaaaa attggaatga ctgaatcgga 1140
 acaaggcaaa ggctataaaa aaaattaagc agcagtatcc tctggggggc ccctcccca 1200
 cactatctca atgcaaatat ctgtctgaaa cggtcctgg ctaaactcca ccatgggtt 1260
 ggccagcctt gccttgacca atagccttga caaggcaaac ttgaccaata gtcttagagt 1320
 atccagtgaat gccagggggc ggcggctggc tagggatgaa gaataaaaagg aagcaccctt 1380
 cagcagttcc acacactgc ttctggaacg tctgaggta tcaataagct ctagtccag 1440
 acgcatggg tcatttcaca gaggaggaca aggctactat cacaagcctg tggggcaagg 1500

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

<213> Người

<400> 3

ttgaccaata gtcttagagt atccagt

27

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 4

ttgaccaata gtgatagagt atccagt 27

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 5

ttgaccaata gagatagagt atccagt 27

<210> 6

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 6

ttgaccaata agatagagta tccagt 26

<210> 7

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 7

ttgaccaata tgatagagta tccagt 26

<210> 8

<211> 32

<212> ADN

<213> Người

<400> 8

cagccttgcc ttgaccaata gccttgacaa gg 32

<210> 9

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 9

cagccttgcc ttgacagata gccttgacaa gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 10

cagccttgcc ttgactgata gccttgacaa gg 32

<210> 11

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 11

cagccttgcc ttgagagata gccttgacaa gg 32

<210> 12

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 12

cagccttgcc ttgagtgata gccttgacaa gg

32

<210> 13

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 13

cagccttgcc ttgaaagata gccttgacaa gg

32

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 14

cagccttgcc ttgaatgata gccttgacaa gg

32

<210> 15

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 15

cagccttgcc ttgatagata gccttgacaa gg 32

<210> 16

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 16

cagccttgcc ttgattgata gccttgacaa gg 32

<210> 17

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 17

cagccttgcc ttgataaata gccttgacaa gg 32

<210> 18

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 18

cagccttgcc ttgataaaat agccttgaca agg 33

<210> 19

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 19

cagccttgcc ttgataatag ccttgacaag g 31

<210> 20

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 20

cagccttgcc ttgatagcct tgacaagg 28

<210> 21

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 21

cagccttgcc ttgataagg 19

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 22

cagccttgcc ttgataaagg

20

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 23

tatctgtctg aaacggctcc tgg

23

<210> 24

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 24

tatctgtctg aaacggtaga taaccctgg

29

<210> 25

<211> 33

<212> ADN

<213> Người

<400> 25

cactatctca atgcaaatat ctgtctgaaa cgg

33

<210> 26

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 26

cactatctca atgcaacaga aacgg 25

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 27

tcctgaact ttcaaaaat tgg 23

<210> 28

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 28

tcctgaact ttccagataa ttgg 24

<210> 29

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 29

tcctgaact ttccagataa attgg 25

<210> 30

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 30

tcctgaact ttcagataa aattgg

26

<210> 31

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 31

tcctgaact ttcagatag aattgg

26

<210> 32

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 32

actggatact ctaagactat tgg

23

<210> 33

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 33

cttgtcaagg ctattggtca agg

23

<210> 34

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 34

gtttgccttg tcaaggctat tgg

23

<210> 35

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 35

tggtcaagtt tgccttgca agg

23

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 36

cttgaccaat agccttgaca agg

23

<210> 37

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 37

tatctgtctg aaacgggtccc tgg

23

<210> 38

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 38

atgcaaatat ctgtctgaaa cgg

23

<210> 39

<211> 23

<212> ADN

<213> Người

<400> 39

tcctgaact ttcaaaaat tgg

23

<210> 40

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 40

cctagccagc cgccggcccc tggcctcact ggatactcta tcactattgg tcaagtttgc 60
 cttgtcaagg ctatttgtca aggc 84

<210> 41

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 41

cctagccagc cgccggcccc tggcctcact ggatactcta tctctattgg tcaagtttgc 60
 cttgtcaagg ctatttgtca aggc 84

<210> 42

<211> 83

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 42

cctagccagc cgccggcccc tggcctcact ggatactcta tcttatttgt caagtttgcc 60
 ttgtcaaggc tatttgtcaa ggc 83

<210> 43

<211> 83

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 43

cctagccagc cgccggcccc tggcctcact ggatactcta tcatatttgt caagtttgcc 60

ttgtcaaggc tattgggtcaa ggc

83

<210> 44

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 44

ctctaagact attgggtcaag ttgccttgt caaggctatc tgtcaaggca aggctggcca 60

acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 45

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 45

ctctaagact attgggtcaag ttgccttgt caaggctatc agtcaaggca aggctggcca 60

acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 46

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 46

ctctaagact attgggtcaag ttgccttgt caaggctatc tctcaaggca aggctggcca 60

acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 47

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 47

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatc actcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 48

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 48

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatc ttcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 49

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 49

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatc attcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 50

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 50

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatc tatcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 51

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 51

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatc aatcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 52

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 52

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatt tatcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 53

<211> 83

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 53

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatt ttatcaaggc aaggctggcc 60
aaccatggg tggagttag cca 83

<210> 54

<211> 81

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 54

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatt atcaaggcaa ggctggccaa 60
cccatgggtg gagtttagcc a 81

<210> 55

<211> 78

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 55

ctctaagact attggtcaag ttgccttgt caaggctatc aaggcaaggc tggccaaccc 60
atgggtggag ttagcca 78

<210> 56

<211> 81

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 56

cctcactgga tactctaaga ctattggtca agtttgcctt atcaaggcaa ggctggccaa 60
cccatgggtg gagtttagcc a 81

<210> 57

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 57

cctcactgga tactctaaga ctattggtca agtttgcctt tatcaaggca aggctggcca 60
acccatgggt ggagtttagc ca 82

<210> 58

<211> 81

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 58

tggctaaact ccacccatgg gttggccagc cttgccttga taaggcaaac ttgaccaata 60
gtcttagagt atccagttag g 81

<210> 59

<211> 82

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 59

tggctaaact ccacccatgg gttggccagc cttgccttga taaaggcaaa cttgaccaat 60

agtcttagag tatccagtga gg

82

<210> 60

<211> 86

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 60

tccccacact atctcaatgc aaatatctgt ctgaaacggg agataaccct ggctaaactc 60

cacccatggg ttggccagcc ttgcct 86

<210> 61

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 61

tatctcttg ggggccctt cccacacta tctcaatgca acagaaacgg tcctggcta 61

aactccacc atgggtggc cagc 84

<210> 62

<211> 83

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 62

cctatgccta aaacacattt cacaatccct gaactttca gataattggg acatgcttta 60

actttaaact acaggcctca ctg 83

<210> 63

<211> 84

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 63

cctatgccta aaacacattt cacaatccct gaactttca gataaattgg tacatgctt 60

aactttaaac tacaggcctc actg 84

<210> 64

<211> 85

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 64

cctatgccta aaacacattt cacaatccct gaactttca gataaaattg gtacatgctt 60

taactttaaa ctacaggcct cactg 85

<210> 65

<211> 85

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 65

cctatgccta aaacacattt cacaatccct gaactttca gatagaattg gtacatgctt 60

taactttaaa ctacaggcct cactg 85

<210> 66

<211> 80

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 66

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguaaucaac uugaaaaagu 60
ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 67

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 67

ggactatcat atgcttaccg taac 24

<210> 68

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 68

ggcgggcat ttaccgtaag 24

<210> 69

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 69

acuggauacu cuaagacuaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 70

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 70

cuugucaagg cuaugguca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 71

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 71

guuugccuug ucaaggcuau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 72

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 72

uggucaaguu ugccuuguca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 73

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 73

cuugaccaau agccuugaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 74

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 74

uaucugucug aaacggucce guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 75

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 75

augcaaaauau cugucugaaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 76

<211> 100

<212> ARN

<213> Trình tự nhân tạo

<400> 76

ucccugaacu uuucaaaaau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 77

<211> 22

<212> ADN

<213> Người

<400> 77

tactgcgctg aaactgtggc tt 22

<210> 78

<211> 22

<212> ADN

<213> Người

<400> 78

cttcccaggg ttctcctcc ag 22

<210> 79

<211> 26

<212> ADN

<213> Người

<400> 79

tgcactgaaa ctgttgcttt atagga

26