



(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)



1-0048264

(51)^{2006.01} C12N 15/79; C07K 16/00; C12N 5/10; (13) B
C07K 14/00; C12N 1/15

(21) 1-2019-07339

(22) 02/06/2018

(86) PCT/US2018/035764 02/06/2018

(87) WO 2018/223108 06/12/2018

(30) 62/514,754 02/06/2017 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/02/2020 383A

(73) AMBRX, INC. (US)

10975 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, United States of America

(72) CHEN, Sigeng (CN); LU, Yingchun (CN); TIAN, Feng (CN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA DÒNG TẾ BÀO ĐÃ GIẢM SỰ CHẾT TẾ BÀO THEO
CHƯƠNG TRÌNH ĐỀ KẾT HỢP AXIT AMIN KHÔNG TỰ NHIÊN VÀO
PROTEIN VÀ TẾ BÀO HOẶC DÒNG TẾ BÀO ĐƯỢC PHÂN LẬP ĐƯỢC SẢN
XUẤT THEO PHƯƠNG PHÁP NÀY

(21) 1-2019-07339

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp và chế phẩm để tạo ra dòng tế bào để thúc đẩy sản xuất protein chứa axit amin không tự nhiên bằng cách sử dụng công nghệ xử lý gen.

	(447)	447	460	470	480	490	3'
Bak-CHO-gDNA1 (418)	5	CCAATCTCCA	ACTCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_082_K2_BakI-II (388)		CCAATCTCCA	ACT-----TACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_084_K4_BakI-II (388)		CCAATCTCCA	AC-----ATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_086_K6_BakI-II (107)		CCAACCCCGA	-C--CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_088_K8_BakI-II (108)		CCAACCCCGA	-C--CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_090_K10_BakI-II (106)		CCAACCCCGA	----CA----TTAACCCCGATATTAACCCGAGAT				
YA_092_K12_BakI-II (106)		CCAACCCCGA	-C--CCGTTCTTACGGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_093_K13_BakI-II (110)		CCAACCCCGA	-C--CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_095_K15_BakI-II (103)		CCAACCCCGA	-G--CCGTTCTTACCGCATCTTGGGTCCAGGGGG				
ZA_097_K17_BakI-II (388)		CAAA	TTGTCCATCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_098_K18_BakI-II (388)		CCAATCTCCA	ACTCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_100_K20_BakI-II (96)		CCAACCCCGA	GC--CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_101_K21_BakI-II (97)		CCAACCCCGA	-C--CCG----TCTTGCCTCTTGGGTCAGGTGGA				
ZA_103_K23_BakI-II (104)		CCAACCCCGA	-C--GCGGGATTACAGCATCCTGGGTCACGTGGG				
ZA_105_K25_BakI-II (389)		CCAATCTCCA	ACTCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_106_K26_BakI-II (389)		CCAATCTCCA	ACTCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_108_K28_BakI-II (104)		CCAACCCCGA	-C--CTGGACTTACTGCTCCTAGAGTCCAGTGGC				
ZA_109_K29_BakI-II (373)		CCAATCTCCA	ACTCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_110_K30_BakI-II (104)		CCAACCCCGA	-C--CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_111_K31_BakI-II (98)		CCAACCCCGA	-C--CCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				
ZA_112_K32_BakI-II (387)		CCAATCTCCA	ACTCCCGTTCTTACAGCATCTTGGGTCAGGTGGG				

FIG. 10

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Phần mô tả sáng chế liên quan đến lĩnh vực công nghệ di truyền và sự tạo ra các dòng tế bào để tạo ra các polypeptit chứa axit amin không tự nhiên. Nói chung, sáng chế đề cập đến lĩnh vực tạo ra dòng tế bào, phát triển, và sản xuất các protein và các polypeptit chứa axit amin không tự nhiên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ứng dụng của hệ thống xử lý hướng trực giao về mặt hóa học trong các tế bào có nhân điển hình (EuCODE), (Feng et al., (2013), *A general approach to site-specific antibody drug conjugates*, PNAS 111(5): 1766-1771; Schultz et al., USPN 7,083,970, mỗi tài liệu được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn), là phát minh quan trọng trong việc sản xuất về mặt di truyền các protein mà chứa axit amin không tự nhiên. Trong những năm gần đây, công nghệ này đã phát triển rất nhanh trong lĩnh vực liên hợp thuốc kháng thể (antibody drug conjugation - ADC); (Xem, ví dụ, các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20150018530, 20150141624, 20150152187 và 20150152190), mỗi tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Tuy nhiên, ứng dụng rộng rãi hơn của các protein chứa axit amin không tự nhiên trong công nghiệp đã bị cản trở bởi hiệu suất sản xuất tương đối thấp ở tế bào động vật có vú.

Các quan sát chỉ ra rằng yếu tố chính dường như là góp phần vào hiệu suất sản xuất protein thấp này có thể được gây ra bởi sự chết tế bào theo chương trình do tRNA (ARN vận chuyển) không tải tồn dư trong hệ này. Như đã được biết trong lĩnh vực này, sự chết tế bào theo chương trình có thể được bắt đầu bằng nhiều yếu tố bên trong hoặc bên ngoài khác nhau trong các môi trường tế bào, bao gồm các quy trình sản xuất. Các thử thách khác góp phần làm hiệu suất sản xuất protein thấp là các tác nhân gây áp lực tế bào mà có khả năng hoạt hóa các con đường chết tế bào theo chương trình vốn có khi mở rộng quy trình thiết bị phản ứng sinh học. Do đó, trong công nghiệp, cần có các phương pháp và các chế phẩm cải tiến để thúc đẩy và gia tăng sản xuất protein chứa axit

amin không tự nhiên. Sáng chế hướng đến các nhu cầu này và các nhu cầu khác, như được thể hiện rõ khi xem xét phần bộc lộ dưới đây.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các phương pháp và các chế phẩm để thúc đẩy sản xuất protein chứa axit amin không tự nhiên. Sáng chế còn đề cập đến tế bào và dòng tế bào để thúc đẩy sản xuất protein chứa axit amin không tự nhiên. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra dòng tế bào để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, phương pháp này bao gồm một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để vô hoạt trong tế bào biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm, trong đó tế bào này chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (orthogonal aminoacyl tRNA synthetase: O-RS), và tRNA ức chế trực giao (orthogonal suppressor tRNA: O-tRNA). Theo phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào là có nhân điển hình. Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào được chọn từ COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, hoặc HEK293. Theo một phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào là quần thể tế bào ổn định tạm thời hoặc dòng tế bào dòng vô tính ổn định. Theo phương án khác, tế bào là tế bào phân lập. Tế bào phân lập là để thu protein kết hợp với axit amin không tự nhiên.

Theo phương án khác, sáng chế bao gồm protein hoặc polypeptit kết hợp với axit amin không tự nhiên. Theo các phương án khác, axit amin không tự nhiên được kết hợp một cách đặc hiệu về vị trí. Theo phương án khác, axit amin không tự nhiên là para-axetyl phenylalanin, p-nitrophenylalanin, p-sulfotyrosin, p-carboxyphenylalanin, o-nitrophenylalanin, m-nitrophenylalanin, p-boronyl phenylalanin, o-boronylphenylalanin, m-boronylphenylalanin, p-aminophenylalanin, o-aminophenylalanin, m-aminophenylalanin, p-axylphenylalanin, o-axylphenylalanin, m-axylphenylalanin, p-OMe phenylalanin, o-OMe phenylalanin, m-OMe phenylalanin, p-sulfophenylalanin, o-sulfophenylalanin, m-sulfophenylalanin, 5-nitro His, 3-nitro Tyr, 2-nitro Tyr, Leu được thế nitro, His được thế nitro, De được thế nitro, Trp được thế nitro, 2-nitro Trp, 4-nitro Trp, 5-nitro Trp, 6-nitro Trp, 7-nitro Trp, 3-aminotyrosin, 2-aminotyrosin, O-sulfotyrosin, 2-sulfooxyphenylalanin, 3-sulfooxyphenylalanin, o-carboxyphenylalanin, m-carboxyphenylalanin, p-axetyl-L-phenylalanin, p-propargyl-phenylalanin, O-metyl-L-tyrosin, L-3-(2-naphtyl)alanin, 3-metyl-phenylalanin, O-4-

alyl-L-tyrosin, 4-propyl-L-tyrosin, tri-O-acetyl-GlcNAc β -serin, L-Dopa, phenylalanin được flo hóa, isopropyl-L-phenylalanin, *p*-azido-L-phenylalanin, *p*-axyl-L-phenylalanin, *p*-benzoyl-L-phenylalanin, L-phosphoserin, phosphoserin, phosphonotyrosin, *p*-iodo-phenylalanin, *p*-bromophenylalanin, *p*-amino-L-phenylalanin, isopropyl-L-phenylalanin hoặc *p*-propargyloxy-phenylalanin. Theo một số phương án của sáng chế, axit amin không tự nhiên được chọn từ O-metyl-L-tyrosin, L-3-(2-naphtyl)alanin, 3-metyl-phenylalanin, O-4-allyl-L-tyrosin, 4-propyl-L-tyrosin, *p*-propargyloxy-L-phenylalanin, tri-O-acetyl-GlcNAc β -serin, L-Dopa, phenylalanin được flo hóa, isopropyl-L-phenylalanin, *p*-azido-L-phenylalanin, *p*-axyl-L-phenylalanin, *p*-benzoyl-L-phenylalanin, L-phosphoserin, phosphoserin, phosphonotyrosin, *p*-iodo-phenylalanin, *p*-bromophenylalanin, *p*-amino-L-phenylalanin, hoặc isopropyl-L-phenylalanin.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất gen cần quan tâm hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm. Codon chọn lọc là codon vô nghĩa, codon hiếm, hoặc codon bốn bazơ. Theo phương án khác, codon chọn lọc bao gồm codon ochre, codon opal, hoặc codon amber. Theo các phương án nhất định, codon chọn lọc là codon amber.

Theo các phương án của sáng chế, gen cần quan tâm hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm là gen hoặc sản phẩm trị liệu sinh học bao gồm vacxin, hoặc kháng thể. Gen cần quan tâm hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm là kháng thể, scFv, protein dung hợp scFv, protein dung hợp Fc, Yếu tố VII, Yếu tố VIII, hoặc Yếu tố IV. Theo các phương án khác, gen cần quan tâm hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm là xytokin, interleukin, interferon, chemokin, yếu tố sinh trưởng, hormon, và các thụ thể của chúng, các chất tương đồng, các thể đặc hiệu kép hoặc các mảnh của chúng. Theo phương án khác, gen cần quan tâm là HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptin, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulin, TNFR1, TRAIL, EPO, và các chất tương đồng, các thể đặc hiệu kép hoặc các mảnh của chúng. Theo các phương án khác, gen cần quan tâm hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm được chọn từ nhóm bao gồm: xytokin, yếu tố sinh trưởng, thụ thể yếu tố sinh trưởng, interferon, interleukin, phân tử chống viêm, sản phẩm gen gây ung thư, hormon peptit, phân tử truyền tín hiệu, thụ thể hormon steroid, erythropoietin (EPO), insulin, hormon sinh trưởng của người, Alpha-1 antitrypsin, Angiostatin, yếu tố

chống tan máu (Antihemolytic), kháng thể, Apolipoprotein, Apoprotein, nhân tố lợi tiểu tâm nhĩ (Atrial natriuretic factor), polypeptit lợi tiểu tâm nhĩ (Atrial natriuretic polypeptide), peptit tâm nhĩ (Atrial peptide), chemokin C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, Calcitonin, phối tử c-kit, xytokin, CC chemokin, protein hóa ứng động bạch cầu đơn nhân-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), protein hóa ứng động bạch cầu đơn nhân-2 (Monocyte chemoattractant protein-2), protein hóa ứng động bạch cầu đơn nhân-3 (Monocyte chemoattractant protein-3), protein viêm bạch cầu đơn nhân-1 alpha (Monocyte inflammatory protein-1 alpha), protein viêm bạch cầu đơn nhân-1 beta (Monocyte inflammatory protein-1 beta), RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, phối tử CD40, phối tử C-kit, Collagen, yếu tố kích thích tạo khuẩn lạc (Colony stimulating factor: CSF), yếu tố bổ thể 5a (Complement factor 5a), chất ức chế bổ thể, thụ thể bổ thể 1, xytokin, DHFR, peptit hoạt hóa bạch cầu trung tính biểu mô-78, GRO α /MGSA, GRO β , GRO γ MIP-1 α , MIP-1 δ , MCP-1, yếu tố sinh trưởng biểu bì (Epidermal Growth Factor: EGF), peptit hoạt hóa bạch cầu trung tính biểu bì, Erythropoietin (EPO), độc tố Exfoliating, Yếu tố IX, Yếu tố VII, Yếu tố VIII, Yếu tố X, Yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (Fibroblast Growth Factor: FGF), Fibrinogen, Fibronectin, G-CSF, GM-CSF, Glucocerebrosidaza, Gonadotropin, yếu tố sinh trưởng, thụ thể yếu tố sinh trưởng, protein Hedgehog, Hemoglobin, Yếu tố sinh trưởng tế bào gan (Hepatocyte Growth Factor: HGF), Hirudin, albumin huyết thanh người, ICAM-1, thụ thể ICAM-1, LFA-1, thụ thể LFA-1, Insulin, thụ thể sinh trưởng giống insulin (Insulin-like Growth Factor: IGF), IGF-I, IGF-II, interferon, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , interleukin, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, yếu tố sinh trưởng tế bào sừng (Keratinocyte Growth Factor: KGF), Lactoferrin, yếu tố ức chế bệnh bạch cầu, Luciferaza, Neurturin, yếu tố ức chế bạch cầu trung tính (Neutrophil inhibitory factor: NIF), oncostatin M, protein thuộc mô tạo xương, sản phẩm gen gây ung thư, hormon tuyến cận giáp, PD-ECSF, PDGF, hormon peptit, hormon sinh trưởng ở người, Pleiotropin, Protein A, Protein G, ngoại độc tố sinh nhiệt A, B, hoặc C, Relaxin, Renin, SCF, thụ thể bổ thể hòa tan I, I-CAM hòa tan 1, thụ thể interleukin hòa tan, thụ thể TNF hòa tan, Somatomedin, Somatostatin, Somatotropin, Streptokinaza, Superantigen, Staphylococcal enterotoxin, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, thụ thể hormon steroid, Superoxid dismutaza (SOD), độc tố gây hội chứng sốc nhiễm

độc, Thymosin alpha 1, chất hoạt hóa mô sinh plasmin, yếu tố sinh trưởng khối u (TGF), TGF- α , TGF- β , yếu tố hoại tử khối u, yếu tố hoại tử khối u alpha, yếu tố hoại tử khối u beta, thụ thể yếu tố hoại tử khối u (Tumor necrosis factor receptor: TNFR), protein VLA-4, protein VCAM-1, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF), Urokinaza, Mos, Ras, Raf, Met; p53, Tat, Fos, Myc, Jun, Myb, Rel, thụ thể estrogen, thụ thể progesteron, thụ thể testosterone, thụ thể aldosteron, thụ thể LDL, SCF/c-Kit, CD40L/CD40, VLA-4/VCAM-1, ICAM-1/LFA-1, hyalurin/CD44, và corticosteron.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt, cắt bỏ, phá vỡ hoặc bất hoạt (knockout –KO). Một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt là GS, Bcl-2, IGFBP4, AQP1, Maf1, eRF1, FUT8, P53, Caspase 3, UPF1, Smg1, Smac/DIABLO, Apaf-1, Caspase-6, Caspase-7, Caspase-9, Caspase-10, PARP, Alpha fodrin, NuMA, AIF, CAD, Puma, Noxa, 14-3-3, Aven, Myc, hoặc HtrA2/Omi. Theo một phương án, vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt là gen chỉ thị chọn lọc ngoại lai. Theo phương án khác, gen chỉ thị chọn lọc này là Zeocin, Hygromycin, hoặc Puromycin. Theo phương án khác, vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt là vị trí hoặc vùng Bcl-2. Theo phương án khác, vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt là Bax hoặc Bak. Theo các phương án khác, vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt này được làm vô hoạt một phần hoặc hoàn toàn. Vị trí hoặc vùng được làm vô hoạt, phá vỡ, bất hoạt hoặc cắt bỏ một phần có thể bao gồm vị trí hoặc vùng mà được làm vô hoạt, phá vỡ, bất hoạt hoặc cắt bỏ 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào hoặc dòng tế bào để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, tế bào này biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm, trong đó gen cần quan tâm này bao gồm aminoaxyl tRNA synthetaza trực

giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA); và trong đó tế bào này bao gồm một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào hoặc dòng tế bào để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, chứa aminoaxyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), và trong đó tế bào này bao gồm một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện gen cần quan tâm, gen cần quan tâm này chứa aminoaxyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), trong đó tế bào này bao gồm một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm hoặc giảm bớt sự chết tế bào theo chương trình ở tế bào bao gồm aminoaxyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS) và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), phương pháp này bao gồm việc nhắm đích để làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình (pro-apoptotic) trong tế bào. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào hoặc dòng tế bào để làm giảm hoặc giảm bớt sự chết tế bào theo chương trình ở tế bào hoặc dòng tế bào.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, phương pháp này bao gồm các bước: cung cấp phân tử axit nucleic có khả năng làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt trong tế bào, tế bào này biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm; và đưa phân tử axit nucleic vào tế bào biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm chứa aminoaxyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA). Theo các phương án khác, phân tử axit nucleic này được chọn từ các SEQ ID NO.1 đến 42. Theo phương án khác, phân tử axit nucleic làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt. Theo một phương án khác, một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt là giống hoặc khác nhau.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp hoặc tế bào hoặc dòng tế bào để cải thiện hiệu suất sản xuất protein hoặc polypeptit kết hợp axit amin không tự nhiên. Theo một số phương án, tế bào này là quần thể tế bào ổn định, tạm thời hoặc tế

bào dòng ổn định. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm hoặc giảm bớt sự chết theo chương trình ở tế bào. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để cải thiện hiệu suất sản xuất protein hoặc polypeptit có axit amin không tự nhiên được kết hợp một cách đặc hiệu đối với vị trí.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra dòng tế bào chứa axit amin không tự nhiên, phương pháp này bao gồm: cung cấp dòng tế bào biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA); đưa vào tế bào này phân tử axit nucleic có khả năng làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí đích trong tế bào; và cung cấp axit amin không tự nhiên cho tế bào.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, phương pháp này bao gồm các bước: cung cấp phân tử axit nucleic có khả năng làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt trong tế bào; và đưa phân tử axit nucleic vào tế bào chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA).

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào hoặc dòng tế bào được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm yêu cầu bảo hộ. Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để thu tế bào hoặc dòng tế bào ổn định trong đó dòng tế bào này chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA). Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào ổn định này là tế bào hoặc dòng tế bào nền tảng hoặc tế bào hoặc dòng tế bào sản xuất.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào sản xuất trong đó dòng tế bào này chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA). Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập chứa axit amin không tự nhiên. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào hoặc dòng tế bào trong đó hiệu suất sản xuất protein chứa axit amin không tự nhiên lớn hơn ít nhất là 0,5 lần hoặc nhiều hơn so với trường hợp không có sự vô hoạt một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt trong tế bào.

Theo một phương án của sáng chế, một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý để được đưa vào dòng tế bào. Một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý này có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý này là từ vị trí hoặc vùng đích giống hoặc khác nhau. Theo một số phương án, các phân tử axit nucleic được xử lý này có thể chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý từ các vị trí hoặc vùng đích giống nhau trong tế bào. Theo một số phương án, các phân tử axit nucleic được xử lý có thể gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý từ các vị trí hoặc vùng đích khác nhau.

Theo các phương án khác, polynucleotit nhận diện một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt, cắt bỏ, bất hoạt hoặc phá vỡ trong tế bào có thể bao gồm polynucleotit nhận diện 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều vị trí hoặc vùng.

Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào được đề xuất. Theo các phương án nhất định, dòng tế bào sản xuất ổn định được đề xuất. Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào là tế bào hoặc dòng tế bào có nhân điển hình. Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào có nhân điển hình có thể gồm tế bào bất kỳ trong số, ví dụ, tế bào động vật có vú, tế bào nấm men, tế bào nấm mốc, tế bào thực vật, tế bào côn trùng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Theo một số phương án, tế bào hoặc dòng tế bào có nhân điển hình là tế bào hoặc dòng tế bào động vật có xương sống. Theo một số phương án, tế bào hoặc dòng tế bào có nhân điển hình là tế bào hoặc dòng tế bào của động vật có vú hoặc người. Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào này có thể bao gồm tế bào hoặc dòng tế bào COS, CHO (ví dụ, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, hoặc HEK293 (ví dụ, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào là tế bào hoặc dòng tế bào CHO bao gồm, ví dụ, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV. Theo các phương án khác, tế bào hoặc dòng tế bào là tế bào hoặc dòng tế bào CHO-K1, MDCK hoặc HEK293. Theo các phương án nhất định, tế bào hoặc dòng tế bào là tế bào hoặc dòng tế bào CHO-K1.

Theo các phương án khác, việc tối ưu hóa, hoặc tăng cường, hoặc gia tăng, hoặc cải thiện hiệu suất sản xuất polypeptit hoặc protein chứa axit amin không tự nhiên có thể bao gồm việc tối ưu hóa, hoặc tăng cường, hoặc gia tăng, hoặc cải thiện hiệu suất sản xuất ít nhất 0,5 lần, ít nhất 1 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, ít nhất 4 lần, ít nhất 5 lần, ít nhất 6 lần, ít nhất 7 lần, ít nhất 8 lần, ít nhất 9 lần, hoặc ít nhất 10 hoặc nhiều lần hơn nữa so với trường hợp không có phân tử axit nucleic chứa polynucleotit nhận diện một hoặc nhiều vị trí hoặc vùng được nhắm đích để làm vô hoạt, cắt bỏ, phá vỡ hoặc bất hoạt.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến vacxin được sản xuất theo bất kỳ trong số các phương pháp và các tế bào được bộc lộ ở đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu mới của sáng chế được nêu với đặc trưng trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo. Các dấu hiệu và các ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn dựa vào phần mô tả chi tiết sau đây mà mô tả các phương án minh họa, trong đó các nguyên lý theo sáng chế được sử dụng, và các hình vẽ đi kèm được cung cấp.

FIG.1, các bảng A và B: Chiến lược để sử dụng các dòng tế bào nền tảng trong công nghiệp và trong các công ty được đề sản xuất các protein chứa axit amin không tự nhiên. FIG.1 biểu thị vai trò quan trọng trong việc sử dụng dòng tế bào nền tảng trong công nghiệp (FIG.1A) và trong các công ty dược (FIG.1B).

FIG.2: Quy trình chung để sử dụng dòng tế bào nền tảng trong việc phát triển dòng tế bào năng suất cao.

FIG.3, các bảng A-C: Các chiến lược để tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào năng suất cao. FIG.3 thể hiện sự tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào năng suất cao từ một số khía cạnh như sự kết tủa tế bào đơn phụ thuộc FACS (FIG.3A), sự bất hoạt CRISPR (FIG.3B), và sự tối ưu hóa quy trình phát triển dòng tế bào (FIG.3C).

FIG.4, các bảng A và B: Quan sát sự chết tế bào theo chương trình ở các tế bào từ dòng tế bào nền tảng 4E2. Thử nghiệm Annexin V được sử dụng để đánh giá khả năng sống sót của các tế bào CHO-S (FIG.4A) và dòng tế bào nền tảng 4E2 (FIG.4B) chứa cặp trực giao được kết hợp bằng cách di truyền tRNA/aminoacyl-tRNA synthetase kết hợp *para*-acetoxyl-L-phenylalanine một cách đặc hiệu. Như được thể hiện trên FIG.4,

so với các tế bào CHO-S (khả năng sống sót là 96%), 4E2 biểu hiện sự chết tế bào theo chương trình quá mức (khả năng sống sót là 85%).

FIG.5: Thiết kế CRISPR gRNA (gRNA: ARN dẫn đường) của gen BAX được nhắm đích trong các tế bào CHO. FIG.5 mô tả trình tự ADN hệ gen của gen BAX trong các tế bào CHO trong đó ba trình tự gRNA đã được diễn giải. Trình tự ADN hệ gen của gen BAX, exon 1 và exon 2 được thể hiện trong phần bôi màu xám. Trình tự khác của BAX được thể hiện dưới các ký tự không bôi màu. Các đoạn môi được sử dụng trong PCR và giải trình tự được thể hiện ở phần đầu và phần cuối của trình tự lần lượt làm đoạn môi thuận và đoạn môi nghịch.

FIG.6: Thiết kế CRISPR gRNA của gen BAK được nhắm đích trong các tế bào CHO. FIG.6 biểu thị trình tự ADN hệ gen của gen BAK trong các tế bào CHO trong đó hai trình tự gRNA đã được diễn giải. Trình tự ADN hệ gen của gen BAK, exon 2 và exon 3 được thể hiện trong phần bôi màu xám. Trình tự khác của BAK được thể hiện dưới các ký tự không bôi màu. Các đoạn môi được sử dụng trong PCR và giải trình tự được thể hiện ở phần đầu và phần cuối của trình tự lần lượt làm đoạn môi thuận và đoạn môi nghịch.

FIG.7: Cấu trúc BAX hoặc cấu trúc BAK CRISPR. FIG.7 biểu thị thiết kế của các plasmit CRISPR được sử dụng trong các thử nghiệm bất hoạt BAX hoặc BAK. Vector nucleaza CRISPR Geneart (Geneart CRISPR Nuclease Vector: pGCNV) là vector có bán trên thị trường của Thermo Fisher Scientific, (San Diego, CA). Dạng đầy đủ của plasmit pGCNV được điều chế bằng cách chèn phức kép oligo (oligo-duplex) vào vector pGCNV cắt mở mà chứa chỗ cho phức kép oligo mà được thiết kế với các trình tự gRNA dài 19 nucleotit đặc hiệu để nhắm đích vị trí gen riêng rẽ (xem Bảng 1 dưới đây).

FIG.8: Mô tả các cấu trúc của axit amin không tự nhiên đại diện theo sáng chế.

FIG.9: Thử nghiệm khảo sát các quần thể tế bào biểu hiện kháng HER2 trong đó BAX hoặc BAK đã được làm bất hoạt bằng cách sử dụng CRISPR. FIG.9 biểu thị phân tích thử nghiệm khảo sát hiệu suất bất hoạt trong quá trình bất hoạt BAX hoặc BAK sử dụng CRISPR. Việc giảm dải ở trên và việc xuất hiện các dải mới ở dưới thể hiện hiệu suất có thể định lượng được bằng cách phân tích đo mật độ của hình ảnh quét được bằng phần mềm Image J. Tỷ lệ dải gốc trước và sau khi bất hoạt (knockout: KO) CRISPR

được sử dụng để đo hiệu suất bất hoạt. Hiệu suất bất hoạt đối với BAX và BAK lần lượt là 30% và 70%, dẫn đến hiệu suất bất hoạt kép tính được là khoảng 21%.

FIG.10: Phân tích ADN đối với các dòng tế bào đơn biểu thị kháng HER2 với gen BAX và BAK được bất hoạt bằng cách sử dụng CRISPR. FIG.10 biểu thị kết quả giải trình tự ADN của hai mươi dòng tế bào đơn sau khi bất hoạt BAK bằng cách sử dụng CRISPR. Trình tự ADN trên cùng (Bak-CHO-gDNA1) là trình tự ADN của vùng hệ gen của gen BAK gốc. Chỉ mỗi dòng 'ZA_112_K32_BakI-II' có trình tự giống với gen BAK gốc. Các gen khác được thể hiện trên fig này có các đoạn xóa hoặc đoạn chèn trong trình tự của chúng.

FIG.11: Phân tích thâm tách Western xác nhận sự bất hoạt BAX ở các dòng bất hoạt BAX biểu hiện kháng HER2 sử dụng CRISPR. BAX là protein 21-KD mà được thể hiện dưới dạng dải trong các tế bào L082 mà không có sự bất hoạt gen và biểu hiện protein BAX kiểu dại. Các dòng khác thể hiện sự biểu hiện protein BAX không thể phát hiện được ngoại trừ dòng UBB3 thể hiện sự biểu hiện BAX dư.

FIG.12, các bảng A và B: Phân tích sự chết tế bào theo chương trình đối với các dòng tế bào bất hoạt BAX/BAK biểu hiện kháng HER2. FIG.12 biểu thị kết quả phân tích sự chết tế bào theo chương trình Annexin V của dòng tế bào gốc L082 (FIG.12A) và dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK BB15 (FIG.12B). Như được thể hiện trên bảng này, khả năng sống sót tế bào được cải thiện từ 40% lên 80% sau khi bất hoạt BAX và BAK. Đồng thời, các tế bào chết theo chương trình giảm từ 53% xuống 17%.

FIG.13, các bảng A-D: Thúc đẩy sự sản xuất kháng thể kháng HER2 ở các dòng tế bào bất hoạt BAX/BAK trong môi trường nuôi cấy theo mẻ. FIG.13 biểu thị sự thay đổi hiệu suất sản xuất protein ở các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK. Hiệu suất sản xuất protein được phân tích trong suốt quá trình sản xuất theo mẻ. Mật độ tế bào sống (Viable Cell Density: VCD, FIG.13A). Khả năng sống sót của tế bào (FIG.13B). Trong quá trình sản xuất theo mẻ (ngày 7), dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK đã thể hiện sự gia tăng độ chuẩn từ 150 mg/L lên 270 mg/L (FIG.13C). Năng suất cụ thể (Qp) (FIG.13D).

FIG.14, các bảng A-D: Sự thúc đẩy sản xuất kháng thể kháng HER2 ở dòng các tế bào bất hoạt BAX/BAK trong môi trường nuôi cấy cấp theo mẻ. FIG.14 biểu thị sự

thay đổi hiệu suất sản xuất protein ở các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK. Hiệu suất sản xuất protein được phân tích trong suốt quá trình sản xuất cấp theo mẻ. Mật độ tế bào sống (Viable Cell Density: VCD, FIG.14A). Khả năng sống sót của tế bào (FIG.14B). Trong quá trình sản xuất cấp theo mẻ (ngày 14), dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK thể hiện sự gia tăng độ chuẩn từ 450 mg/L lên 1500 mg/L (FIG.14C). Năng suất cụ thể (Qp) (FIG.14D).

FIG.15: Thử nghiệm khảo sát các quần thể tế bào biểu hiện kháng PSMA trong đó BAX hoặc BAK đã được làm bất hoạt bằng cách sử dụng CRISPR. FIG.15 biểu thị phân tích thử nghiệm khảo sát hiệu suất bất hoạt trong quá trình bất hoạt BAX hoặc BAK sử dụng CRISPR. Tỷ lệ dải gốc trước và sau khi bất hoạt (KO) CRISPR được định lượng bằng cách phân tích đo mật độ hình ảnh quét được bằng phần mềm Image J và được sử dụng để đo hiệu suất bất hoạt. Hiệu suất bất hoạt đối với BAX và BAK lần lượt là 42% và 53%, dẫn đến hiệu suất bất hoạt kép tính được là khoảng 20%.

FIG.16, các bảng A và B: Phân tích thâm tách Western xác nhận sự bất hoạt BAX và BAK trong các dòng biểu hiện kháng PSMA. Sự xác nhận bất hoạt BAX ở các dòng biểu hiện kháng PSMA sử dụng CRISPR (FIG.16A). Sự xác nhận bất hoạt BAK ở các dòng biểu hiện kháng PSMA (FIG.16B). Đối chứng là các tế bào L082 mà biểu hiện protein BAX kiểu dại, dải ở 21-KD và các tế bào BB15 biểu hiện kháng HER2- bất hoạt kép BAX/BAK.

FIG.17: Phân tích sự chết tế bào theo chương trình đối với các dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA bất hoạt BAX/BAK. FIG.17 biểu thị kết quả phân tích sự chết tế bào theo chương trình Annexin V của các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK PSMA-192 và PSMA 719 với khả năng sống sót của tế bào là khoảng 85% so với mức khoảng 35-37% ở các dòng KO (bất hoạt) đơn (PSMA-882) hoặc các dòng không bất hoạt (PSMA-484).

FIG.18, các bảng A-C: Sự thúc đẩy sản xuất kháng thể kháng PSMA ở dòng các tế bào bất hoạt BAX/BAK trong môi trường nuôi cấy cấp theo mẻ. FIG.18 biểu thị sự thay đổi hiệu suất sản xuất protein ở các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK, ví dụ, dòng tế bào PSMA-BBKO-192 được thể hiện. Hiệu suất sản xuất protein được phân tích trong suốt quá trình sản xuất cấp theo mẻ. Mật độ tế bào sống (Viable Cell Density: VCD, FIG.18A). Khả năng sống sót của tế bào (FIG.18B). Trong quá trình sản xuất cấp

theo mẹ (ngày 14), dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK đã thể hiện sự gia tăng độ chuẩn từ 500 mg/L lên 1400 mg/L (FIG.18C).

FIG.19: Thử nghiệm khảo sát các quần thể tế bào biểu hiện kháng CD70 trong đó BAX hoặc BAK đã được làm bất hoạt bằng cách sử dụng CRISPR. FIG.19 biểu thị phân tích thử nghiệm khảo sát hiệu suất bất hoạt trong quá trình bất hoạt BAX hoặc BAK sử dụng CRISPR. Tỷ lệ dải gốc trước và sau khi bất hoạt (KO) CRISPR được định lượng bằng cách phân tích đo mật độ hình ảnh quét được bằng phần mềm Image J và được sử dụng để đo hiệu suất bất hoạt. Hiệu suất bất hoạt đối với BAX và BAK lần lượt là 51% và 23%, dẫn đến hiệu suất bất hoạt kép tính được là khoảng 10%.

FIG.20, các bảng A và B: Phân tích thẩm tách Western sự xác nhận bất hoạt BAX và BAK trong các dòng biểu hiện kháng CD70. Sự xác nhận bất hoạt BAX ở các dòng biểu hiện kháng CD70 (FIG.20A). Sự xác nhận bất hoạt BAK ở các dòng biểu hiện kháng CD70 (FIG.20B). Các tế bào L082 đối chứng biểu hiện protein BAX kiểu dại, dải ở 21-KD, và protein kiểu dại BAK, dải ở 24 KD.

FIG.21: Phân tích sự chết tế bào theo chương trình đối với các dòng tế bào biểu hiện kháng CD70 bất hoạt BAX/BAK. FIG.21 biểu thị kết quả phân tích sự chết tế bào theo chương trình Annexin V của dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK CD70-BBKO-563, ví dụ, với khả năng sống sót của tế bào là 60% so với dòng tế bào gốc CD70-MW-108 có khả năng sống sót của tế bào là 18%. Các tế bào chết theo chương trình giảm từ 80% xuống 40%.

FIG.22, các bảng A-C: Sự thúc đẩy sản xuất kháng thể kháng CD70 ở dòng các tế bào bất hoạt BAX/BAK trong môi trường nuôi cấy cấp theo mẹ. FIG.22 biểu thị biên dạng sản xuất của các dòng tế bào biểu hiện kháng CD70 bất hoạt kép BAX/BAK trong bình lắc và thiết bị phản ứng sinh học kiểu benchtop. Mật độ tế bào sống (Viable Cell Density: VCD, FIG.22A). Khả năng sống sót của tế bào (FIG.22B). Ví dụ, dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK, CD70-BBKO-563, thể hiện độ chuẩn cao là 1000mg/L (FIG.22C).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi mô tả chi tiết sáng chế, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp, hoặc các chế phẩm hoặc các hệ sinh học cụ thể, mà các phương pháp,

hoặc các chế phẩm hoặc các hệ sinh học này có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không dự định để hạn chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít “một” và dạng xác định bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được định nghĩa một cách rõ ràng trong nội dung đó theo cách khác. Do đó, ví dụ, việc nói đến “tế bào” bao gồm kết hợp của hai hoặc nhiều tế bào, và các cách diễn đạt tương tự.

Mặc dù các phương án được ưu tiên của sáng chế đã được thể hiện và được mô tả ở đây nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ thấy rõ ràng là các phương án này được cung cấp chỉ làm ví dụ. Những người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các phương án thay thế và cải biến khác nhau mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Cần hiểu rõ ràng các biến thể khác của các phương án của sáng chế được mô tả ở đây có thể được sử dụng khi thực hành sáng chế. Dự tính rằng các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây xác định phạm vi của sáng chế và các phương pháp và các cấu trúc trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ này và các phương án tương đương của chúng được bao hàm trong các điểm yêu cầu bảo hộ này.

Nếu không được xác định theo cách khác ở đây và dưới đây trong phần còn lại của bản mô tả này, thì tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học mà được sử dụng ở đây là có ý nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan.

Các định nghĩa

Thuật ngữ “axit nucleic”, như được sử dụng ở đây, để chỉ các deoxyribonucleotit, các deoxyribonucleosit, các ribonucleosit hoặc các ribonucleotit và các polyme của chúng dưới dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Chỉ nhằm ví dụ, các axit nucleic và các polyme axit nucleic như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (i) các chất tương tự các nucleotit tự nhiên mà có các tính chất gắn kết tương tự như axit nucleic tham chiếu và được chuyển hóa theo cách tương tự như các nucleotit có trong tự nhiên; (ii) các chất tương tự oligonucleotit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, PNA (axit peptidonucleic), các chất tương tự ADN được sử dụng trong công nghệ đối nghĩa (các phosphorothioat, các phosphoroamidat, và các chất tương tự); (iii) các biến thể được cải biến một cách bảo tồn của nó (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đoạn thể codon

thoái biến) và các trình tự bổ trợ và trình tự được nêu rõ. Ví dụ, các đoạn thể codon thoái biến có thể đạt được bằng cách tạo ra các trình tự trong đó vị trí thứ ba của một hoặc nhiều codon được chọn (hoặc tất cả các codon) được thay thế bằng các gốc bazơ hỗn hợp và/hoặc các gốc deoxyinosin (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); và Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Các thuật ngữ “polypeptit,” “peptit” và “protein” được sử dụng thay thế nhau ở đây để chỉ polyme gồm các gốc axit amin. Nghĩa là, phần mô tả về polypeptit áp dụng như cho phần mô tả peptit và phần mô tả về protein, v.v.. Các thuật ngữ này áp dụng cho các polyme axit amin có trong tự nhiên cũng như các polyme axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là axit amin không tự nhiên. Ngoài ra, các “polypeptit”, “peptit” và “protein” như vậy bao gồm các chuỗi axit amin có độ dài bất kỳ, bao gồm các protein có độ dài đầy đủ, trong đó các gốc axit amin được liên kết với nhau bằng các liên kết peptit cộng hóa trị.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trực giao” đề cập đến phân tử (ví dụ, tRNA trực giao (O-tRNA) và/hoặc aminoaxyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS)) mà thực hiện chức năng với các thành phần nội sinh của tế bào với hiệu suất giảm so với phân tử tương ứng mà là nội sinh đối với tế bào hoặc hệ dịch mã, hoặc không thực hiện được chức năng với các thành phần nội sinh của tế bào. Trong ngữ cảnh của tRNA và aminoaxyl-tRNA synthetaza, trực giao để chỉ sự mất khả năng hoặc hiệu suất giảm, ví dụ, hiệu suất nhỏ hơn 20%, hiệu suất nhỏ hơn 10%, hiệu suất nhỏ hơn 5%, hoặc hiệu suất nhỏ hơn 1%, của tRNA trực giao khi thực hiện chức năng với tRNA synthetaza nội sinh so với tRNA nội sinh khi thực hiện chức năng với tRNA synthetaza nội sinh, hoặc của aminoaxyl-tRNA synthetaza trực giao khi thực hiện chức năng với tRNA nội sinh so với tRNA synthetaza nội sinh khi thực hiện chức năng với tRNA nội sinh. Phân tử trực giao thiếu phân tử bổ trợ nội sinh chức năng trong tế bào. Ví dụ, tRNA trực giao trong tế bào được aminoaxyl hóa bằng RS nội sinh bất kỳ của tế bào với hiệu suất giảm hoặc thậm chí hiệu suất bằng không, khi so với sự aminoaxyl hóa của tRNA nội sinh bằng RS nội sinh. Trong ví dụ khác, RS trực giao aminoaxyl hóa tRNA nội sinh bất kỳ trong tế bào cần quan tâm với hiệu suất giảm hoặc thậm chí hiệu suất bằng không, khi so với sự aminoaxyl hóa của tRNA nội sinh bằng RS nội sinh. Phân tử trực giao thứ hai

có thể được đưa vào tế bào mà thực hiện chức năng với phân tử trực giao thứ nhất. Ví dụ, cặp tRNA/RS trực giao bao gồm các thành phần hỗ trợ được đưa vào mà thực hiện chức năng cùng nhau trong tế bào với hiệu suất (ví dụ, hiệu suất 50%, hiệu suất 60%, hiệu suất 70%, hiệu suất 75%, hiệu suất 80%, hiệu suất 90%, hiệu suất 95%, hoặc hiệu suất 99% hoặc hiệu suất lớn hơn) so với hiệu suất của cặp tRNA/RS nội sinh tương ứng.

Thuật ngữ “codon chọn lọc” để chỉ các codon được nhận diện bằng O-tRNA trong quy trình dịch mã và không được nhận diện bằng tRNA nội sinh. Vòng anticodon O-tRNA nhận diện codon chọn lọc trên mRNA và gắn vào các axit amin của nó, ví dụ, axit amin không tự nhiên, tại vị trí này trong polypeptit. Các codon chọn lọc có thể bao gồm, ví dụ, các codon vô nghĩa, như, các codon kết thúc, ví dụ các codon amber, ochre, và opal; các codon bốn hoặc nhiều bazơ; các codon hiếm; các codon thu được từ các cặp bazơ tự nhiên hoặc không tự nhiên và/hoặc các codon tương tự.

Thuật ngữ “tRNA ức chế” là tRNA mà thay đổi sự đọc ARN thông tin (messenger RNA: mRNA) trong hệ dịch mã nhất định, ví dụ, bằng cách tạo ra cơ chế để kết hợp axit amin vào chuỗi polypeptit đáp lại codon chọn lọc. Ví dụ, tRNA ức chế có thể đọc qua, ví dụ, codon kết thúc, codon bốn bazơ, codon hiếm, và/hoặc dạng tương tự.

Thuật ngữ “hệ dịch mã” để chỉ tập hợp các thành phần mà kết hợp axit amin có trong tự nhiên vào chuỗi polypeptit đang phát triển (protein). Các thành phần của hệ dịch mã có thể bao gồm, ví dụ, các ribosom, tRNA, synthetaza, mRNA, axit amin, và các chất tương tự. Các thành phần theo sáng chế (ví dụ, ORS, OtRNA, axit amin không tự nhiên, v.v.) có thể được bổ sung vào hệ dịch mã in vitro hoặc in vivo, ví dụ, tế bào nhân diễn hình, tế bào động vật có xương sống, ví dụ, tế bào nấm men, tế bào động vật có vú, tế bào thực vật, tế bào tảo, tế bào nấm mốc, tế bào côn trùng, và/hoặc các dạng tương tự.

Thuật ngữ “axit amin” để chỉ các axit amin có trong tự nhiên và các axit amin không tự nhiên, cũng như các chất tương tự axit amin và các giả axit amin mà có chức năng theo cách tương tự với các axit amin có trong tự nhiên. Các axit amin mã hóa tự nhiên là 20 axit amin thông thường (alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histidin, isoleucin, leucine, lysin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin, và valin) và pyrolysin và selenocystein. Các chất tương tự axit amin để chỉ các hợp chất mà có cấu trúc hóa học

cơ bản giống như axit amin có trong tự nhiên, chỉ nhằm mục đích ví dụ, có α -carbon mà được liên kết với hydro, nhóm carboxyl, nhóm amino, và nhóm R. Các chất tương tự như vậy có thể có các nhóm R được biến đổi (ví dụ, norleucin) hoặc có thể có các khung peptit biến đổi trong khi vẫn giữ cấu trúc hóa học cơ sở giống như axit amin có trong tự nhiên. Ví dụ không giới hạn về các chất tương tự axit amin bao gồm homoserin, norleucin, methionin sulfoxit, methionin metyl sulfoni.

Đối với các trình tự axit amin, từng sự thế đoạn, xóa đoạn hoặc thêm đoạn vào trình tự axit nucleic, peptit, polypeptit, hoặc protein mà làm thay đổi, bổ sung hoặc xóa một axit amin tự nhiên và không tự nhiên đơn lẻ hoặc một tỷ lệ phần trăm nhỏ các axit amin tự nhiên và không tự nhiên trong trình tự được mã hóa đều là "biến thể được sửa đổi bảo tồn" trong đó sự thay đổi này dẫn đến sự xóa bỏ axit amin, sự bổ sung axit amin, hoặc sự thay thế axit amin tự nhiên và không tự nhiên bằng axit amin tương tự về hóa học. Các bảng về sự thay thế bảo tồn cung cấp các axit amin tự nhiên tương tự về chức năng đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các biến thể được sửa đổi bảo tồn như vậy là bổ sung và không loại trừ các biến thể đa hình, các chất đồng đẳng giữa các loài, và các alen của các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây.

Các bảng về sự thay thế bảo tồn cung cấp các axit amin tự nhiên tương tự về chức năng đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Tám nhóm sau, mỗi nhóm chứa các axit amin là những sự thay thế bảo tồn cho nhau: 1) Alanin (A), Glycin (G); 2) Axit aspartic (D), Axit glutamic (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (K); 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W); 7) Serin (S), Threonin (T); và 8) Xystein (C), Methionin (M); (xem, ví dụ, Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "axit amin không tự nhiên" để chỉ axit amin mà không phải là một trong số 20 axit amin thông thường hoặc pyrolysin hoặc selenocystein. Các thuật ngữ khác mà có thể được sử dụng đồng nghĩa với thuật ngữ "axit amin không tự nhiên" là "axit amin được mã hóa không tự nhiên", "axit amin không tự nhiên", "axit amin không có trong tự nhiên", và các phiên bản có dấu nổi và không có dấu nổi khác nhau của chúng. Thuật ngữ "axit amin không tự nhiên" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin mà có trong tự nhiên bằng sự biến đổi axit amin được mã hóa tự nhiên (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, 20 axit amin thông

thường hoặc pyrolysine và selenocysteine) nhưng bản thân chúng không kết hợp được vào chuỗi polypeptit phát triển bằng phức hợp dịch mã. Ví dụ về các axit amin có trong tự nhiên mà không được mã hóa một cách tự nhiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, N-acetylglucosaminyl-L-serine, N-acetylglucosaminyl-L-threonine, và O-phosphotyrosine. Ngoài ra, thuật ngữ “axit amin không tự nhiên” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin mà không có trong tự nhiên và có thể thu được bằng cách tổng hợp hoặc có thể thu được bằng cách biến đổi các axit amin không tự nhiên. Lưu ý rằng, các nhóm phản ứng trong các axit amin không tự nhiên không có sẵn từ các nhóm chức có trong 20 axit amin tiêu chuẩn. Do đó, các nhóm phản ứng này có thể được sử dụng để biến đổi các polypeptit một cách đồng nhất hoặc một cách đặc hiệu với một vị trí.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở polypeptit được mã hóa về cơ bản bằng gen globulin miễn dịch hoặc các gen globulin miễn dịch, hoặc các mảnh của chúng, mà gắn kết và nhận diện một cách đặc hiệu chất được phân tích (kháng nguyên). Ví dụ bao gồm kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, và kháng thể chuỗi đơn, và các dạng tương tự. Các mảnh của các globulin miễn dịch, bao gồm các mảnh Fab và các mảnh được sản xuất bởi thư viện biểu hiện, bao gồm dạng biểu hiện thể thực khuẩn, cũng nằm trong thuật ngữ “kháng thể” như được sử dụng ở đây. Xem, ví dụ, Paul, *Fundamental Immunology*, 4th Ed., 1999, Raven Press, New York, đối với cấu trúc và thuật ngữ kháng thể. Mảnh kháng thể đề cập đến dạng bất kỳ của kháng thể khác với dạng có chiều dài đầy đủ. Các mảnh kháng thể ở đây bao gồm các kháng thể mà là các thành phần nhỏ hơn tồn tại trong các kháng thể có chiều dài đầy đủ, và các kháng thể mà đã được xử lý. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fv, Fc, Fab, và (Fab')₂, Fv chuỗi đơn (single chain Fv: scFv), các diabody, triabody, tetrabody, các kháng thể lai chức năng kép, CDR1, CDR2, CDR3, các kết hợp của các CDR, các vùng biến đổi, các vùng khung, các vùng cố định, các chuỗi nặng, các chuỗi nhẹ, và các vùng biến đổi, và các phân tử phi kháng thể khung khác, các kháng thể đặc hiệu kép, và các dạng tương tự (Maynard & Georgiou, 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-76; Hudson, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:395-402). Cấu trúc phụ chức năng khác là Fv chuỗi đơn (scFv), bao gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ của globulin miễn dịch, liên kết cộng hóa trị bằng nhóm liên kết peptit (S-z Hu et al., 1996, *Cancer Research*, 56, 3055-3061). Các

protein nhỏ này (Mr 25.000) thường giữ lại độ đặc hiệu và ái lực đối với kháng nguyên trong polypeptit đơn và có thể cung cấp khối xây dựng thuận tiện cho các phân tử đặc hiệu với kháng nguyên lớn hơn. Trừ khi có quy định cụ thể khác, các phát biểu và các điểm yêu cầu bảo hộ mà sử dụng thuật ngữ “kháng thể” hoặc “các kháng thể” cụ thể sẽ bao gồm cả “mảnh kháng thể” và “các mảnh kháng thể”.

Thuật ngữ “được phân lập”, như được sử dụng ở đây, để chỉ việc tách và loại bỏ tế bào hoặc dòng ra khỏi quần thể tế bào đồng nhất hoặc không đồng nhất. Trong các phương án của sáng chế, thuật ngữ được phân lập bao gồm tế bào được phân lập hoặc đơn lẻ mà thu được từ môi trường nuôi cấy tế bào hoặc quần thể các tế bào. Tế bào hoặc dòng có thể được chọn trên các quần thể tế bào khác hoặc các quần thể dòng khác bằng cách nuôi cấy trong môi trường mà cung cấp một số yếu tố thuận lợi chọn lọc cho tế bào mong muốn hoặc dòng cần quan tâm. Ví dụ, trong môi trường nuôi cấy tế bào thông thường, typ tế bào cụ thể có thể được làm giàu bằng cách bổ sung các yếu tố sinh trưởng và các xytokin đặc hiệu. Điều này có thể bao gồm việc làm giàu quần thể các chuỗi thể hệ tế bào nhất định và các giai đoạn biệt hóa nhất định để đạt được tế bào hoặc dòng mong muốn, sử dụng môi trường chọn lọc mà cho phép các tế bào cụ thể sinh trưởng và ức chế các tế bào khác thông qua các chất kháng sinh hoặc các chất ức chế sinh trưởng đặc hiệu hoặc kết hợp các chiến lược chọn lọc như vậy như đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Ví dụ, môi trường chọn lọc thường được sử dụng để phân lập các tế bào được chuyển nhiễm. Các chất kháng sinh thông thường được sử dụng để chọn lọc tế bào động vật có vú bao gồm bleomycin, puromycin và hygromycin nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này. Thuật ngữ “được phân lập”, như được sử dụng ở đây, còn để chỉ sự phân tách và lấy thành phần cần quan tâm ra khỏi các thành phần không cần quan tâm. Các chất được phân lập có thể ở trạng thái khô hoặc bán khô, hoặc dưới dạng dung dịch, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch nước. Thành phần được phân lập có thể ở trạng thái đồng nhất hoặc thành phần được phân lập có thể là một phần của dược phẩm mà chứa các chất mang được bổ sung và/hoặc tá dược. Độ tinh khiết và độ đồng nhất có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật hóa phân tích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điện chuyển gel polyacrylamit hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao. Ngoài ra, nếu thành phần cần quan tâm được phân lập và là các loài nổi bật có trong chế phẩm, thì thành phần được mô tả ở đây là về cơ bản là được

tinh chế. Thuật ngữ “được tinh chế”, như được sử dụng ở đây, có thể đề cập đến thành phần cần quan tâm mà có độ tinh khiết ít nhất là 85%, độ tinh khiết ít nhất là 90%, độ tinh khiết ít nhất 95%, độ tinh khiết ít nhất là 99% hoặc độ tinh khiết lớn hơn. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, các axit nucleic, các polypeptit hoặc các protein được “phân lập” khi các axit nucleic, các polypeptit hoặc các protein như vậy không có ít nhất là một số các thành phần tế bào mà nó kết hợp trong trạng thái tự nhiên, hoặc axit nucleic, polypeptit, hoặc protein đã được cô đặc đến mức độ lớn hơn nồng độ sản xuất của nó in vivo hoặc in vitro. Tương tự, bằng cách ví dụ, gen được phân lập khi được phân tách ra khỏi các khung đọc mở mà chặn gen và mã hóa polypeptit hoặc protein khác với gen cần quan tâm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “nhân điển hình” để chỉ các sinh vật thuộc giới sinh vật nhân điển hình, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật có vú, côn trùng, bò sát, chim, v.v.), trùng lông, thực vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực vật một lá mầm, thực vật hai lá mầm, và tảo), nấm mốc, nấm men, trùng roi, trùng microsporidia, và sinh vật nguyên sinh. Thuật ngữ “có xương sống” và “nhân điển hình” có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này.

Các phương án của sáng chế cung cấp dòng tế bào nền tảng được tạo ra từ CHOK1 để biểu hiện một cách ổn định cặp tRNA ức chế trực giao/aminoacyl-tRNA synthetaza để kết hợp hiệu quả axit amin không tự nhiên, được cung cấp trong môi trường nuôi cấy, vào các protein trong các tế bào CHO (xem, ví dụ, Tian F, et al., 2014). Các dòng tế bào sản xuất có thể được tạo ra để sản xuất các protein kết hợp axit amin không tự nhiên bằng cách chuyển nhiễm codon vô nghĩa amber chứa gen cần quan tâm trong hệ biểu hiện GS (glutamin synthetaza) vào vật chủ dòng tế bào nền tảng. Hệ biểu hiện GS sử dụng glutamin synthetaza làm gen chỉ thị chọn lọc để chọn lọc sự hợp nhất ổn định gen sản phẩm được liên kết vào hệ gen của tế bào vật chủ trong quá trình phát triển dòng tế bào ổn định để tạo ra dòng tế bào sản xuất. Dòng tế bào nền tảng này đã được mô tả đặc trưng rõ và được phát triển với hiệu suất kết hợp axit amin không tự nhiên được cải thiện và hiệu suất chọn lọc dòng được cải thiện. Dòng tế bào nền tảng này đã được làm thích nghi trước với sự sinh trưởng trong huyền phù để phát triển nhanh trong các thiết bị phản ứng sinh học.

Từ triển vọng trong công nghiệp, dòng tế bào nền tảng có thể được sử dụng để cung cấp vật liệu thích hợp với giai đoạn để hỗ trợ tất cả các giai đoạn của việc phát triển thuốc, và còn tạo ra (các) dòng tế bào sản xuất được đặc trưng rõ, ổn định trước khi đưa sản phẩm vào quá trình lâm sàng và thương mại hóa. Do đó, ở các công ty dược, dòng tế bào và nhóm môi trường nuôi cấy tế bào là có tham gia chặt chẽ vào các hoạt động chức năng chéo. Ví dụ, đội ngũ khám phá nhận diện các đích và tạo ra các phân tử ứng viên. Sự chuyển nhiệm tạm thời và sự tạo ra lô ổn định trong vật chủ dòng tế bào nền tảng được thực hiện để đánh giá sự biểu hiện của các phân tử ứng viên và tạo ra vật liệu cho các nghiên cứu phát triển (tinh chế, liên hợp và phát triển phương pháp phân tích) và thử nghiệm chức năng để nhận diện phân tử dẫn đầu. Khi phân tử dẫn đầu được chọn, sau đó dòng tế bào ổn định được tạo ra để sản xuất sản phẩm hiệu suất cao với thuộc tính chất lượng mong muốn. Việc chọn dòng đứng đầu bao gồm dòng tế bào, phát triển quy trình và các chức năng phân tích để nhận diện dòng tế bào sản xuất được đặc trưng rõ có thể mở rộng quy mô để sản xuất theo tiêu chuẩn công nghiệp để hỗ trợ thử nghiệm lâm sàng và thương mại hóa. Việc phát triển quy trình nuôi cấy tế bào bắt đầu bằng sự tạo ra dòng tế bào và chọn lọc dòng tế bào, sau đó là sự tối ưu hóa quy trình và môi trường nuôi cấy ở các hệ thống quy mô nhỏ, bao gồm các đĩa 96 lỗ, các bình lắc và các thiết bị phản ứng quy mô nhỏ, nhằm mục đích sàng lọc công suất cao. Khi các điều kiện đã được xác định, quy trình thường được chuyển sang quy mô thí điểm để kiểm tra khả năng mở rộng và sản xuất nguyên liệu cho các thử nghiệm độc tính tiền lâm sàng, sau đó việc sản xuất quy mô lớn để sản xuất nguyên liệu lâm sàng theo quy định thực hành sản xuất tốt hiện hành (cGMP). Khi sự phát triển quy trình nuôi cấy tế bào thương mại để sản xuất sản phẩm sinh học được hoàn thành ở quy mô phòng thí nghiệm và quy mô thí điểm, quy trình thương mại hóa bắt đầu với sự mô tả đặc trưng quy trình, mở rộng quy mô, chuyển giao công nghệ, và phê chuẩn quy trình sản xuất. Hầu hết các phương pháp phát triển dòng tế bào, và sự sản xuất và phát triển quy trình nuôi cấy tế bào như vậy, hoặc các quy trình khác như vậy là đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Weishou Hu, et al., Cell Culture Process Engineering (2013).

Theo sáng chế, chiến lược phát triển dòng tế bào ổn định đã được thực hiện để thu được dòng tế bào sản xuất với 5-10 PCD trong 3-4 tháng và 20-30 PCD trong 6 tháng bằng cách sử dụng dòng tế bào nền tảng làm các tế bào gốc. Cũng xem phần ví dụ

thực hiện sáng chế ở đây. Các dòng tế bào sản xuất được cho qua thử nghiệm độ ổn định trong ít nhất 8 tuần tạo ra quy mô sản xuất với thiết bị phản ứng sinh học 12.000L. Dòng được sử dụng cho ngân hàng tế bào đầu dòng (master cell bank: MCB) được chọn dựa trên sự sinh trưởng, năng suất và chất lượng sản phẩm. Việc xử lý dòng tế bào tiếp nữa bằng cách sử dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cas9 ở dòng tế bào sản xuất có hiệu suất 0,5g/L hoặc 500 mg/L đã chứng minh là cải thiện sự sinh trưởng tế bào và gia tăng độ chuẩn thể tích lên đến 1,5g/L hoặc 1500 mg/L. Quy trình cấp theo mẻ được phát triển đối với dòng tế bào sản xuất đã chứng minh khả năng mở rộng quy mô ở mức quy mô thiết bị phản ứng sinh học đơn ứng dụng (single use bioreactor: SUB) có dung tích 2000L để điều chế nguyên liệu lâm sàng. Do đó, theo các phương án khác, sáng chế đề xuất việc tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào năng suất cao. Việc tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào năng suất cao như vậy có thể đạt được bằng các phương pháp và các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự kết tủa tế bào đơn phụ thuộc FACS, quy trình bất hoạt CRISPR, và tăng quy mô sản xuất.

Phương pháp và kỹ thuật

Sáng chế áp dụng một số kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực sinh học phân tử, nuôi cấy tế bào, hóa sinh, và các lĩnh vực tương tự, đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các phương pháp và các kỹ thuật để phát triển dòng tế bào, sản xuất và phát triển quy trình nuôi cấy tế bào, đã được mô tả rõ trong, ví dụ, Weishou Hu, et al., Cell Culture Process Engineering (2013). Các văn bản chung mà mô tả các kỹ thuật sinh học phân tử bao gồm Berger và Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (“Sambrook”) và Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, liên doanh giữa Greene Publishing Associates, Inc. và John Wiley & Sons, Inc., (được bổ sung qua 1999) (“Ausubel”). Các văn bản này mô tả việc sử dụng các vectơ, các đoạn khởi đầu và nhiều chủ đề có liên quan khác đề cập đến, ví dụ, sự tạo ra các gen mà chứa các codon chọn lọc để sản xuất các protein chứa các axit amin không tự nhiên, các tRNA trực giao, synthetaza trực giao, và cặp chất này.

Các quy trình khác có thể được thấy trong các công bố và các tài liệu tham chiếu dưới đây được nêu trong: Ling et al., *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, Anal Biochem. 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, Methods Mol. Biol. 57:369-374 (1996); Smith, *In vitro mutagenesis*, Ann. Rev. Genet. 19:423-462(1985); Botstein & Shortle, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis*, Science 229:1193-1201(1985); Carter, *Site-directed mutagenesis*, Biochem. J. 237:1-7 (1986); Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, trong Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. và Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin)) (1987); Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, Methods in Enzymol. 154, 367-382 (1987); Bass et al., *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, Science 242:240-245 (1988); Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, Nucleic Acids Res. 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, Methods in Enzymol. 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, Methods in Enzymol. 154:329-350 (1987); Taylor et al., *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*, Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., *Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, Nucl. Acids Res. 16:791-802 (1988); Sayers et al., *Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide*, (1988) Nucl. Acids Res. 16: 803-814; Kramer et al., *The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-*

directed mutation construction, Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, Methods in Enzymol. 154:350-367 (1987); Kramer et al., *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, Nucl. Acids Res. 16: 7207 (1988); Fritz et al., *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., *Point Mismatch Repair*, Cell 38:879-887 (1984); Carter et al., *Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors*, Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443 (1985); Carter, *Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors*, Methods in Enzymol. 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, *Use of oligonucleotides to generate large deletions*, Nucl. Acids Res. 14: 5115 (1986); Wells et al., *Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., *Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein*, Science 223: 1299-1301 (1984); Sakamar và Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., *Catxet mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, Gene 34:315-323 (1985); Grundström et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181 (1986); Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Sieber, et al., Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001). W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); và, I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995). Các chi tiết bổ sung về nhiều phương pháp nêu trên có thể được phát hiện trong Methods in Enzymology Volume 154, tài liệu này cũng mô tả việc kiểm soát hữu dụng đối với các sự cố bằng các phương pháp đột biến khác nhau.

Nhiều kỹ thuật và phương pháp để tinh chế và phát hiện các polypeptit và các protein theo sáng chế đã được biết đến trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật và các phương

pháp này có thể được áp dụng cho việc phát hiện và tinh chế các protein chứa các axit amin không tự nhiên như được lưu ý ở đây. Nói chung, các kháng thể là các chất phản ứng hữu dụng đối với các phương pháp ELISA, thẩm tách Western, hóa miễn dịch, sắc ký ái lực, cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance: SPR), Annexin V, FACS và nhiều phương pháp khác. Các tài liệu viện dẫn ở đây cung cấp chi tiết về việc làm thế nào để thực hiện các thử nghiệm ELISA, thẩm tách Western, SPR và các phương pháp tương tự. Các kỹ thuật và các phương pháp khác theo sáng chế có thể bao gồm phổ khối nguyên vẹn (MS) và sắc ký loại trừ theo kích thước (size exclusion chromatography: SEC). Phổ khối nguyên vẹn cung cấp thông tin về khối lượng chính xác của protein và độ giàu tương đối của các chất đồng dạng của nó. Sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC), cũng được biết trong lĩnh vực này là sắc ký rây phân tử, là phương pháp sắc ký trong đó các phân tử trong dung dịch được phân tách bằng kích thước của chúng, và trong một số trường hợp bằng khối lượng phân tử của chúng.

Công nghệ chỉnh sửa hệ gen

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các polynucleotit để làm vô hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc bất hoạt vị trí hoặc vùng đích trong tế bào bằng cách sử dụng công cụ chỉnh sửa gen. Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “đích”, “đích để”, “được nhắm đích” hoặc “được nhắm đích để” bất hoạt, cắt bỏ, vô hoạt hoặc phá vỡ để chỉ vị trí hoặc vùng trong tế bào hoặc gen mà được cắt bỏ, vô hoạt, phá vỡ, hoặc làm bất hoạt. Một số công cụ chỉnh sửa gen có thể được sử dụng để biến đổi một cách chính xác gen bằng cách gây ra sự phá vỡ chuỗi kép ADN nhắm đích (DNA double-strand breaks: DSBs). Các công cụ chỉnh sửa gen, đã được biết rõ trong lĩnh vực này, có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nucleaza ngón tay kẽm (zinc-finger nucleases: ZFNs), nucleaza tác động giống chất kích hoạt phiên mã (transcription activator-like effector nucleases: TALENs), và các meganucleaza (meganucleases: MNs) còn được biết trong lĩnh vực này như là endonucleaza tìm nhà (homing endonuclease: HEs) (Gaj et al, 2013; Guha et al, 2017), và cụm đoạn lặp xuôi ngược ngắn phân cách đều (clustered regularly interspaced short palindromic repeats: CRISPR). Theo các khía cạnh của sáng chế, các công cụ chỉnh sửa gen được sử dụng để thiết kế các cấu trúc để nhận diện các vị trí hoặc các vùng đích trong tế bào biểu hiện gen cần quan tâm hoặc tế bào sản xuất, và tạo ra các điểm phá vỡ sợi kép trong gen đích sau khi chuyển nhiễm.

ZFNs là các protein dung hợp nhân tạo của miền gắn kết ADN ngón tay-kẽm và miền phân cắt ADN không đặc hiệu từ endonucleaza giới hạn FokI. Miền ngón tay-kẽm có thể được xử lý để có thể nhận diện các trình tự ADN đặc hiệu sao cho sự chỉnh sửa gen có thể đạt được. TALENs cũng là các protein dung hợp nhân tạo mà bao gồm miền gắn kết ADN từ các protein TALE và miền phân cắt ADN không đặc hiệu từ endonucleaza giới hạn FokI. TALEs (Transcription Activator-Like Effectors) là các protein từ vi khuẩn *Xanthomonas* và miền gắn kết ADN của nó có thể được xử lý để gắn kết với các trình tự ADN đặc hiệu. Tương tự như ZFNs, TALENs có thể gây ra DSBs nhờ đó sự vô hoạt gen có thể đạt được. MNs, còn được biết trong lĩnh vực này là các endonucleaza tìm nhà (homing endonucleases) là các endonucleaza mà có tính đặc hiệu vị trí cao trong việc tạo ra các ADN sợi kép. MNs có vị trí nhận diện đặc hiệu vị trí lớn mà có thể nhận diện 18-44 cặp bazơ của ADN. Trong số các thành viên trong họ MNs, LAGLIDADG được nghiên cứu và xử lý chuyên sâu nhất trong các ứng dụng chỉnh sửa hệ gen. Công nghệ CRISPR là công nghệ chỉnh sửa hệ gen mới, sử dụng nucleaza được dẫn hướng bởi ARN (Cas9 là nucleaza typ II được sử dụng rộng rãi nhất) để tạo thành các điểm phá vỡ sợi kép ADN (DSBs). Trong quá trình tự sửa chữa của các DSBs đích trong tế bào, sự xóa và chèn nucleotit thường diễn ra và dẫn đến sự chuyển dịch khung của các trình tự hệ gen tương ứng của vùng mã hóa các protein đích và cuối cùng là dẫn đến sự mất chức năng của chúng. Mặc dù CRISPR ban đầu được phát hiện như là hệ miễn dịch của các tế bào chưa có nhân điển hình trong việc phòng thủ chống lại sự xâm lấn của virus, nhưng ứng dụng của nó trong các tế bào có nhân điển hình để làm công cụ chỉnh sửa hệ gen đã được phát triển thành công (Xem ví dụ, Cong, et al, 2013; Hsu, et al, 2014; Jinek, et al., 2012; Ran, et al., 2013). So với các công nghệ chỉnh sửa hệ gen khác như các nucleaza ngón tay kẽm (ZFNs) và các nucleaza tác động giống chất kích hoạt phiên mã (TALENs), và các meganucleaza (MNs) mà sử dụng miền gắn kết ADN đặc hiệu để gây ra sự tạo thành DSBs (ví dụ, USPN 8,597,912), công nghệ CRISPR xúc tác sự phá vỡ các ADN với sự giúp đỡ của các ARN dẫn hướng (gRNAs) mà sử dụng việc ghép cặp bazơ Watson-Crick cho các trình tự ADN đặc hiệu.

Mặc dù công cụ chỉnh sửa gen bất kỳ được mô tả ở đây có thể được sử dụng theo sáng chế, nhưng công nghệ CRISPR được lấy làm ví dụ vì nó cung cấp công nghệ có tính đặc hiệu cao, hiệu quả hơn mà có thể áp dụng trong rất nhiều tế bào và sinh vật

(Hsu, et al, 2014). Như được minh họa trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế ở đây, gRNA nhắm đích các vị trí hoặc các vùng để bất hoạt, cắt bỏ, làm vô hoạt hoặc phá vỡ trong tế bào biểu hiện gen cần quan tâm có thể được thiết kế bằng cách sử dụng công cụ thiết kế gRNA CRISPR trực tuyến đặc hiệu đối với hệ gen CHO-K1 (xem trên website www.staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy/). Ví dụ về các vị trí hoặc các vùng nhắm đích gen mà có thể được làm bất hoạt, cắt bỏ, làm vô hoạt hoặc phá vỡ ở gen cần quan tâm được cung cấp trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Các trình tự gRNA được sử dụng trong các cấu trúc CRISPR

SEQ ID NO.	Tên gen	trình tự gRNA	Locut hệ gen
1	vị trí BAX -I	AGGCACTCGCTCAACTTCT	Exon 2
2	vị trí BAX-II	TGAGTGTGACCGGCTGTTG	Exon 1
3	vị trí BAX-III	TTTCATCCAGTATCGAGCT	Exon 2
4	BAK-I	GAACAAATTGTCCATCTCG	Exon 2
5	BAK-II	ATGCTGTAGAACGGGAGT	Exon 3
6	BAK-III	GAAGCCGGTCAAACCACGT	Exon 3
7	UPF1-I	TCATGGATTGGCCAGTAAC	Exon 3
8	UPF1-II	CCACTGGGCGAGACGGTGC	Exon 4
9	UPF1-III	GAAGCACCGGTCCTGGATC	Exon 5
10	Smg1-I	AGCTCTGTAGGTGGCGCAC	Exon 6
11	Smg1-II	TGACATATGCCTCGGTAAT	Exon 10
12	Smg1-III	TAATCGGTGGACCCCGAAT	Exon 10
13	GS-I	AACAGGAGTATACTCTCTTG	Exon 1
14	GS-II	CGCCAGACAAAGCCTATCGCA	Exon 1
15	GS-III	AGCCTACGATCCCAAGGGGG	Exon 1
16	isoGS-I	GCCTCCTCGATGTGCCTGG	Exon 1
17	isoGS-II	CATTGTCCAGGTCCCCCTT	Exon 1
18	isoGS-III	ACAATGCCCCGTCGTCTGAC	Exon 2
19	Zeocin-I	TGACCCTGTTTCATCAGCGC	Exon 1
20	Zeocin-II	TCAGCGCGGTCCAGGACCA	Exon 1
21	Zeocin-III	TCCAGGACCAGGTGGTGCC	Exon 1
22	Hygromycin-I	TCGATGAGCTGATGCTTTG	Exon 1
23	Hygromycin-II	AGCTGATGCTTTGGGCCGA	Exon 1
24	Hygromycin-III	GAGGACTGCCCCGAAGTCC	Exon 1
25	Puromycin-I	GGCGGTGTTTCGCCGAGATC	Exon 1
26	Puromycin-II	CCGAGATCGGCCCGCGCAT	Exon 1
27	Puromycin-III	GCGCATGGCCGAGTTGAGC	Exon 1
28	IGFBP4-I	CAGGGCCTCGGCCGAGCCT	Exon 1
29	IGFBP4-II	CCCGCTGCCGCCCCCCTGT	Exon 1
30	IGFBP4-III	GGCTTGGGGATGCCCTGCG	Exon 1

31	AQP1-I	TACATCATCGCCCAGTGTG	Exon 1
32	AQP1-II	AGCTTCTTCTTGAATTCGC	Exon 1
33	AQP1-III	ATGAAGACGAAGAGGGTCA	Exon 1
34	Maf1-1	AGATGCCCATATTATTGGC	Exon 1
35	Maf1-2	ATCTGGACTCAGACCCCTT	Exon 5
36	Maf1-3	GCAGGCAATGCATTGGACT	Exon 6
37	eRF1-1	CTCTTTTGGCACGCTCCA	Exon 3
38	eRF1-2	ATCCACAGTGAATTTGTGC	Exon 3
39	eRF1-3	CGTTTTGCCCGTTTAAGAA	Exon 4
40	FUT8-I	GCAGATATGTTATTCTCCGC	Exon 4
41	FUT8-II	GATCCGTCCACAACCTTGGC	Exon 4
42	FUT8-III	GATAAACTGCAATCTGGTTG	Exon 9

Theo các khía cạnh khác của sáng chế, các oligonucleotit được tổng hợp và sử dụng để khuếch đại locut ADN hệ gen của các gRNA được bộc lộ trong bảng nêu trên như được mô tả trong bảng 2 dưới đây. Các kỹ thuật này được giải thích đầy đủ trong tài liệu. Xem, ví dụ, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 và Third edition, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 và các bản cập nhật định kỳ.

Bảng 2. Các trình tự oligo được sử dụng để khuếch đại locut ADN hệ gen

SEQ ID NO.	Tên gen	Trình tự Oligo	Oligo ID
43	BAX	AGGGTTATGAGCCTCCCTAG	X-F
44	BAX	GGCTACCATGTAAAGAGACC	X-R
45	BAK	CAGACAGCCTTCTCTTGCT	K-I-II-F
46	BAK	AGAGCTCCTGAGAGGCATGA	K-I-II-R
47	BAK	TTTCACGCTGTGACACCCA	K-III-F
48	BAK	CAGAACCACACCAAGAATTG	K-III-R
49	UPF1	TGTTTAGGACCTTCGGTTTC	U-I-F
50	UPF1	ATGTCAAGGGCACTATAGAC	U-I-R
51	UPF1	CCCAACGCAAGAGACCTTC	U-II-III-F
52	UPF1	AGAGTGAACCTCAGCGCACG	U-II-III-R
53	Smg1	AGTGAAAGAGAGAGGAGAGG	S-I-F
54	Smg1	GATGAAGTGAAGTTGCTCTACC	S-I-R
55	Smg1	CTACGCAAGGCACGAGGTTC	S-II-III-F
56	Smg1	ATAAGCCTCTGCTACTCCAG	S-II-III-R
57	GS	CACTTGAACAAAGGCATCAAG	G-F
58	GS	TCTCATTGAGAAGGCATGTGC	G-R
59	isoGS	GGGAATTCCAAATAGGACCC	isoG-F
60	isoGS	CTGCTCGGGAAGGTTATGTT	isoG-R

61	Zeocin	ATGGCCAAGTTGACCAGTGCC	Z-F
62	Zeocin	TCAGTCCTGCTCCTCGGCCAC	Z-R
63	Hygromycin	ATGAAAAAGCCTGAACCTACC	H-F
64	Hygromycin	TCATTCTCTGCCCTCGGACG	H-R
65	Puromycin	ATGACCGAGTACAAGCCCACG	P-F
66	Puromycin	AGTCCGTGGCCCGAACGCCCA	P-R
67	IGFBP4	GGCAGCGCGTCAGCCCCCTGC	I-F
68	IGFBP4	TCAGTGCCAGTTTTCTTGGCT	I-R
69	AQP1	GCTGAGGGGGCAGCAAGCTGC	A-F
70	AQP1	CTGCCCAGCCCGAGGAGGCAG	A-R
71	Maf1	ATGAAGCTACTCGAGAACTCC	M-I-F
72	Maf1	TTTCATCCTCACCACCCTGGC	M-I-R
73	Maf1	CAGGTGGGCTCACATCTTTGC	M-II-III-F
74	Maf1	TCACATACAGATCACTGGAAC	M-II-III-R
75	eRF1	TCATACTGTGTTGAGTGGGAC	RF-F
76	eRF1	CCACACTAGAGAGCCCACAAC	RF-R
77	FUT8	ATGCCATCATATATCGTGAGCATC	FUT-I-F
78	FUT8	AAACAAGCTTGTTCCTAACTAG	FUT-I-R
79	FUT8	AGGAGTGTAGTGTAGTGATGAT	FUT-II-F
80	FUT8	ATTTGCTCTGCTGCCCTAACT	FUT-II-R
81	FUT8	TGACAGCAATGGACTGTTCTC	FUT-III-F
82	FUT8	CAGCTTCAGGATATGTAGGGTA	FUT-III-R

Các đích chỉnh sửa gen

Theo các phương án của sáng chế, các gen được nhắm đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt trong tế bào biểu hiện gen cần quan tâm được cung cấp. Thuật ngữ gen bất hoạt đích hoặc được nhắm đích để bất hoạt, gen cắt bỏ đích hoặc được nhắm đích để cắt bỏ, gen vô hoạt đích hoặc được nhắm đích để vô hoạt, gen phá vỡ đích hoặc được nhắm đích để phá vỡ như được sử dụng ở đây đề cập đến gen mà được nhắm đích để làm bất hoạt, cắt bỏ, hoặc làm vô hoạt bằng cách chỉnh sửa gen. Theo một số khía cạnh của sáng chế, vị trí hoặc vùng đích hoặc được nhắm đích có tham gia vào con đường chết tế bào theo chương trình. Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến các gen được nhắm đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt trong tế bào hoặc dòng tế bào. Gen được nhắm đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt này có thể bao gồm các gen mà điều biến sự sinh trưởng, biệt hóa, điều hòa tế bào, và các gen tương tự. Theo các phương án khác, các gen đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt trong tế bào biểu hiện gen cần quan tâm bao gồm các gen có tham gia vào các con đường chết tế bào theo chương trình, ví dụ các gen thúc đẩy sự chết tế

bào theo chương trình (pro-apoptotic gene), các gen sinh ung thư, và các gen tương tự. Các gen đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt này có thể bao gồm GS, họ Bcl-2, IGFBP4, AQP1, Maf1, eRF1, FUT8, P53, Caspaza 3, UPF1, Smg1 và các gen chỉ thị chọn lọc được bổ sung từ ngoài bất kỳ (nếu khả dụng) như Zeocin, Hygromycin, Puromycin, và các gen tương tự, Smac/DIABLO, Apaf-1, Caspaza-6, Caspaza-7, Caspaza-9, Caspaza-10, PARP, Alpha fodrin, NuMA, AIF, CAD, Puma, Noxa, 14-3-3, Aven, Myc, HtrA2/Omi và các dạng tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Gen đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt có thể bao gồm họ bcl-2 như Bcl-xl, Bak, Bax, Bcl-xs, Bid, Bim, Bad và Bik. Theo các phương án nhất định, đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt là BAX và/hoặc BAK. Theo các phương án khác, gen được nhắm đích để làm bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt là được làm bất hoạt, cắt bỏ hoặc vô hoạt một phần hoặc hoàn toàn. Gen được làm vô hoạt, phá vỡ, bất hoạt hoặc cắt bỏ một phần có thể bao gồm gen mà được làm vô hoạt, phá vỡ, bất hoạt hoặc cắt bỏ 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

Gen trị liệu sinh học

Sáng chế đề xuất gen cần quan tâm được biểu hiện trong dòng tế bào nền tảng. Các gen cần quan tâm như vậy có thể là chất trị liệu sinh học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các xytokin, yếu tố sinh trưởng, hormon, interferon, interleukin, các kháng thể và các protein và các peptit điều hòa khác. Các chất trị liệu sinh học theo sáng chế có thể gồm các sản phẩm sinh học bất kỳ từ vi khuẩn, nấm men, nấm mốc hoặc tế bào được xử lý di truyền. Các chất trị liệu sinh học theo sáng chế bao gồm ADN, ARN, ADN tái tổ hợp, protein, polypeptit. Theo một số phương án chất trị liệu sinh học là vacxin, vacxin thu được bằng phương pháp hoặc tế bào bất kỳ theo sáng chế.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các tế bào hoặc các dòng tế bào nền tảng biểu hiện gen cần quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, Alpha-1

antitrypsin, Angiostatin, yếu tố Antihemolytic, kháng thể, Apolipoprotein, Apoprotein, nhân tố lợi tiểu tâm nhĩ (Atrial natriuretic factor), polypeptit lợi tiểu tâm nhĩ (Atrial natriuretic polypeptide), peptit tâm nhĩ (Atrial peptide) Calcitonin, phôi tử CD40, phôi tử C-kit, Collagen, yếu tố kích thích khuẩn lạc (Colony stimulating factor: CSF), yếu tố bỏ thể 5a, chất ức chế bỏ thể, thụ thể bỏ thể 1, xytokin, (ví dụ, peptit hoạt hóa bạch cầu trung tính biểu mô-78, GRO α /MGSA, GRO β , GRO γ , MIP-1 α , MIP-1 δ , MCP-1), yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), Erythropoietin (“EPO”,), độc tố Exfoliating A và B, Yếu tố IX, Yếu tố VII, Yếu tố VIII, Yếu tố X, Yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (Fibroblast Growth Factor: FGF), Fibrinogen, Fibronectin, G-CSF, GM-CSF, CD116, M-CSF, CSF-1R, Glucocerebrosidaza, Gonadotropin, các yếu tố sinh trưởng, các protein Hedgehog (ví dụ, Sonic, Indian, Desert), Hemoglobin, Yếu tố sinh trưởng tế bào gan (Hepatocyte Growth Factor: HGF), Hirudin, albumin huyết thanh người, Insulin, yếu tố sinh trưởng giống insulin (Insulin-like Growth Factor: IGF), các interferon (ví dụ, IFN- α , IFN- β , IFN- γ), yếu tố sinh trưởng tế bào sừng (Keratinocyte Growth Factor: KGF), Lactoferrin, yếu tố ức chế bệnh bạch cầu, Luciferaza, Neurturin, yếu tố ức chế bạch cầu trung tính (Neutrophil inhibitory factor: NIF), oncostatin M, protein thuộc mô tạo xương, hormon tuyến cận giáp, PD-ECSF, PDGF, hormon peptit (ví dụ, hormon sinh trưởng ở người), Pleiotropin, Protein A, Protein G, ngoại độc tố sinh nhiệt A, B, và C, Relaxin, Renin, SCF, thụ thể bỏ thể hòa tan I, I-CAM hòa tan 1, thụ thể interleukin hòa tan (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), thụ thể TNF hòa tan, Somatomedin, Somatostatin, Somatotropin, Streptokinaza, các Superantigen, tức là, các Staphylococcal enterotoxin (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE), Superoxid dismutaza (SOD), độc tố gây hội chứng sốc nhiễm độc (Toxic shock syndrome toxin: TSST-1), Thymosin alpha 1, chất hoạt hóa mô sinh plasmin, TGF beta và MIF, yếu tố sinh trưởng nội mô mạch (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF), Urokinaza, và các chất tương tự.

Theo các phương án khác, gen cần quan tâm có thể bao gồm các interleukin như, nhưng không chỉ giới hạn ở, IL-1 và CD121a, IL-2 và CD25/CD122/CD137, IL-3 và CD123, IL-4 và CD124, IL-5 và CD125, IL-6 và CD126, IL-7 và CD127/CD132, IL-9 và IL-9R, IL-10 và CRF2-4, IL-11 và IL-11R, IL-12 và IL-12R β 1c/IL-12R β 2, IL-13 và IL-13R, IL-15 và CD122/CD132, IL-16 và CD4, IL-17 và CD217, IL-18 và IL-1Rrp,

IL-19 và IL-20R α /IL-10R β c, IL-21 và IL-21R/CD132, IL-22 và IL-22R α c/IL-10R β c, IL-23 và IL-23R, IL-24 và IL-22R α c/IL-10R β c, IL-25 và IL-17BR, IL-26 và IL-20R α /IL-10R β c, IL-27 và WSX-1/CD130c, IL-28 và IL-28R α c/IL-10R β c, IL-29 và IL-28R α c/IL-10R β c, IL-30 và WSX-1/CD130c, IL-31 và IL31A/OSMR, IL-32, IL-33 và ST2/IL1RAP, IL-34 và CSF-1R, IL-35 và IL-12RB2, IL-36 và IL-1Rrp2, IL-37 và IL-18R α , TSLP và TSLPR, LIF và LIFR, OSM và OSMR và các chất tương tự.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, gen cần quan tâm có thể bao gồm yếu tố hoại tử khối u (Tumor Necrosis Factor: TNF) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, yếu tố hoại tử khối u beta (TNF beta), thụ thể yếu tố hoại tử khối u (Tumor necrosis factor receptor: TNFR), yếu tố hoại tử khối u alpha (TNF alpha) và p55/p75, LT- α và p55/p75, LT- β và p55/p75, CD40L và CD40, FasL và CD95, CD27L và CD27, CD30L và CD30, 4-1BBL và 4-1BB, Trail và DR4, RANK-L và RANK, APRIL và TAC1, LIGHT và HVEM, TWEAK và TWEAKR, BAFF và TAC1, và các chất tương tự.

Gen cần quan tâm có thể gồm các chemokin C-X-C (ví dụ, T39765, NAP-2, ENA-78, Gro-a, Gro-b, Gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG), bao gồm CXCL1 và CXCR2, CXCL2 và CXCR2, CXCL3 và CXCR2, CXCL4 và CXCR3B, CXCL5 và CXCR2, CXCL6 và CXCR2, CXCL7 và CXCR1/CXCR2, CXCL8 và CXCR1/CXCR2, CXCL9 và CXCR3A/3B, CXCL10 và CXCR3A/3B, CXCL11 và CXCR3A/3B/CXCR7, CXCL12 và CXCR4/CXCR7, CXCL13 và CXCR5, CXCL14, CXCL15, CXCL16 và CXCR6 và các chất tương tự. Gen cần quan tâm cũng có thể bao gồm các chemokin CC (ví dụ, protein hóa ứng động bạch cầu đơn nhân-1, protein hóa ứng động bạch cầu đơn nhân-2, protein hóa ứng động bạch cầu đơn nhân-3, protein viêm bạch cầu đơn nhân-1 alpha, protein viêm bạch cầu đơn nhân-1 beta, RANTES, I309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262), bao gồm CCL1 và CCR6, CCL2 và CCR2, CCL3 và CCR1/5, CCL4 và CCR5, CCL5 và CCR1/CCR3, CCR5, CCL6 và CCR1, CCL7 và CCR1/CCR2/CCR3/CCR5, CCL8 và CCR1/CCR2/CCR5, CCL9 và CCR1, CCL11 và CCR3, CCL12 và CCR2, CCL13 và CCR2/3, CCL14 và CCR1/3/5, CCL15 và CCR1/3, CCL16 và CCR1/2/5/8, CCL17 và CCR4, CCL18 và PTPN3, CCL19 và CCR7, CCL20 và CCR6, CCL21 và CCR7, CCL22 và CCR4, CCL23 và CCR1/FPRL-1, CCL24 và CCR3, CCL25 và CCR9, CCL26 và CCR3, CCL27 và

CCR10, CCL28 và CCR10, và bao gồm XCL1 và XCR1, XCL2 và XCR1, CX3CL1 và CX3CR1 và các yếu tố tương tự.

Các phương pháp, các chế phẩm, các chiến lược và các kỹ thuật được mô tả ở đây không chỉ giới hạn ở typ, nhóm, họ polypeptit hoặc protein cụ thể. Thay vào đó, hầu như các polypeptit bất kỳ có thể được thiết kế hoặc được biến đổi để chứa ít nhất một axit amin không tự nhiên “được biến đổi hoặc không được biến đổi” được mô tả ở đây. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, polypeptit có thể là tương đồng với chất trị liệu sinh học hoặc protein trị liệu được mô tả ở đây. Các protein hoặc các polypeptit cần quan tâm với ít nhất một axit amin không tự nhiên là dấu hiệu của sáng chế. Sáng chế còn đề xuất các polypeptit hoặc các protein với ít nhất một axit amin không tự nhiên được tạo ra bằng cách sử dụng các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế. Tá dược (ví dụ, tá dược được dụng) cũng có thể có trong protein này.

Bằng cách sản xuất các protein hoặc các polypeptit cần quan tâm với ít nhất một axit amin không tự nhiên được kết hợp vào các tế bào có xương sống, các protein hoặc các polypeptit sẽ thường bao gồm các biến đổi sau dịch mã trên động vật có xương sống. Theo các phương án nhất định, protein bao gồm ít nhất một axit amin không tự nhiên và ít nhất một biến đổi sau dịch mã mà được thực hiện in vivo bằng tế bào có xương sống, trong đó biến đổi sau dịch mã không được thực hiện bằng tế bào chưa có nhân điển hình. Ví dụ, biến đổi sau dịch mã bao gồm, ví dụ, axetyl hóa, axyl hóa, biến đổi lipid, palmitoyl hóa, bổ sung palmitat, phosphoryl hóa, biến đổi liên kết glycolipit, glycosyl hóa, và các biến đổi tương tự.

Sáng chế bao gồm gen chứa codon chọn lọc hoặc gen cần quan tâm. Gen cần quan tâm có thể bao gồm protein hoặc polypeptit trị liệu, các gen có liên quan đến sự sinh trưởng, sự biệt hóa, sự điều hòa, sự viêm của tế bào, các gen sinh ung thư và các gen tương tự, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm gen kháng thể chứa codon chọn lọc. Theo các phương án khác, kháng thể có thể là kháng thể cần quan tâm bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng Her2, kháng CD-70, kháng PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, Interleukin (gồm 2, 3, 10 nhưng không chỉ giới hạn ở đó), GPC3, DLL3, ROR1, leptin, họ FGF bao gồm FGF-21 và FGF-23, HGH, FcR, insulin, TNFR1, TRAIL, erythropoietin, và các chất tương tự, các kháng thể đặc hiệu kép và các mảnh của nó và các chất tương tự, nhưng không chỉ

giới hạn ở đó. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm gen kháng thể chứa codon chọn lọc. Các kháng thể theo sáng chế có thể là, ví dụ, đa dòng, đơn dòng, khảm, được làm giống như của người, chuỗi đơn, các mảnh Fab, các mảnh được sản xuất bởi thư viện biểu hiện Fab, hoặc các dạng tương tự. Các kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, các MAb đặc hiệu với khối u mà kìm hãm sự phát triển của khối u bằng cách nhắm đích các tế bào khối u để phá hủy bởi độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) hoặc sự phân giải qua trung gian bổ thể (complement-mediated lysis: CML) (các typ Ab chung này đôi khi được đề cập là “đạn thần”). Một ví dụ là Rituxan, MAb kháng CD20 để điều trị bệnh u bạch huyết không Hodgkin (Scott (1998) *Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma Cancer Pract* 6: 195-7); các kháng thể mà can thiệp vào thành phần chủ chốt của sự phát triển khối u. Herceptin là kháng thể đơn dòng kháng HER-2 để điều trị bệnh ung thư vú di căn, và cung cấp ví dụ về kháng thể với cơ chế tác dụng này (Baselga et al. (1998) *Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts* [published erratum appears in *Cancer Res* (1999) 59(8):2020], *Cancer Res* 58: 2825-31). Ví dụ khác đề cập đến các kháng thể để phân phát các hợp chất gây độc tế bào (các độc tố, các nuclid phóng xạ, v.v.) trực tiếp đến khối u hoặc vị trí cần quan tâm khác. Ví dụ, một ứng dụng Mab là CYT-356, kháng thể liên kết 90Y mà nhắm đích sự phóng xạ trực tiếp đến các tế bào khối u tuyến tiền liệt (Deb et al. (1996) *Treatment of hormone-refractory prostate cancer with 90Y-CYT-356 monoclonal antibody Clin Cancer Res* 2: 1289-97. Ví dụ khác có thể bao gồm liệu pháp tiền dược chất enzym hướng đến kháng thể, trong đó enzym mà được định vị đồng thời vào khối u hoạt hóa tiền dược chất được dùng toàn thân trong vùng lân cận khối u. Ví dụ, kháng thể kháng Ep-CAM1 được liên kết với carboxypeptidaza A đang được phát triển để điều trị bệnh ung thư đại trực tràng (Wolfe et al. (1999) *Antibody-directed enzyme prodrug therapy with the T268G mutant of human carboxypeptidase A1: in vitro and in vivo studies with prodrugs of methotrexate and the thymidylate synthase inhibitors GW1031 and GW1843 Bioconjug Chem* 10: 38-48). Các kháng thể khác (ví dụ, các chất đối kháng) được thiết kế để ức chế đặc hiệu các chức năng tế bào thông thường nhằm lợi ích trị liệu có thể được đưa vào. Ví dụ là Orthoclone OKT3, MAb kháng CD3 được cung cấp bởi Johnson

and Johnson để giảm sự thải ghép cơ quan cấp (Strate et al. (1990) *Orthoclone OKT3 as first-line therapy in acute renal allograft rejection* Transplant Proc 22: 219-20. Nhóm kháng thể khác có thể bao gồm nhóm kháng thể mà là chất chủ vận. Các Mab được thiết kế để tăng cường một cách đặc hiệu các chức năng tế bào thông thường nhằm lợi ích trị liệu. Ví dụ, các chất chủ vận trên cơ sở Mab của các thụ thể axetylcholin nhằm trị liệu bệnh thần kinh đang được phát triển (Xie et al. (1997) *Direct demonstration of MuSK involvement in axetylcholine receptor clustering through identification of agonist ScFv* Nat. Biotechnol. 15: 768-71. Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này có thể được biến đổi để chứa một hoặc nhiều axit amin không tự nhiên để tăng cường một hoặc nhiều tính chất trị liệu (độ đặc hiệu, ái lực, thời gian bán thải trong huyết thanh, v.v.). Ví dụ khác có thể bao gồm các kháng thể xúc tác như các trình tự Ig mà đã được xử lý để bất chức khả năng xúc tác của các enzym (Wentworth và Janda (1998) *Catalytic antibodies* Curr Opin Chem Biol 2: 138-44. Các kháng thể xúc tác cũng có thể được biến đổi để chứa một hoặc nhiều axit amin không tự nhiên để cải thiện một hoặc nhiều tính chất cần quan tâm.

Codon chọn lọc theo sáng chế mở rộng khung codon di truyền của cơ chế sinh tổng hợp protein. Ví dụ, codon chọn lọc bao gồm, ví dụ, codon ba bazơ duy nhất, codon vô nghĩa, như codon kết thúc, ví dụ codon amber (UAG), codon opal (UGA), codon không tự nhiên, ít nhất là codon bốn bazơ, codon hiếm, hoặc các chất tương tự. Một số codon chọn lọc có thể được đưa vào gen mong muốn, ví dụ, một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, nhiều hơn ba, v.v.. Gen có thể gồm nhiều bản sao của codon chọn lọc nhất định, hoặc có thể gồm nhiều codon chọn lọc khác nhau, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Theo một phương án, các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế bao gồm việc sử dụng gen chứa codon chọn lọc hoặc gen cần quan tâm, được bộc lộ ở đây. Theo một phương án, các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế bao gồm việc sử dụng kháng thể chứa codon chọn lọc trong đó codon chọn lọc có thể nằm trên chuỗi nặng, chuỗi nhẹ hoặc cả hai. Do đó, codon chọn lọc theo sáng chế bao gồm codon kết thúc để kết hợp các axit amin không tự nhiên in vivo vào tế bào nhân điển hình.

Tế bào sản xuất

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các tế bào, các dòng tế bào sản xuất và các dòng được tạo ra từ đó biểu hiện gen cần quan tâm. Các tế bào sản xuất hoặc các

dòng tế bào sản xuất như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các quần thể tế bào được chuyển nhiễm tạm thời, các quần thể tế bào khối ổn định (ví dụ, các tế bào hỗn hợp hoặc lô tế bào), các quần thể tế bào mini ổn định (ví dụ, các lô mini hoặc các quần thể lô lớn), và các dòng tế bào dòng vô tính ổn định (ví dụ như được thu từ tế bào đơn). Các quần thể tế bào được chuyển nhiễm tạm thời được sử dụng ở đây đề cập đến lô tế bào trong đó gen cần quan tâm được đưa vào và có thể không được hợp nhất một cách ổn định vào hệ gen. Tế bào ổn định hoặc dòng tế bào sản xuất ổn định được sử dụng ở đây đề cập đến tế bào trong đó gen cần quan tâm được đưa vào và được hợp nhất một cách ổn định vào hệ gen. Quần thể tế bào mini ổn định có thể có tính không đồng nhất ít hơn quần thể tế bào khối ổn định.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dòng tế bào sản xuất ổn định chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), và gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm với axit amin không tự nhiên được kết hợp, và gen được bất hoạt, cắt bỏ, làm vô hoạt hoặc phá vỡ đích. Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến các tế bào, các dòng tế bào sản xuất và các dòng được tạo ra từ đó biểu hiện gen cần quan tâm và gen được làm bất hoạt, cắt bỏ, làm vô hoạt hoặc phá vỡ đích. Theo các phương án khác, gen được làm bất hoạt, cắt bỏ, làm vô hoạt hoặc phá vỡ đích này là gen tham gia vào việc thúc đẩy quá trình sinh trưởng và năng suất tế bào. Theo các phương án khác gen được làm bất hoạt, cắt bỏ, làm vô hoạt hoặc phá vỡ đích là gen tham gia vào quá trình chết tế bào theo chương trình, ví dụ gen thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình. Theo phương án ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp và chế phẩm để tạo ra tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện gen cần quan tâm với axit amin được kết hợp không tự nhiên và một hoặc nhiều gen bất hoạt, phá vỡ, cắt bỏ hoặc vô hoạt đích (ví dụ, BAX và/hoặc BAK). Các gen bất hoạt đích khác có thể bao gồm họ Bcl-2 của các protein đã được biết rõ trong lĩnh vực này về khả năng của chúng trong việc kiểm soát sự chết tế bào theo chương trình thông qua quá trình ti thể. Bcl-2 và một số chất đồng đẳng của nó, như Bcl-xl, đã được biết là làm ức chế sự chết tế bào theo chương trình. Các thành viên họ Bcl-2 thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình đã biết khác bao gồm Bak, Bax, Bcl-xs, Bid, Bim, Bad và Bik. Với sự kích thích thích hợp, Bax và/hoặc Bak có thể cảm ứng và làm gia tăng sự chết tế bào theo chương trình. Họ Bcl-2 gồm các protein giống nhau đáng kể về mặt trình tự và có độ tương đồng đáng kể về mặt cấu trúc. Họ các

protein này được đặc trưng bằng việc có tới bốn vùng trình tự tương đồng, được biết như là các miền tương đồng Bcl-2. Ví dụ, protein Bax có các miền được bảo tồn cao giống như Bcl-2. Một số trong số các miền này có liên quan đến sự tạo thành heterodime Bax/Bcl-2 mà được cho là quan trọng cho sự sống sót tế bào hoặc sự chết tế bào đáp lại các tín hiệu chết tế bào theo chương trình. Khi được hoạt hóa, Bax di chuyển đến màng ty thể bên ngoài tại đó nó oligome hóa, làm cho màng thấm được, và giải phóng một số yếu tố thúc đẩy sự chết, bao gồm cytochrom C (Scorrano et al. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:437-444). Bax có thể được làm cho vô hoạt trong các tế bào bình thường thông qua sự tương tác với protein Ku70, mà cô lập Bax khỏi ty thể (Sawada et al. (2003) *Nat. Cell Biol.* 5:320-329). Giống như Bax, sản phẩm gen Bak làm tăng cường sự chết tế bào theo chương trình với sự có mặt của các tác nhân kích thích thích hợp. Bak cũng thúc đẩy sự chết tế bào và chống lại sự bảo vệ chết theo chương trình Bcl-2. Bak là tác nhân cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình có hiệu lực đã biết ở nhiều loại tế bào. Do đó, sáng chế, theo cách ví dụ, đề xuất phương pháp và chế phẩm tạo ra các dòng tế bào sản xuất với sự vô hoạt một phần hoặc hoàn toàn một hoặc nhiều gen BAK và/hoặc gen BAX trong tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện gen cần quan tâm và được kết hợp với axit amin không tự nhiên. Sự vô hoạt tác nhân gây chết tế bào theo chương trình, (ví dụ, BAX và/hoặc BAK), trong tế bào biểu hiện gen cần quan tâm có thể được sử dụng để tạo ra các dòng tế bào mà kháng lại sự chết tế bào theo chương trình và cải thiện sự sản xuất các protein tái tổ hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, các kháng thể, các vectơ virus tái tổ hợp và trong việc sản xuất các vacxin.

Các dòng tế bào theo sáng chế có thể được sử dụng cho việc sản xuất protein tái tổ hợp. Protein tái tổ hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể, các kháng nguyên, các protein trị liệu như được bộc lộ trong phần mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm các tế bào hoặc các dòng tế bào có nhân điển hình hoặc có xương sống, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật có vú, côn trùng, bò sát, chim, và các loài tương tự hoặc trùng lông, thực vật (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực vật một lá mầm, thực vật hai lá mầm, và tảo), nấm mốc, nấm men, trùng roi, microsporidia, và sinh vật nguyên sinh. Các tế bào có nhân điển hình có thể được sử dụng để kết hợp *in vivo* axit amin không tự nhiên. Các tế bào có thể được sử dụng để

được xử lý về mặt di truyền (ví dụ, được biến nạp, tải nạp hoặc chuyển nhiễm) với các polynucleotit theo sáng chế hoặc các cấu trúc mà bao gồm polynucleotit theo sáng chế, ví dụ, vector theo sáng chế, mà có thể là, ví dụ, vector tách dòng hoặc vector biểu hiện. Vector có thể, ví dụ, ở dạng plasmit, vi khuẩn, virus, polynucleotit trần, hoặc polynucleotit liên hợp. Các vector được đưa vào các tế bào và/hoặc các vi sinh vật bằng các phương pháp chuẩn bao gồm phương pháp điện chuyển (From et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985), sự nhiễm bằng các vector virus, sự xuyên đường đạn tốc độ cao bởi các hạt nhỏ có axit nucleic nằm trong chất nền của các hạt hoặc viên nhỏ, hoặc nằm trên bề mặt (Klein et al., Nature 327, 70-73 (1987)).

Một số phương pháp đã được biết rõ để đưa các axit nucleic vào các tế bào là có sẵn, phương pháp bất kỳ như vậy có thể được sử dụng trong sáng chế. Các phương pháp này bao gồm: sự dung hợp các tế bào nhận với các thể nguyên sinh chứa ADN, sự điện chuyển, sự bắn phá, và sự nhiễm bởi các vector virus (được bàn luận thêm dưới đây), v.v. Các tế bào vi khuẩn có thể được sử dụng để khuếch đại một số lượng các plasmit chứa các cấu trúc ADN theo sáng chế. Vi khuẩn được phát triển đến pha logarit và các plasmit trong vi khuẩn này có thể được phân lập bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Sambrook). Ngoài ra, có rất nhiều các kit có bán trên thị trường để tinh chế các plasmit từ vi khuẩn (xem, ví dụ, EasyPrep™, FlexiPrep™, cả hai đều từ Pharmacia Biotech; StrataClean™, từ Stratagene; và, QIAprep™ từ Qiagen). Sau đó các plasmit được phân lập và được tinh chế này được xử lý tiếp để tạo ra các plasmit khác, được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào hoặc kết hợp vào các vector có liên quan để gây nhiễm vào sinh vật. Các vector điển hình chứa các yếu tố kết thúc phiên mã và dịch mã, các trình tự khởi đầu phiên mã và dịch mã, và các đoạn khởi đầu hữu dụng để điều hòa sự biểu hiện của axit nucleic cụ thể cần quan tâm. Các vector tùy ý chứa các catxet biểu hiện chung chứa ít nhất một trình tự kết thúc độc lập, các trình tự cho phép sao chép catxet trong các tế bào nhân điển hình, hoặc các tế bào chưa có nhân điển hình, hoặc cả hai (ví dụ, các vector con thoi) và các chỉ thị chọn lọc cho cả hệ chưa có nhân điển hình và hệ có xương sống. Các vector thích hợp cho việc sao chép và hợp nhất trong các tế bào chưa có nhân điển hình, các tế bào có nhân điển hình, hoặc tốt hơn là cả hai. Xem, Gilman & Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts, *et al.*, Nature, 328:731 (1987); Schneider, B., *et al.*, Protein Expr. Purif. 6435:10 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (*all supra*).

Bản kê mục lục các vi khuẩn và thể thực khuẩn hữu dụng để tách dòng được cung cấp, ví dụ, bằng ATCC, ví dụ, The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna *et al.* (eds) được công bố bởi ATCC. Các quy trình cơ sở bổ sung để giải trình tự, tách dòng và các khía cạnh khác của sinh học phân tử và các nghiên cứu lý thuyết cơ bản cũng được phát hiện trong Watson *et al.* (1992) Recombinant DNA Second Edition Scientific American Books, NY. Ngoài ra, về cơ bản là axit nucleic bất kỳ (và hầu như là axit nucleic được đánh dấu bất kỳ, bất kể tiêu chuẩn hay không tiêu chuẩn) có thể là đặt hàng theo thói quen hoặc tiêu chuẩn từ nhiều nguồn thương mại, như Midland Certified Reagent Company (Midland, TX mcrc.com), The Great American Gene Company (Ramona, CA có sẵn trên mạng tại www.genco.com), ExpressGen Inc. (Chicago, IL có sẵn trên mạng tại www.expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) và nhiều công ty khác.

Các tế bào hoặc dòng tế bào theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được biến đổi nếu thích hợp cho các hoạt động như, ví dụ, các bước sàng lọc, hoạt hóa các đoạn khởi đầu hoặc chọn lọc thể biến nạp. Các tế bào này có thể tùy ý được nuôi cấy vào các sinh vật chuyển gen. Các tài liệu tham khảo hữu ích khác, ví dụ để phân lập và nuôi cấy tế bào (ví dụ, để phân lập axit nucleic tiếp theo) bao gồm Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley- Liss, New York và các tài liệu tham khảo được nêu trong đó; Payne *et al.* (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) và Atlas and Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

Môi trường hoặc các môi trường thông thường, như được sử dụng ở đây, để chỉ môi trường nuôi cấy bất kỳ được sử dụng để làm phát triển và thu hoạch các tế bào và/hoặc các sản phẩm được biểu hiện và/hoặc được tiết bởi các tế bào này. “Môi trường” hoặc “các môi trường” như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các giá thể dạng dung dịch, chất rắn, chất bán rắn, hoặc các giá thể cứng mà có thể hỗ trợ hoặc chứa tế bào chủ bất kỳ, bao gồm, ví dụ, các tế bào chủ vi khuẩn, các tế bào chủ nấm men, các tế bào chủ côn trùng, các tế bào chủ thực vật, các tế bào chủ có nhân điển hình, các tế bào

chủ động vật có vú, các tế bào CHO, các tế bào chủ chưa có nhân điển hình, E. coli, hoặc các tế bào chủ Pseudomonas, và các thành phần tế bào. “Môi trường” hoặc “các môi trường” như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, môi trường hoặc các môi trường trong đó tế bào chủ đã được phát triển trong đó polypeptit đã được tiết ra, bao gồm môi trường trước hoặc sau bước tăng sinh. “Môi trường” hoặc “các môi trường” còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dung dịch đệm hoặc các chất phản ứng mà chứa sản phẩm phân giải tế bào chủ, ví dụ polypeptit được sản xuất trong tế bào và tế bào chủ được phân giải hoặc phá vỡ để giải phóng polypeptit. Theo các phương án khác của sáng chế, các môi trường có thể là môi trường nuôi cấy tế bào đầy đủ, môi trường nuôi cấy tế bào truyền thống, hoặc môi trường đã được xác định về mặt hóa học. Môi trường nuôi cấy tế bào đầy đủ thường có hai nhóm thành phần chính: môi trường cơ sở và các chất bổ sung sinh trưởng. Môi trường cơ sở là hỗn hợp dinh dưỡng gồm các thành phần trọng lượng phân tử nhỏ gồm đường, các axit amin, các vitamin, các loại muối khác nhau, v.v. Môi trường cơ sở không chỉ cung cấp nguồn dinh dưỡng để đem lại năng lượng và tạo ra khối tế bào và sản phẩm mới, mà nó còn cung cấp nồng độ muối cân bằng và nồng độ mol cân bằng để cho phép sinh trưởng tế bào. Tuy nhiên, hầu hết các tế bào sẽ không sinh trưởng nếu chỉ được cung cấp môi trường cơ sở vì môi trường cơ sở không chứa các yếu tố sinh trưởng hoặc các yếu tố khác cần thiết cho các điều kiện sinh trưởng “tối ưu”. Các chất bổ sung sinh trưởng mà có thể được bổ sung vào môi trường cơ sở bao gồm các yếu tố sinh trưởng, các phospholipit, hoặc các dịch thủy phân đậu nành, huyết thanh, v.v.. Các chất bổ sung này có thể thúc đẩy sự phát triển tế bào bằng cách cung cấp các thành phần cấu tạo cho các quy trình truyền tín hiệu cụ thể hoặc có thể cung cấp các nhu cầu dinh dưỡng đặc biệt (như phân phát cholesterol) và có thể hướng đến sự biệt hóa tế bào. Môi trường nuôi cấy tế bào truyền thống chứa tới 15% huyết thanh động vật ngoài môi trường cơ sở. Huyết thanh là chất lỏng có thành phần hóa học rất phức tạp. Môi trường như vậy, chứa thành phần hóa học phần lớn không xác định, được gọi là môi trường phức. Nhiều chất bổ sung thường được sử dụng trong các quy trình công nghiệp, ví dụ, các sản phẩm thủy phân thực vật, các phospholipit đậu nành, cũng nằm trong nhóm này. Việc sử dụng chúng làm cho thành phần hóa học của môi trường trở nên không xác định. Môi trường được xác định về mặt hóa học chỉ chứa các thành phần mà thành phần hóa học của chúng đã được biết và được đặc trưng và tất cả các thành phần hóa học của nó đã được chỉ rõ. Môi trường này không chứa hỗn hợp

bất kỳ của các cấu phần với thành phần không biết hoặc không xác định. Ví dụ, các “lipit” hoặc các “phospholipit” là các hợp chất không được xác định rõ nhưng là hỗn hợp của nhóm các hợp chất và không được chỉ rõ về mặt hóa học. Môi trường xác định về mặt hóa học thường chứa các yếu tố sinh trưởng, các xytokin, và các protein mang. Do đó, môi trường được xác định về mặt hóa học không nhất thiết là không có protein.

Theo một số phương án của sáng chế, việc sản xuất theo mẻ và sản xuất cấp theo mẻ được sử dụng. Các phương pháp chuẩn để sản xuất theo mẻ và sản xuất cấp theo mẻ đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Trong quy trình theo mẻ, hạn chế về nồng độ mol làm giới hạn lượng chất dinh dưỡng có thể được bổ sung vào ban đầu. Mức dinh dưỡng thấp này làm ngăn chặn không cho môi trường nuôi cấy đạt được nồng độ tế bào và sản phẩm cao. Trong môi trường nuôi cấy cấp theo mẻ, môi trường được bổ sung trong quá trình nuôi cấy để ngăn chặn sự suy giảm dinh dưỡng, do đó kéo dài pha sinh trưởng và cuối cùng là làm gia tăng nồng độ tế bào và sản phẩm. Nhiều cách vận hành cấp theo mẻ, từ rất đơn giản đến có độ phức tạp cao và tự động, đã được sử dụng trong các cơ sở sản xuất hiện nay. Các môi trường được sử dụng trong cả quy trình theo mẻ và cấp theo mẻ đều là có sẵn trên thị trường hoặc là các môi trường độc quyền được phát triển tại chỗ. Loại môi trường có thể là môi trường phức chứa thành phần hóa học phần lớn không xác định, hoặc môi trường được xác định về mặt hóa học chứa các cấu phần có (các) thành phần hóa học mà đã được biết và được đặc trưng và tất cả các thành phần hóa học của nó đã được chỉ rõ. Theo một số phương án, môi trường được xác định về mặt hóa học chỉ bao gồm các cấu phần mà thành phần hóa học của chúng đã được biết và được đặc trưng và tất cả các thành phần hóa học của nó đã được chỉ rõ. Theo các phương án khác, loại môi trường được sử dụng có thể là hỗn hợp chứa thành phần hóa học không được xác định và thành phần đã được xác định về mặt hóa học. Theo phương án khác, thành phần hóa học không được xác định và thành phần đã được xác định về mặt hóa học có trong kết hợp bất kỳ với lượng lần lượt là 99%-90% và 1%-10%, hoặc lần lượt là 89%-80% và 11%-20%, hoặc lần lượt là 79%-70% và 21%-30%, hoặc lần lượt là 69%-60% và 31%-40%, hoặc lần lượt là 59%-50% và 41%-50%; hoặc trong kết hợp bất kỳ với lượng lần lượt là 1%-10% và 99%-90%, hoặc lần lượt là 11%-20% và 89%-80% , hoặc lần lượt là 21%-30% và 79%-70%, hoặc lần lượt là 31%-40% và 69%-60%, hoặc lần lượt là 41%-50% và 59%-50%. Hầu hết các phương pháp như vậy, hoặc

các phương pháp khác đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Weishou Hu, et al., *Cell Culture Process Engineering* (2013).

Các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế đề xuất tế bào hoặc dòng tế bào sản xuất, có nhân điển hình để tạo ra các protein hoặc các polypeptit chứa hoặc gồm các axit amin không tự nhiên với lượng lớn, hữu dụng. Theo một khía cạnh, chế phẩm tùy ý chứa polypeptit của protein mà chứa axit amin không tự nhiên với lượng, ví dụ, ít nhất 10 microgam, ít nhất 50 microgam, ít nhất 75 microgam, ít nhất 100 microgam, ít nhất 200 microgam, ít nhất 250 microgam, ít nhất 500 microgam, ít nhất 1 miligam, ít nhất 10 miligam hoặc nhiều hơn thế, hoặc với lượng mà có thể đạt được với các phương pháp sản xuất protein in vivo. Theo khía cạnh khác, protein tùy ý có trong chế phẩm với nồng độ, ví dụ, ít nhất 10 microgam protein/lít, ít nhất 50 microgam protein/lít, ít nhất 75 microgam protein/lít, ít nhất 100 microgam protein/lít, ít nhất 200 microgam protein/lít, ít nhất 250 microgam protein/lít, ít nhất 500 microgam protein/lít, ít nhất 1 miligam protein/lít, hoặc ít nhất 10 miligam protein/lít hoặc nhiều hơn, trong, ví dụ, sản phẩm phân giải tế bào, dung dịch đậm, dung dịch đậm được phẩm, hoặc huyền phù lỏng khác (ví dụ, trong thể tích, ví dụ, từ khoảng 1 nl đến khoảng 100 L). Việc sản xuất lượng lớn (ví dụ, lớn hơn lượng mà thường khả dĩ với các phương pháp khác, ví dụ, dịch mã in vitro) protein trong tế bào có nhân điển hình hoặc tế bào có xương sống chứa ít nhất một axit amin không tự nhiên là đặc điểm của sáng chế.

Theo một số phương án, tế bào theo sáng chế là tế bào chủ được xử lý hoặc tế bào chủ tái tổ hợp hoặc tế bào nền tảng, còn được gọi là “tế bào chủ”. Tế bào chủ nền tảng, được xử lý, hoặc tái tổ hợp, hoặc tế bào chủ như vậy được dùng để chỉ tế bào mà gồm polynucleotit ngoại sinh, trong đó các phương pháp được sử dụng để chèn polynucleotit ngoại sinh vào tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự hấp thu trực tiếp, tải nạp, ghép đôi-f, hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các tế bào chủ tái tổ hợp. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, polynucleotit ngoại sinh như vậy có thể là vector không được hợp nhất, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, plasmit, hoặc có thể được hợp nhất vào hệ gen chủ. Theo các khía cạnh khác của sáng chế, gen cần quan tâm có thể được chuyển nhiễm vào tế bào chủ nền tảng, được xử lý hoặc tái tổ hợp để tạo ra dòng tế bào sản xuất để tạo ra hoặc sản xuất chất trị liệu sinh học, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể. Theo phương án khác của sáng chế, dòng

tế bào sản xuất là dòng tế bào có gen cần quan tâm. Theo các phương án khác của sáng chế, dòng tế bào sản xuất mà có gen cần quan tâm được làm bất hoạt, cắt bỏ, vô hoạt hoặc phá vỡ có thể trở thành dòng tế bào nền tảng. Theo một số khía cạnh của sáng chế, tế bào nền tảng có thể là dòng tế bào chứa hệ tRNA/RS trực giao không có gen cần quan tâm.

Theo một số phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể tinh khiết một cách đáng kể. Thuật ngữ “tinh khiết một cách đáng kể” như được sử dụng ở đây, để chỉ thành phần cần quan tâm có thể về cơ bản là hoặc chủ yếu là không chứa các thành phần khác mà thường đi kèm hoặc tương tác với thành phần cần quan tâm trước khi tinh chế. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, thành phần cần quan tâm có thể là “tinh khiết một cách đáng kể” nếu chế phẩm thành phần cần quan tâm chứa thành phần tạp nhiễm với lượng nhỏ hơn khoảng 30%, nhỏ hơn khoảng 25%, nhỏ hơn khoảng 20%, nhỏ hơn khoảng 15%, nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5%, nhỏ hơn khoảng 4%, nhỏ hơn khoảng 3%, nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc nhỏ hơn khoảng 1%. Do đó, thành phần “tinh khiết một cách đáng kể” cần quan tâm có thể có độ tinh khiết khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% hoặc lớn hơn. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, polypeptit axit amin tự nhiên hoặc polypeptit axit amin không tự nhiên có thể được tinh chế từ tế bào tự nhiên, hoặc tế bào chủ trong trường hợp các polypeptit axit amin tự nhiên hoặc các polypeptit axit amin không tự nhiên được sản xuất bằng cách tái tổ hợp. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, chế phẩm chứa polypeptit axit amin tự nhiên hoặc polypeptit axit amin không tự nhiên có thể “tinh khiết một cách đáng kể” nếu chế phẩm này chứa vật chất tạp nhiễm với lượng nhỏ hơn khoảng 30%, nhỏ hơn khoảng 25%, nhỏ hơn khoảng 20%, nhỏ hơn khoảng 15%, nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5%, nhỏ hơn khoảng 4%, nhỏ hơn khoảng 3%, nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc nhỏ hơn khoảng 1%. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, nếu polypeptit axit amin tự nhiên hoặc polypeptit axit amin không tự nhiên được sản xuất bằng cách tái tổ hợp bằng các tế bào chủ, thì polypeptit axit amin tự nhiên hoặc polypeptit axit amin không tự nhiên có thể có mặt với lượng khoảng 30%, khoảng 25%, khoảng 20%, khoảng 15%, khoảng 10%, khoảng 5%, khoảng 4%, khoảng 3%, khoảng 2%, hoặc khoảng 1% hoặc nhỏ hơn tính theo khối lượng chất khô của tế bào. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, nếu polypeptit axit amin tự nhiên hoặc polypeptit axit amin không tự nhiên được sản xuất bằng cách tái tổ hợp bằng các tế bào chủ, thì polypeptit axit amin tự nhiên hoặc

polypeptit axit amin không tự nhiên có thể có mặt trong môi trường nuôi cấy ở mức khoảng 5g/L, khoảng 4g/L, khoảng 3g/L, khoảng 2g/L, khoảng 1g/L, khoảng 750mg/L, khoảng 500mg/L, khoảng 250mg/L, khoảng 100mg/L, khoảng 50mg/L, khoảng 10mg/L, hoặc khoảng 1mg/L hoặc nhỏ hơn tính theo khối lượng chất khô của tế bào. Chỉ nhằm mục đích ví dụ, polypeptit axit amin tự nhiên hoặc polypeptit axit amin không tự nhiên “tinh khiết một cách đáng kể” có thể có mức độ tinh khiết khoảng 30%, khoảng 35%, khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, khoảng 99% hoặc lớn hơn như được xác định bằng các phương pháp thích hợp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp phân tích SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC, và điện di mao quản. Polypeptit hoặc protein theo sáng chế có thể bao gồm tá dược (ví dụ, chất đệm, nước, tá dược được dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó).

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến vector (ví dụ, plasmit, cosmit, thể thực khuẩn, virus, nhưng không chỉ giới hạn ở đó) gồm axit nucleic được xử lý theo sáng chế, tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), aminoacyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), gen kháng thể chứa codon chọn lọc. Theo một phương án, vector là vector biểu hiện. Theo phương án khác, vector biểu hiện gồm đoạn khởi đầu được liên kết một cách có thể hoạt động được với một hoặc nhiều polynucleotit theo sáng chế. Theo phương án khác, tế bào chứa vector mà chứa polynucleotit theo sáng chế. Vector này có thể còn chứa chất thông báo. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất thông báo” đề cập đến thành phần mà có thể được sử dụng để chọn lọc các thành phần đích của hệ cần quan tâm. Ví dụ, chất thông báo có thể bao gồm chất chỉ thị sàng lọc huỳnh quang (ví dụ, protein huỳnh quang xanh), chất chỉ thị phát quang (ví dụ, protein luciferaza đom đóm), chất chỉ thị sàng lọc trên cơ sở ái lực, hoặc gen chỉ thị chọn lọc như *his3*, *ura3*, *leu2*, *lys2*, *lacZ*, β -gal/*lacZ* (β -galactosidaza), *Adh* (alcohol dehydrogenaza), hoặc các chất tương tự.

Các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các tác nhân, các chất và các chất chỉ thị để sàng lọc hoặc chọn lọc gen, polypeptit hoặc protein. Tác nhân chọn lọc hoặc sàng lọc như được sử dụng ở đây, để chỉ tác nhân mà, khi có mặt, cho phép chọn lọc/sàng lọc các thành phần nhất định từ quần thể. Ví dụ, tác nhân chọn lọc hoặc sàng lọc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, chất dinh dưỡng, chất kháng sinh, bước sóng ánh sáng, kháng thể, polynucleotit được biểu hiện (ví dụ, protein

điều biến phiên mã), hoặc các chất tương tự. Tác nhân chọn lọc có thể thay đổi, ví dụ, theo nồng độ, cường độ, v.v.. Theo các phương án khác, các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế bao gồm chất có thể phát hiện. Chất có thể phát hiện cũng có thể được sử dụng. Thuật ngữ “chất có thể phát hiện”, như được sử dụng ở đây, để chỉ tác nhân mà, khi được hoạt hóa, thay đổi, biểu hiện hoặc tương tự, sẽ cho phép chọn lọc/sàng lọc các thành phần nhất định từ quần thể. Ví dụ, chất có thể phát hiện có thể là chất hóa học, ví dụ, axit 5-fluoroorotic (5-FOA), mà trong các điều kiện nhất định, ví dụ, sự biểu hiện của chất thông báo URA3, trở nên có thể phát hiện được, ví dụ, sản phẩm độc hại mà tiêu diệt tế bào mà biểu hiện chất thông báo URA3. Ngoài ra, các phương pháp, các chế phẩm, các tế bào hoặc các dòng tế bào theo sáng chế bao gồm chất chỉ thị chọn lọc hoặc sàng lọc dương tính và/hoặc âm tính. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất chỉ thị chọn lọc hoặc sàng lọc dương tính” để chỉ chất chỉ thị mà nếu có mặt, ví dụ, được biểu hiện, hoạt hóa hoặc tương tự, sẽ dẫn đến sự nhận diện tế bào có chất chỉ thị chọn lọc dương tính từ các tế bào không có chất chỉ thị chọn lọc dương tính. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất chỉ thị chọn lọc hoặc sàng lọc âm tính” để chỉ chất chỉ thị mà nếu có mặt, ví dụ, được biểu hiện, hoạt hóa hoặc tương tự, sẽ cho phép nhận diện tế bào mà không có tính chất mong muốn (ví dụ, so với tế bào mà có tính chất mong muốn).

tRNA trực giao và aminoacyl-tRNA synthetaza trực giao

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dòng tế bào sản xuất ổn định chứa aminoacyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), và gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm (ví dụ các chất trị liệu sinh học bao gồm các kháng thể). Khả năng biến đổi về mặt di truyền các cấu trúc của protein trực tiếp trong các tế bào có nhân điển hình, vượt trên các liên kết hóa học được áp đặt bởi mã di truyền, tạo ra công cụ phân tử có sức mạnh cho cả quy trình tế bào thí nghiệm và quy trình tế bào thực hành. Sáng chế đề xuất các thành phần dịch mã mà mở rộng số lượng các axit amin được mã hóa về mặt di truyền có trong các tế bào có xương sống. Các thành phần này bao gồm các tRNA (ví dụ, các tRNA trực giao (O-tRNA)), các aminoacyl-tRNA synthetaza (ví dụ, synthetaza trực giao (O-RS)), các cặp O-tRNA/O-RS, và các axit amin không tự nhiên.

Cặp trực giao bao gồm O-tRNA, ví dụ, tRNA ức chế, tRNA dịch khung, hoặc các dạng tương tự, và O-RS. O-tRNA không được axyl hóa bằng các synthetaza nội sinh

và có khả năng dàn xếp sự kết hợp của axit amin không tự nhiên vào protein mà được mã hóa bằng polynucleotit mà chứa codon chọn lọc mà được nhận diện bằng O-tRNA in vivo. O-RS nhận diện O-tRNA và ưu tiên aminoacyl hóa O-tRNA bằng axit amin không tự nhiên có trong tế bào có xương sống. Các phương pháp sản xuất các cặp trực giao cùng với các cặp trực giao được sản xuất bằng các phương pháp này và các chế phẩm của các cặp trực giao để sử dụng trong các tế bào có xương sống được bộc lộ trong các công bố đơn quốc tế số WO 2002/086075, có tiêu đề là “Methods và compositions for the production of orthogonal tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase pairs.” Cũng xem, Forster et al., (2003) *Programming peptidomimetic synthetases by translating genetic codes designed de novo* PNAS 100(11):6353-6357; và, Feng et al., (2003), *Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single axit amin change*, PNAS 100(10): 5676-5681; mỗi tài liệu được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Việc phát triển nhiều cặp tRNA/synthetaza trực giao có thể cho phép sự kết hợp đồng thời nhiều axit amin không tự nhiên bằng cách sử dụng các codon khác nhau trong tế bào có xương sống.

tRNA trực giao và aminoacyl-tRNA trực giao là đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, WO 2008/030612, WO 2008/030614, WO 2008/030613, WO 2006/068802, WO 2007/021297, WO 2007/070659, USPN 8,420,792, USPN 9,133,495; USPN 7,736,872; USPN 7,846,689; USPN 7,883,866; USPN 7,838,265; USPN 7,829,310; USPN 7,858,344; USPN 7,632,823; và USPN 9,586,988, mỗi công bố đơn được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Chi tiết bổ sung về việc sản xuất O-RS có thể được phát hiện trong WO 2002/086075 có tiêu đề “Methods and compositions for the production of orthogonal tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase pairs.” Cũng xem, Hamano-Takaku et al., (2000) *A mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosin More Efficiently than Tyrosine*, Journal of Biological Chemistry, 275(51):40324-40328; Kiga et al. (2002), *An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in vertebrate translation and its application in a wheat germ cell-free system*, PNAS 99(15): 9715-9723; và, Francklyn et al., (2002), *Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation*; RNA, 8:1363-1372.

Cặp O-tRNA/O-RS trực giao trong tế bào có xương sống có thể được sản xuất bằng cách nhập khẩu cặp, ví dụ, cặp ức chế vô nghĩa, từ sinh vật khác với sự aminoacyl

hóa các loài chéo không hiệu quả. O-tRNA và O-RS được biểu hiện và được xử lý một cách hữu hiệu trong các tế bào có xương sống và O-tRNA được xuất khẩu một cách hữu hiệu từ nhân vào tế bào chất. Ví dụ, một cặp như vậy là cặp tyrosyl-tRNA synthetaza/tRNA_{CUA} từ *E. coli* (xem, ví dụ, H. M. Goodman, et al., (1968), *Nature* 217:1019-24; và, D. G. Barker, et al., (1982), *FEBS Letters* 150:419-23). *E. coli* tyrosyl-tRNA synthetaza aminoaxyl hóa một cách hữu hiệu *E. coli* tRNA_{CUA} cùng nguồn gốc của nó khi cả hai được biểu hiện trong tế bào chất của *S. cerevisiae*, nhưng không aminoaxyl hóa tRNA của *S. cerevisiae*. Xem, ví dụ, H. Edwards, & P. Schimmel, (1990), *Molecular & Cellular Biology* 10:1633-41; và, H. Edwards, et al., (1991), *PNAS United States of America* 88:1153-6. Ngoài ra, *E. coli* tyrosyl tRNA_{CUA} là cơ chất kém đối với *S. cerevisiae* aminoaxyl-tRNA synthetaza (xem, ví dụ, V. Trezeguet, et al., (1991), *Molecular & Cellular Biology* 11:2744-51), nhưng lại có tác dụng hiệu quả trong việc dịch mã protein trong *S. cerevisiae*. Xem, ví dụ, H. Edwards, & P. Schimmel, (1990) *Molecular & Cellular Biology* 10:1633-41; H. Edwards, et al., (1991), *PNAS United States of America* 88:1153-6; và, V. Trezeguet, et al., (1991), *Molecular & Cellular Biology* 11:2744-51. Hơn nữa, *E. coli* TyrRS không có cơ chế chỉnh sửa để hiệu chỉnh axit amin không tự nhiên được gắn vào tRNA.

Các axit amin không tự nhiên

Việc kết hợp các axit amin không tự nhiên có thể được thực hiện để điều chỉnh cho phù hợp các thay đổi ở cấu trúc và/hoặc chức năng protein bao gồm việc thay đổi kích cỡ, độ axit, tính ái nhân, sự liên kết hydro, tính kỵ nước, khả năng tiếp cận các vị trí đích proteaza, nhắm đích gốc (ví dụ, đối với đàn protein), và các yếu tố tương tự. Các protein mà gồm axit amin không tự nhiên có thể có các tính chất vật lý hoặc xúc tác được tăng cường hoặc thậm chí hoàn toàn mới. Ví dụ, các tính chất dưới đây được biến đổi một cách tùy ý bằng cách đưa axit amin không tự nhiên vào protein: tính độc, sự phân bố sinh học, các tính chất về mặt cấu trúc, các tính chất quang phổ, các tính chất hóa học và/hoặc quang hóa, khả năng xúc tác, thời gian bán thải (ví dụ, thời gian bán thải trong huyết thanh), khả năng phản ứng với các phân tử khác, ví dụ, cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, và các yếu tố tương tự. Các chế phẩm chứa protein mà gồm ít nhất một axit amin không tự nhiên là hữu dụng cho, ví dụ, việc trị liệu, chẩn đoán các enzym xúc tác, các enzym dùng trong công nghiệp, các protein gắn kết (ví dụ, các kháng

thể) mới, và ví dụ, cho việc nghiên cứu cấu trúc và chức năng của protein. Xem, ví dụ, Dougherty, (2000) *Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function*, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652.

Các axit amin không tự nhiên được sử dụng trong các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây có ít nhất một trong số bốn tính chất sau: (1) ít nhất một nhóm chức ở chuỗi mạch bên của axit amin không tự nhiên có ít nhất một đặc tính và/hoặc hoạt tính và/hoặc độ phản ứng trực giao với độ phản ứng hóa học của 20 axit amin được mã hóa di truyền, thông thường (tức là, alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, cystein, glutamin, axit glutamic, glycine, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tyrosin, và valin), hoặc ít nhất là trực giao với độ phản ứng hóa học của các axit amin có trong tự nhiên có trong polypeptit mà chứa axit amin không tự nhiên; (2) các axit amin không tự nhiên được đưa vào về cơ bản là trở về mặt hóa học đối với 20 axit amin được mã hóa di truyền, thông thường; (3) axit amin không tự nhiên có thể được kết hợp một cách ổn định vào polypeptit, tốt hơn là với độ ổn định xứng với các axit amin có trong tự nhiên hoặc trong điều kiện sinh lý điển hình, và còn tốt hơn là sự kết hợp như vậy có thể diễn ra thông qua hệ *in vivo*; và (4) axit amin không tự nhiên chứa nhóm chức oxim hoặc nhóm chức mà có thể biến nạp được vào nhóm oxim bằng cách phản ứng với chất phản ứng, tốt hơn là trong điều kiện mà không phá hủy các đặc tính sinh học của polypeptit mà chứa axit amin không tự nhiên (tất nhiên là trừ khi sự phá hủy các tính chất sinh học như vậy là nhằm mục đích biến đổi/biến nạp), hoặc trong đó sự biến nạp có thể diễn ra trong các điều kiện có nước ở độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 8, hoặc trong đó vị trí phản ứng trên axit amin không tự nhiên là vị trí ái điện tử. Một số lượng bất kỳ axit amin không tự nhiên có thể được đưa vào polypeptit. Các axit amin không tự nhiên cũng có thể chứa các oxim được bảo vệ hoặc được che giấu hoặc các nhóm được bảo vệ hoặc được che mặt nạ mà có thể được biến đổi thành nhóm oxim sau khi khử bảo vệ nhóm bảo vệ hoặc gỡ mặt nạ của nhóm che mặt nạ. Các axit amin không tự nhiên cũng có thể chứa các nhóm carbonyl hoặc dicarbonyl được bảo vệ hoặc được che mặt nạ, mà có thể được biến đổi thành nhóm carbonyl hoặc dicarbonyl sau khi khử bảo vệ nhóm được bảo vệ hoặc gỡ mặt nạ của nhóm được che mặt nạ và nhờ đó sẵn sàng để phản ứng với các hydroxylamin hoặc các oxim để tạo thành các nhóm oxim.

Các axit amin không tự nhiên mà có thể được sử dụng trong các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin gồm các axit amin có các nhóm chức mới, các axit amin mà tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các phân tử khác, các axit amin glycosyl hóa như serin được thế đường, các axit amin được biến đổi hydrat cacbon khác, các axit amin chứa keto, các axit amin chứa aldehyt, các axit amin chứa polyetylen glycol hoặc các polyete khác, các axit amin được thế nguyên tử nặng, các axit amin có thể phân cắt quang học và/hoặc có thể phân cắt hóa học, các axit amin với các chuỗi bên được kéo dài so với các axit amin tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyete hoặc các hydrocarbon mạch dài, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhiều hơn khoảng 5 hoặc nhiều hơn khoảng 10 cacbon, các axit amin chứa đường được liên kết với cacbon, các axit amin có hoạt tính oxy hóa khử, các axit amin chứa amino thioaxit, và các axit amin chứa một hoặc nhiều gốc độc hại.

Theo một số phương án, các axit amin không tự nhiên chứa gốc sacarit. Ví dụ về các axit amin như vậy bao gồm *N*-axetyl-L-glucosaminyl-L-serin, *N*-axetyl-L-galactosaminyl-L-serin, *N*-axetyl-L-glucosaminyl-L-threonin, *N*-axetyl-L-glucosaminyl-L-asparagin và *O*-mannosaminyl-L-serin. Ví dụ về các axit amin như vậy còn bao gồm các ví dụ trong đó liên kết N- hoặc O- có trong tự nhiên giữa axit amin và sacarit được thay thế bằng liên kết cộng hóa trị không thường được thấy trong tự nhiên – bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alken, oxim, thioete, amit và các dạng tương tự. Các ví dụ về các axit amin như vậy còn bao gồm các sacarit mà không thường được thấy trong các protein có trong tự nhiên như 2-deoxy-glucoza, 2-deoxygalactoza và các chất tương tự.

Các ví dụ cụ thể về các axit amin không tự nhiên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, *p*-axetyl-L-phenylalanin, *p*-propargyloxyphenylalanin, *O*-metyl-L-tyrosin, L-3-(2-naphtyl)alanin, 3-metyl-phenylalanin, *O*-4-alyl-L-tyrosin, 4-propyl-L-tyrosin, tri-*O*-axetyl-GlcNAc β -serin, L-Dopa, phenylalanin được flo hóa, isopropyl-L-phenylalanin, *p*-azido-L-phenylalanin, *p*-axyl-L-phenylalanin, *p*-benzoyl-L-phenylalanin, L-phosphoserin, phosphoserin, phosphonotyrosin, *p*-iodo-phenylalanin, *p*-bromophenylalanin, *p*-amino-L-phenylalanin, và isopropyl-L-phenylalanin, và các chất tương tự.

Các gốc hóa học được kết hợp vào các polypeptit thông qua sự kết hợp của các axit amin không tự nhiên vào các polypeptit như vậy tạo ra rất nhiều ưu điểm và cách vận dụng các polypeptit. Ví dụ, khả năng phản ứng duy nhất của nhóm chức carbonyl hoặc dicarbonyl (bao gồm nhóm chức keto- hoặc aldehyt) cho phép biến đổi chọn lọc các protein với bất kỳ trong số các chất phản ứng chứa hydrazin hoặc chứa hydroxylamin *in vivo* và *in vitro*. Axit amin không tự nhiên nguyên tử nặng, ví dụ, có thể là hữu dụng để định pha dữ liệu cấu trúc tia x. Việc đưa vào nguyên tử nặng đặc hiệu vị trí bằng cách sử dụng các axit amin không tự nhiên còn cung cấp khả năng chọn lọc và tính linh hoạt trong việc chọn lựa các vị trí cho các nguyên tử nặng. Các axit amin không tự nhiên phản ứng quang học (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin với các chuỗi mạch bên benzophenon và arylazit (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phenylazit)), ví dụ, cho phép liên kết ngang quang học hiệu quả *in vivo* và *in vitro* các polypeptit. Các ví dụ về các axit amin không tự nhiên phản ứng quang học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, p-azido-phenylalanin và p-benzoyl-phenylalanin. Polypeptit với các axit amin không tự nhiên phản ứng quang học này sau đó có thể được liên kết ngang theo ý muốn bằng cách kích thích sự kiểm soát theo thời gian tạo ra nhóm phản ứng quang học. Trong ví dụ không giới hạn, nhóm methyl của axit amin không tự nhiên có thể được thể bằng nhóm được đánh dấu đồng vị, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm methyl, để làm mẫu thử cấu trúc cục bộ và động lực với, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc sử dụng cộng hưởng từ hạt nhân và phổ dao động.

Sự hấp thu axit amin không tự nhiên bằng tế bào có nhân điển hình là một vấn đề mà thường được xem xét khi thiết kế và chọn lọc các axit amin không tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc để kết hợp vào polypeptit hoặc protein. Ví dụ, mật độ điện tích cao của các α -axit amin gợi ý rằng các hợp chất này dường như không thể thấm vào tế bào. Các axit amin tự nhiên được hấp thu vào tế bào có nhân điển hình thông qua tập hợp các hệ vận chuyển trên cơ sở protein. Việc sàng lọc nhanh có thể được thực hiện để đánh giá các axit amin không tự nhiên nào, nếu có, sẽ được hấp thu bởi các tế bào. Xem, ví dụ, thử nghiệm độc tính trong, ví dụ công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/198637 có tiêu đề "Protein Arrays", tài liệu này được kết hợp vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn, và Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) *Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96:4780-

4785. Mặc dù việc hấp thu được phân tích một cách dễ dàng với các thử nghiệm khác nhau, nhưng cách khác cho việc thiết kế các axit amin không tự nhiên mà có thể tuân theo các quy trình hấp thu tế bào là tạo ra các quy trình sinh tổng hợp để tạo ra các axit amin *in vivo*.

Điển hình là, axit amin không tự nhiên mà được sản xuất thông qua sự hấp thu tế bào như được mô tả ở đây được sản xuất với nồng độ đủ để sinh tổng hợp protein hiệu quả, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lượng tế bào tự nhiên, nhưng không đến mức độ mà ảnh hưởng đến nồng độ của các axit amin khác hoặc các nguồn tế bào xả ra khác. Các nồng độ điển hình được sản xuất theo cách này là khoảng 10 mM đến khoảng 0,05 mM.

Nhiều quy trình sinh tổng hợp đã có trong các tế bào để sản xuất các axit amin và các hợp chất khác. Trong khi phương pháp sinh tổng hợp đối với axit amin không tự nhiên cụ thể có thể không tồn tại trong tự nhiên, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong tế bào, các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây tạo ra các phương pháp như vậy. Ví dụ, các quy trình sinh tổng hợp đối với các axit amin không tự nhiên có thể được tạo ra trong tế bào chủ bằng cách bổ sung các enzym mới hoặc bằng cách biến đổi các quy trình tế bào chủ đang có. Các enzym mới bổ sung bao gồm các enzym có trong tự nhiên hoặc các enzym được tạo ra bằng cách nhân tạo. Ví dụ, quy trình sinh tổng hợp *p*-aminophenylalanin (như được thể hiện trong ví dụ trong công bố đơn quốc tế số WO 2002/085923 có tiêu đề là “In vivo incorporation of unnatural amino acids”) dựa vào việc bổ sung kết hợp của các enzym đã biết từ các sinh vật khác. Các gen đối với các enzym này có thể được đưa vào tế bào có nhân điển hình bằng cách biến nạp tế bào với plasmit chứa các gen này. Các gen này, khi được biểu hiện trong tế bào, sẽ cung cấp quy trình nhờ enzym để tổng hợp hợp chất mong muốn. Ví dụ về các loại enzym mà tùy ý được bổ sung là được cung cấp ở đây. Các trình tự enzym bổ sung được phát hiện, ví dụ, trong Genbank. Các enzym được tạo ra bằng cách nhân tạo có thể được bổ sung vào tế bào theo cách thức như nhau. Theo cách thức này, cơ chế tế bào và nguồn tế bào được điều khiển để tạo ra các axit amin không tự nhiên.

Rất nhiều phương pháp có sẵn để sản xuất các enzym mới để sử dụng trong các quy trình sinh tổng hợp hoặc để phát triển các quy trình hiện có. Ví dụ, sự tái tổ hợp đệ quy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, như được phát triển bởi Maxygen, Inc. (có

sẵn trên mạng tại website www.maxygen.com), có thể được sử dụng để phát triển các enzym và các quy trình mới. Xem, ví dụ, Stemmer (1994), *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, Nature 370(4):389-391; và, Stemmer, (1994), *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751. Tương tự, DesignPath™, được phát triển bởi Genencor (có sẵn trên mạng tại website www.genencor.com) tùy ý được sử dụng cho việc xử lý quy trình chuyển hóa, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý quy trình để tạo ra axit amin không tự nhiên trong tế bào. Công nghệ này xây dựng lại các quy trình hiện có trong các sinh vật chủ bằng cách sử dụng sự kết hợp các gen mới, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen được nhận diện thông qua các hệ gen chức năng, sự tiến hóa và thiết kế phân tử. Diversa Corporation (có sẵn trên mạng tại website www.diversa.com) cũng đề cập đến công nghệ để sàng lọc nhanh các thư viện gen và các quy trình gen, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc tạo ra các quy trình mới để sản xuất bằng cách sinh tổng hợp các axit amin không tự nhiên.

Điển hình là, axit amin không tự nhiên mà được sản xuất bằng quy trình sinh tổng hợp được xử lý như được mô tả ở đây được sản xuất với nồng độ đủ để sinh tổng hợp protein hiệu quả, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lượng tế bào tự nhiên, nhưng không đến mức độ mà ảnh hưởng đến nồng độ của các axit amin khác hoặc các nguồn tế bào xả ra khác. Các nồng độ điển hình được sản xuất *in vivo* theo cách này là khoảng 10 mM đến khoảng 0,05 mM. Khi tế bào được biến nạp bằng plasmit chứa các gen được sử dụng để sản xuất các enzym mong muốn cho quy trình cụ thể và axit amin không tự nhiên được tạo ra, các phương pháp chọn lọc *in vivo* tùy ý được sử dụng để tối ưu thêm nữa sự sản xuất axit amin không tự nhiên về cả khả năng tổng hợp protein ribosom và sự sinh trưởng tế bào. Các axit amin không tự nhiên được mô tả ở đây có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong lĩnh vực này hoặc sử dụng các kỹ thuật được mô tả ở đây hoặc bằng cách kết hợp chúng.

Mô tả đặc trưng sản phẩm

Việc mô tả đặc trưng toàn diện các chất trị liệu sinh học là cần thiết để đáp ứng các tiêu chuẩn an toàn được thiết lập bởi các cơ quan điều hành và để giúp đảm bảo hiệu lực thuốc protein. Việc mô tả đặc trưng sinh dược học là cần thiết ở tất cả các giai đoạn của quá trình phát triển và sản xuất thuốc. Do đó, việc theo dõi chất lượng sản phẩm

trong mỗi giai đoạn trong số các giai đoạn phát triển dòng tế bào, xử lý dòng tế bào, và nuôi cấy tế bào là rất quan trọng để đảm bảo dòng đúng được chọn vì chất lượng sản phẩm và năng suất thường phụ thuộc cả vào dòng và điều kiện nuôi cấy tế bào. Trong các quy trình chọn lọc dòng, các thông số chất lượng sản phẩm được nhấn mạnh, các thông số này dường như là đặc hiệu đối với dòng. Các thông số này bao gồm, ví dụ, các quy trình enzym, như glycosyl hóa và cắt phân giải protein, và các vấn đề di truyền, như đột biến, dịch khung, và các dạng ghép nối, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Việc nhấn mạnh cũng được đặt vào các thông số phân tử mà được biết là góp phần vào hoạt tính sinh học. Ví dụ, tính độc gây hại tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) dựa vào sự fucosyl hóa, và tính độc gây hại tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity: CDC) là phụ thuộc vào sự galactosyl hóa. Các khác biệt quan sát được giữa các dòng ở phạm vi biến đổi hóa học, như sự oxy hóa hoặc sự khử amit, có thể được làm hẹp hoặc làm giảm thông qua sự tối ưu hóa quy trình tinh chế hoặc bằng cách điều chỉnh các thông số quy trình nuôi cấy tế bào và các khác biệt này sẽ là ít đáng kể. (Lewis et al, 2010).

Theo các phương án của sáng chế, tác động của việc chỉnh sửa hệ gen CRISPR-Cas9 và việc tách dòng tế bào đơn đối với chất lượng sản phẩm của tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện chất trị liệu sinh học được kiểm tra. Các thuộc tính chất lượng sản phẩm được đánh giá trong việc chọn lọc dòng đối với các tế bào được xử lý CRISPR-Cas9 có thể bao gồm tính toàn vẹn phân tử, sự kết tụ, sự glycosyl hóa và tính không đồng nhất về điện tích, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Tính toàn vẹn phân tử là phụ thuộc vào dòng và có thể được gây ra bởi các vấn đề về di truyền hoặc sự cắt phân giải protein. Các phương pháp, các kỹ thuật và các thử nghiệm khác nhau, tất cả đều đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, có thể được sử dụng để đánh giá tính toàn vẹn phân tử với các tiêu chuẩn để tránh sự đột biến trình tự axit amin hoặc các kháng thể bị cắt ngắn. Các phương pháp, kỹ thuật và thử nghiệm như vậy có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giải trình tự cDNA, lập bản đồ peptit, CE-SDS hoặc SDS-PAGE. Sự kết tụ có thể được đo bằng cách sử dụng, ví dụ, phương pháp sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC). Các tiêu chuẩn cho phương pháp phân tích này là để tránh mức kết tụ cao mà có thể có tính miễn dịch. Một số mức kết tụ có thể được làm giảm bởi sự tối ưu hóa quy trình nuôi cấy tế bào hoặc được loại bỏ thông qua sự tối ưu

hóa quy trình tinh chế. Sự glycosyl hóa là thuộc tính phân tử và sau dịch mã quan trọng khác mà phụ thuộc nhiều vào dòng tế bào. Các thử nghiệm glycan trên cơ sở HPLC hoặc CE, đã được biết rõ trong lĩnh vực này, thường được sử dụng để đánh giá sự glycosyl hóa ở giai đoạn chọn lọc dòng với mục đích tránh mức cao của các dạng glycosyl hóa khác thường. Tính không đồng nhất về điện tích, mà có thể xảy ra do (các) biến đổi hóa học, phụ thuộc nhiều vào các quy trình nuôi cấy tế bào và do đó có vai trò ít đáng kể hơn trong giai đoạn chọn lọc dòng. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp, các kỹ thuật và các thử nghiệm mà qua đó để xác định các thông số chất lượng sản phẩm đặc hiệu với dòng của tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện chất trị liệu sinh học theo sáng chế bao gồm, ví dụ, tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện kháng Her2, kháng CD70, hoặc kháng PSMA, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Phổ khối nguyên vẹn (MS) cung cấp thông tin về khối lượng chính xác của protein và độ giàu tương đối của các chất đồng dạng của nó. Sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC), còn được biết là sắc ký rây phân tử, là phương pháp sắc ký trong đó các phân tử trong dung dịch được phân tách bằng kích thước của chúng, và trong một số trường hợp bằng khối lượng phân tử của chúng. Theo sáng chế, MS được sử dụng trong việc chứng minh rằng đối với các dòng được xử lý và các dòng tế bào gốc được tạo ra, trình tự axit amin sơ cấp là giống như được suy ra từ trình tự cDNA trong việc xác nhận định danh của mAb. SEC cũng được biến đổi và sử dụng để xác định độ tinh khiết và tính nhất quán trong sản xuất của các kháng thể đơn dòng (mAb) được tạo ra.

Bộ kit

Các bộ kit cũng là đối tượng của sáng chế trong đó bộ kit này chứa một hoặc nhiều đồ chứa chứa thành phần bất kỳ trong số các thành phần của sáng chế. Bộ kit có thể chứa một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được xử lý hoặc trình tự polynucleotit chứa hoặc mã hóa aminoacyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), và/hoặc tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), và/hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm. Bộ kit có thể chứa ít nhất một axit amin không tự nhiên. Theo phương án khác, bộ kit có thể chứa tế bào hoặc dòng cùng với hoặc tách biệt với aminoacyl tRNA synthetaza trực giao (O-RS), tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), hoặc gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm. Thành phần bất kỳ trong số các thành phần, các nguyên liệu được bộc lộ ở đây có thể được cung cấp

một cách riêng rẽ hoặc cùng nhau trong một hoặc nhiều đồ chứa. Theo phương án khác, bộ kit còn chứa các vật hướng dẫn để tạo ra polypeptit hoặc protein cần quan tâm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Cần hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và nhiều cải biến hoặc thay đổi khác nhau từ đó sẽ được đề xuất đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này và nằm trong tinh thần và nội dung của sáng chế và phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Chiến lược sử dụng cách xử lý dòng tế bào nền tảng trong công nghiệp phát triển thuốc: từ khám phá đến sản xuất

Trong viễn cảnh về công nghiệp, sự phát triển dòng tế bào nền tảng không chỉ hỗ trợ mọi giai đoạn của sự phát triển thuốc bằng cách cung cấp vật liệu thích hợp với giai đoạn, mà còn tạo ra dòng tế bào sản xuất ổn định, được đặc trưng rõ trước khi đưa sản phẩm vào giai đoạn lâm sàng và thương mại hóa (FIG.1). Để hỗ trợ tất cả các giai đoạn của quá trình phát triển thuốc một cách hiệu quả, nhiều cách để cung cấp vật liệu chứa dòng tế bào ổn định, lô lớn ổn định, dòng tế bào tạm thời, đã được phát triển như được minh họa trên FIG.1. Đối với việc chọn lọc phân tử ứng viên kháng thể, sự biểu hiện tạm thời được sử dụng để tạo ra sản phẩm lượng nhỏ một cách nhanh chóng. Lô lớn ổn định là phương án khác để tạo ra lượng lớn vật liệu cho nghiên cứu phát triển (tinh chế, phối chế, phát triển phương pháp phân tích) cho tới nghiên cứu độc tính cho phép đối với thuốc mới nghiên cứu (IND: Investigational New Drug) (100-200g) trong 8 tuần. Khi phân tử dẫn đầu được xác định, dòng tế bào ổn định được tạo ra trong 6 tháng với độ chuẩn lên tới 1,5g/L. Điều này tạo ra sự hỗ trợ cho thử nghiệm lâm sàng và sự thương mại hóa tiềm năng.

Ví dụ 2: Quy trình chung để sử dụng dòng tế bào nền tảng trong việc phát triển dòng tế bào năng suất cao.

FIG.2 mô tả sơ đồ để phát triển dòng tế bào ổn định. Các tác giả sáng chế đã thực hiện chiến lược này để tạo ra các dòng tế bào sản xuất được đặc trưng rõ, ổn định, năng suất cao có thể mở rộng quy mô để sản xuất theo chuẩn công nghiệp, để hỗ trợ thử nghiệm lâm sàng và thương mại hóa trong khi vẫn duy trì được biên dạng độ an toàn và hiệu lực mong muốn của chất trị liệu. Vector biểu hiện của động vật có vú mang gen cần

quan tâm (GOI) và (các) chất chỉ thị chọn lọc được chuyển nhiễm vào dòng tế bào nền tảng CHO được xử lý để tạo ra lô nhỏ (mini-pool: MP) trong 96 lỗ. Sau khi chọn lọc và sàng lọc, các MP trên cùng được gieo cấy dưới mật độ một tế bào đơn trên một lỗ sử dụng FACS sau đó chụp ảnh với độ phân giải cao để thu được dòng tế bào dòng vô tính. Các dòng tế bào thu được từ tế bào đơn này được sàng lọc và các dòng trên cùng được chuyển vào nhóm nuôi cấy tế bào để phát triển quy trình. Việc chọn lọc dòng cuối cùng để sản xuất vật liệu lâm sàng được dựa trên sự sinh trưởng, năng suất và PQ. Toàn bộ quy trình CLD diễn ra trong 6 tháng và năng suất đặc hiệu đối với tế bào là 20-30 picogram trên tế bào trên ngày. Để ổn định trong thời gian hơn 10 tuần để làm nền cho việc sản xuất với thiết bị phản ứng sinh học dung tích 12000L, dòng tế bào và quy trình cấp theo mẻ có thể được mở rộng quy mô đến 2000L để hỗ trợ thử nghiệm lâm sàng đang diễn ra.

Ví dụ 3: Tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào năng suất cao

Việc tối ưu hóa sự phát triển dòng tế bào năng suất cao có thể đạt được từ một số khía cạnh như sự kết tủa tế bào đơn phụ thuộc FACS (FIG.3A), quy trình bất hoạt CRISPR (FIG.3B) và sự tối ưu hóa quy trình phát triển dòng tế bào (FIG.3C).

Hướng dẫn điều chỉnh (ICH Q5D) chỉ dẫn sự tách dòng cơ chất tế bào "từ gốc tế bào đơn" trong quá trình phát triển dòng tế bào. Trong những năm qua, mong muốn tạo ra tính bảo đảm cao của khả năng nhân dòng đã được thiết lập (Kennett, 2014; Novak, 2017; Welch, 2017) bởi FDA và ngành công nghiệp. FDA đã khuyến nghị rằng hai hiệp tách dòng pha loãng hạn chế (limiting dilution cloning: LDC) ở mật độ gieo cấy đủ thấp ($<0,5$ tế bào/lỗ) sẽ cung cấp khả năng chấp nhận được là dòng tế bào này là dòng vô tính. Hơn nữa, gần đây, một hiệp tách dòng thông qua FACS hoặc LDC với sự can thiệp hỗ trợ đủ, như sử dụng công nghệ chụp ảnh, đã tạo ra tính bảo đảm chấp nhận được của khả năng nhân dòng khi sử dụng các phương pháp đã có hiệu lực. Do đó các tác giả sáng chế đã biến đổi và phê chuẩn việc kết tủa tế bào đơn FACS (FACS single cell deposition: FACS SCD) được kết hợp với việc chụp ảnh độ phân giải cao làm một hiệp của bước tách dòng trong quy trình phát triển dòng tế bào để rút ngắn thời gian cũng như để đáp ứng yêu cầu điều chỉnh đối với tính đảm bảo của khả năng nhân dòng.

Như được thể hiện ở đây (FIG.3A), so với việc tách dòng pha loãng giới hạn truyền thống (LDC), FACS SCD đã tạo ra sự kết tủa và tốc độ phát triển nhanh có thể

so sánh. Tuy nhiên, hiệu suất phân lập sản phẩm sinh trưởng nhanh đơn dòng (tỷ lệ số lỗ chứa các khuẩn lạc thu được từ tế bào đơn chia cho tổng số lỗ) sử dụng phương pháp FACS là gấp 1,5 lần so với hiệu suất sử dụng LDC (49% so với 32%), tiết kiệm đáng kể thời gian và nguồn lực về việc chụp ảnh và sàng lọc. Việc tối ưu hóa rộng rãi ở thiết bị FACS và biến số lực g ly tâm cùng với sự phân tích hình ảnh kỹ lưỡng đối với mỗi lỗ được thực hiện để phê chuẩn phương pháp. Khả năng nhân đơn dòng của khuẩn lạc thu được từ tế bào đơn được quan sát là >99,5%.

Việc xử lý di truyền dòng tế bào sản xuất bằng cách sử dụng công nghệ chỉnh sửa hệ gen CRISPR-cas9 đã được kiểm tra để nhắm đích bằng các gen để cải thiện sự sinh trưởng tế bào và năng suất tế bào trong khi vẫn duy trì chất lượng sản phẩm mong muốn. Quy trình bất hoạt CRISPR được minh họa trong FIG.3B. Công cụ tìm kiếm đích trên mạng, CRISPy, được sử dụng để nhận diện nhanh chóng các trình tự đích gRNA tốt hơn là trong các exon sớm với sự không có sai đích trong các tế bào CHO-K1. Các gRNA được tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú pGNCV đồng biểu hiện với phiên bản được tối ưu hóa codon CHO của Cas9. Dòng tế bào sản xuất được chuyển nhiễm bằng vector pGNCV để tạo ra lô tế bào sau đó tách dòng để nhận diện các thể phân lập tế bào đơn với sự bất hoạt gen. Tần suất indel (insert/deletion: gắn chèn, xóa bỏ) từ các kết quả tập hợp của nhiều dự án là 30-90% và 50-80% lần lượt đối với lô tế bào và các thể phân lập tế bào đơn. Phương pháp thẩm tách Western đã tái xác nhận hiệu suất bất hoạt là 50-90% đối với các thể phân lập tế bào đơn bất hoạt đã được xác minh bằng sự giải trình tự ADN. Các dòng tế bào đơn bất hoạt được đem đánh giá tiếp về năng suất, thử nghiệm chết tế bào theo chương trình và chất lượng sản phẩm để chọn lọc ra dòng sản xuất để sản xuất cGMP. Các đích được phê chuẩn để được sử dụng để bất hoạt được kiểm tra bằng cách sử dụng dòng tế bào sản xuất. Điều này đã được chứng minh là có lợi cho việc đánh giá năng suất và sự tăng trưởng và có khả năng áp dụng cho việc phá vỡ trong dòng tế bào chủ nền tảng sử dụng CRISPR để gia tăng hiệu suất phân lập dòng tế bào sản xuất cao đối với gen tương lai cần quan tâm.

Quy trình phát triển dòng tế bào cũng đã được tối ưu hóa cùng với sự tiến hóa dòng tế bào nền tảng. Bằng cách sử dụng dòng tế bào nền tảng thứ nhất làm chủ, cần ba đến bốn bước (hoặc 9 tháng đến 12 tháng) để tạo ra dòng tế bào sản xuất tạo ra độ chuẩn 0,5-1 g/L (FIG.3C). Quy trình phát triển dòng tế bào hiện tại đã được rút ngắn xuống

còn hai bước hoặc 6 tháng, được quy cho là do dòng tế bào nền tảng được cải tiến và việc tách dòng một bước như được minh họa trên (FIG.2).

Ví dụ 4: Dòng tế bào nền tảng biểu thị sự chết tế bào theo chương trình quá mức trong môi trường nuôi cấy

Thử nghiệm Annexin V được sử dụng để đánh giá khả năng sống sót của các tế bào CHO-S và dòng tế bào nền tảng 4E2 mà chứa cặp trực giao được kết hợp về mặt di truyền tRNA/aminoacyl-tRNA synthetase đặc hiệu đối với *para*-acetyl-L-phenylalanine. Như được thể hiện trên FIG.4, so với các tế bào CHO-S (khả năng sống sót là 96%), 4E2 biểu hiện sự chết tế bào theo chương trình quá mức (khả năng sống sót là 85%). Các quan sát thể hiện các tế bào 4E2 mà có cặp tRNA synthetase và tRNA được kết hợp vào (đặc hiệu với, ví dụ, axit amin không tự nhiên *para*-acetylalanine, *pAF*) biểu thị sự chết tế bào theo chương trình quá mức so với các tế bào đối chiếu của nó, các tế bào CHO-S.

Ví dụ 5: Thiết kế và điều chế các cấu trúc BAX- và BAK-CRISPR

Các cấu trúc CRISPR được thiết kế để nhận diện các vị trí đích trong gen BAX hoặc BAK và tạo các điểm phá vỡ sợi kép trong các tế bào CHO sau khi chuyển nhiễm. Các thiết kế ví dụ được thể hiện trên các FIG.5, 6 và 7.

Sự bất hoạt của gen có thể được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình lần lượt hoặc quy trình đồng thời. Sự bất hoạt kép BAX và BAK cũng có thể đạt được bằng quy trình bất hoạt lần lượt. Nói chung, bước thứ nhất là để áp dụng ba cấu trúc gRNA nhắm đích BAX lên dòng tế bào biểu hiện kháng HER2. Sau khi thực hiện bước sản xuất tương tự được sử dụng trong quy trình bất hoạt đồng thời, dòng tế bào mà có BAX bất hoạt được phân lập. Sử dụng dòng tế bào này, hai cấu trúc gRNA nhắm đích BAK được áp dụng để đạt được sự bất hoạt BAK. Sau khi xác minh bằng cách giải trình tự ADN hệ gen, dòng tế bào bất hoạt kép BAX và BAK được xác nhận là đạt được bằng quy trình lần lượt như vậy.

Thiết kế CRISPR gRNA của gen BAX được nhắm đích trong các tế bào CHO được minh họa trên FIG.5. Như được thể hiện, ba vị trí gRNA nhắm đích gen BAX trong các tế bào CHO được thiết kế bằng cách sử dụng công cụ thiết kế CRISPR gRNA trực tuyến đặc hiệu đối với hệ gen CHO-K1 (xem tại website

www.staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy/). Trình tự ADN hệ gen của gen BAX, exon 1 và exon 2 được thể hiện trong phần bôi màu xám. Trình tự khác của BAX được thể hiện dưới các ký tự không bôi màu. Các đoạn nối được sử dụng trong việc giải trình tự PCR được thể hiện ở phần đầu và phần cuối của trình tự lần lượt làm đoạn nối thuận và đoạn nối nghịch. Như được thể hiện trên bảng 1, ba vị trí BAX (mỗi vị trí có trình tự dài 19-nucleotit, trình tự -NGG PAM (motif liền kề đoạn tiền đệm: protospacer adjacent motif) được bỏ qua trong quá trình thiết kế do bản chất của plasmit pGCNV mà là dạng cắt mở và có hai đầu dính, như được thể hiện trên FIG.7) là như sau: vị trí-I (AGGCACTCGCTCAACTTCG) (SEQ ID NO: 1), vị trí-II (TGAGTGTGACCGGCTGTTG) (SEQ ID NO: 2) và vị trí-III (TTTCATCCATGTATCGAGCT) (SEQ ID NO: 3).

Như được thể hiện trên FIG.6, CRISPR được sử dụng để thiết kế gRNA của gen BAK được nhắm đích trong các tế bào CHO. FIG.6 biểu thị trình tự ADN hệ gen của gen BAK trong các tế bào CHO trong đó hai trình tự gRNA đã được diễn giải. Trình tự ADN hệ gen của gen BAK, exon 2 và exon 3 được thể hiện trong phần bôi màu xám. Trình tự khác của BAK được thể hiện dưới các ký tự không bôi màu. Các đoạn nối được sử dụng trong việc giải trình tự PCR được thể hiện ở phần đầu và phần cuối của trình tự lần lượt làm đoạn nối thuận và đoạn nối nghịch. Ba vị trí BAK được thể hiện trên bảng 1, là như sau: (SEQ ID NO: 4) BAK-IGAACAAATTGTCCATCTCG Exon 2, (SEQ ID NO: 5) BAK-IIATGCTGTAAGAACGGGAGT Exon 3, (SEQ ID NO: 6) BAK-IIIIGAAGCCGGTCAAACCACGT Exon 3.

Các plasmit CRISPR được sử dụng trong các thử nghiệm bất hoạt BAX hoặc BAK cũng được thiết kế như được thể hiện trên FIG.7 bằng cách sử dụng vector có bán trên thị trường, Genart CRISPR Nuclease Vector (pGCNV), (Thermo Fisher Scientific). Dạng đầy đủ của plasmit pGCNV được điều chế bằng cách chèn phức hợp oligo (oligo-duplex) vào vector pGCNV cắt mở mà chứa chỗ cho phức hợp oligo và được thiết kế với các trình tự gRNA dài 19 nucleotit đặc hiệu để nhắm đích vị trí gen riêng rẽ (xem Bảng 1 dưới đây).

Để tạo thành phức hợp oligo mà có thể được chèn vào pGCNV, năm (5) cặp oligo được tổng hợp như được bộc lộ trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Các trình tự oligo được sử dụng để điều chế các cấu trúc CRISPR bất hoạt BAX và BAK

SEQ ID NO.	Tên	Trình tự Oligo
83	BAX-I-F	AGGCACTCGCTCAACTTCGGTTTT
84	BAX-I-R	CGAAGTTGAGCGAGTGCCTCGGTG
85	BAX-II-F	TGAGTGTGACCGGCTGTTGGTTTT
86	BAX-II-R	CAACAGCGCCTCACACTACCGGTG
87	BAX-III-F	TTTCATCCATGTATCGAGCTGTTTT
88	BAX-III-R	AGCTCGATACTGGATGAAGACGGTG
89	BAK-I-F	GAACAAATTGTCCATCTCGGTTTT
90	BAK-I-R	CGAGATGGACAATTTGTTCCGGTG
91	BAK-II-F	ATGCTGTAAGAACGGGAGTGTGTTTT
92	BAK-II-R	CACTCCCGTTCTTACAGCATCGGTG

Để tạo ra các oligonucleotit sợi kép, mỗi cặp oligo được ủ ở nồng độ cuối cùng là 50 uM trong dung dịch đệm ủ oligonucleotit ở 95°C trong 4 phút trước khi làm nguội xuống 25°C trong thời gian 5 đến 10 phút. Sau khi pha loãng 10 lần (5 uM), phức kép oligonucleotit có thể được sử dụng trong quy trình gắn kết. Sự gắn kết có thể được thực hiện bằng bộ kit gắn kết nhanh Roche (Roche). Trong 21 ul hỗn hợp phản ứng chứa 3 ul vector pGCNV, 1 ul phức kép oligo, 2 ul dung dịch đệm pha loãng ADN, 4 ul nước, 10 ul dung dịch đệm T4 DNA ligaza và 1 ul T4 ligaza. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 5 phút. 3 ul hỗn hợp gắn kết có thể được sử dụng để biến nạp *E. coli* để sàng lọc các dòng dương tính.

Ví dụ 6: Các ví dụ về các axit amin không tự nhiên được sử dụng trong sáng chế

Sáng chế bao gồm sự kết hợp đặc hiệu về vị trí của các axit amin không tự nhiên hoặc không chính tắc trong gen cần quan tâm bằng cách sử dụng cặp aminoacyl-tRNA synthetaza trực giao/ARN vận chuyển được bàn luận ở đây. FIG.8 cung cấp số lượng đại diện các axit amin không tự nhiên mà có thể được sử dụng. Theo cách ví dụ, một axit amin không tự nhiên như vậy, *para*-axetyl-L-phenylalanin (pAF), được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để bắt đầu việc sản xuất gen được lắp ráp đầy đủ cần quan tâm, ví dụ các chất trị liệu sinh học chứa các kháng thể đơn dòng, với sự kết hợp đặc hiệu về vị trí của pAF.

Ví dụ 7: Sự tạo ra và phân tích các dòng tế bào biểu hiện kháng HER2 thiếu BAX/BAK

Sự cắt bỏ đồng thời BAX và BAK được thực hiện bằng cách sử dụng công nghệ CRISPR. Sự chuyển nhiễm tạm thời được thực hiện bằng cách sử dụng ba cấu trúc gRNA nhắm đích BAX và hai cấu trúc gRNA nhắm đích BAK trên dòng tế bào biểu hiện kháng HER2 L082. Sự chuyển nhiễm của các plasmit được thực hiện bằng cách điện chuyển. Trong quá trình điện chuyển, 6 triệu tế bào được trộn với 2 μ g plasmit ADN trong 100 μ l dung dịch điện chuyển. Các tế bào được chuyển nhiễm trong Amaxa Nucleofector II (Lonza) sử dụng chương trình U-023 và được thu hồi trong 0,5 ml môi trường ấm. Việc khảo sát được thực hiện trên lô tế bào được chuyển nhiễm để đo hiệu suất bất hoạt như được bộc lộ trong ví dụ 3, FIG.3B. Bảy ngày sau khi được chuyển nhiễm đồng thời bằng ba cấu trúc gRNA được nhắm đích BAX cùng với hai cấu trúc gRNA được nhắm đích BAK, các tế bào được tách dòng phụ ở mật độ gieo cấy 0,5 tế bào/lỗ vào các đĩa 96 lỗ thành các dòng đơn bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng giới hạn. Mỗi tế bào đơn trong đĩa 96 lỗ được phát triển trong khoảng 2 đến 3 tuần để tạo ra số lượng tế bào đủ để được sử dụng cho bước phân tích di truyền tiếp theo. Các dòng thu được từ tế bào đơn được chọn lọc và sàng lọc thông qua các đĩa 96 lỗ, 24 lỗ và 24 lỗ sâu về năng suất, sự sinh trưởng, và kiểu di truyền bằng cách giải trình tự ADN đích.

Ví dụ 8: Phân tích ADN đối với các dòng biểu hiện kháng HER2 và thiếu BAX và BAK

Các tế bào CHO được vô hoạt BAX và BAK được tạo ra và phân tích ở mức độ di truyền. Ba plasmit mã hóa ba trình tự gRNA khác nhau nhắm đích các vị trí BAK được đồng chuyển nhiễm vào các dòng tế bào ổn định thu được từ tế bào CHO mà đã được xử lý để có pAF-RS và pAF-tRNA cộng với gen kháng HER2 hoặc mảnh của nó. 72 giờ sau khi chuyển nhiễm, ADN hệ gen được phân lập và một phần của locut BAK được khuếch đại PCR bằng cách sử dụng các oligo K-I-II-F và K-I-II-R (bảng 2; 5'-CAGACAGCCTTCTCTTGCT-3' (SEQ ID NO: 45) và 5'-AGAGCTCCTGAGAGGCATGA-3' (SEQ ID NO: 46)). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hỗn hợp chính PCR Phusion High-Fidelity (New England Biolabs, Ipswich, MA). Các điều kiện là như sau: sau khi làm biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút, 30 chu trình PCR được thực hiện với sự biến tính 95°C trong 20 giây, sau đó là 30 giây ủ ở 60°C, sau đó là 1 phút ở 72°C. Sau 30 chu trình, phản ứng được ủ ở 72°C trong

5 phút sau đó ở 4°C vô hạn định. Sản phẩm PCR được sử dụng trong phân tích thử nghiệm khảo sát để đánh giá hiệu suất bất hoạt. Việc phát hiện trong thử nghiệm khảo sát được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit phát hiện đột biến khảo sát từ IDT (Integrated DNA Technology, San Diego, CA). Phức chất kép khác loại (heteroduplex) được tạo thành bằng cách sử dụng máy luân nhiệt để bắt chước quy trình làm mát tự nhiên của hỗn hợp oligo được gia nhiệt. Quy trình dưới đây được sử dụng để tạo thành phức đôi dị biệt: 95°C trong 10 phút, sau đó là làm nguội từ 95°C xuống 85°C (-2,0°C/giây), ủ 85°C trong 1 phút; làm nguội từ 85°C xuống 75°C (-0,3°C/giây), ủ 75°C trong 1 phút; làm nguội từ 75°C xuống 65°C (-0,3°C/giây), ủ 65°C trong 1 phút; làm nguội từ 65°C xuống 55°C (-0,3°C/giây), ủ 55°C trong 1 phút; làm nguội từ 55°C xuống 45°C (-0,3°C/giây), ủ 45°C trong 1 phút; làm nguội từ 45°C xuống 35°C (-0,3°C/giây), ủ 35°C trong 1 phút; làm nguội từ 35°C xuống 25°C (-0,3°C/giây), ủ 25°C trong 1 phút; và sau đó ở 4°C vô hạn định. ADN phức chất kép khác loại (20 ul) được ủ với 1 ul chất tăng cường khảo sát S (2 ul) và nucleaza khảo sát S (1 ul) ở 42°C trong 60 phút. 10ul mẫu đã thủy phân được chạy trên gel agarosa 1% bên cạnh với 10 ul mẫu không được thủy phân. Như được thể hiện trên FIG.9, thử nghiệm khảo sát được thực hiện trên lô tế bào được chuyển nhiễm để đo hiệu suất bất hoạt như được bộc lộ trong ví dụ 3, FIG.3B. Phân tích hiệu suất bất hoạt được thực hiện ở các quần thể tế bào biểu hiện kháng HER2. Việc giảm dải ở trên và việc xuất hiện các dải mới ở dưới là dấu hiệu chỉ báo hiệu suất có thể định lượng được bằng cách phân tích đo mật độ của hình ảnh quét được bằng phần mềm Image J. Tỷ lệ dải gốc trước và sau khi bất hoạt CRISPR được sử dụng để đo hiệu suất bất hoạt. Hiệu suất bất hoạt đối với BAX và BAK lần lượt là 30% và 70%, dẫn đến hiệu suất bất hoạt kép tính được là khoảng 21%.

Các đĩa bản sao của các đĩa 96 lỗ chứa tế bào đơn được sử dụng để thực hiện sự phân lập ADN hệ gen và giải trình tự ADN. Dung dịch QuickExtract được sử dụng trong việc phân lập năng suất cao ADN hệ gen. 150 ul dịch nổi của môi trường tế bào được lấy ra khỏi môi trường nuôi cấy trước khi bổ sung 150 ul dung dịch QuickExtract. Sau khi được dung giải ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, các sản phẩm phân giải tế bào được cho vào các vi ống sạch để được gia nhiệt khi phong bế nhiệt ở 65°C trong 6 phút sau đó ở 98°C trong 2 phút.

Phân chiết ADN hệ gen được sử dụng để khuếch đại PCR. Sau đó các sản phẩm PCR được tinh chế và được giải trình tự. Các kết quả giải trình tự được phân tích bằng cách sử dụng các công cụ sắp thẳng hàng trong bộ phần mềm Vector NTI. Trình tự hệ gen của gen (trong trường hợp này là gen BAK) thu được trên mạng tại website www.CHOGenome.org được sử dụng làm trình tự kiểu đại trong quá trình phân tích sắp thẳng hàng. FIG.10 biểu thị kết quả giải trình tự ADN của hai mươi dòng tế bào đơn sau khi bất hoạt BAK bằng cách sử dụng CRISPR. Trình tự ADN trên cùng (Bak-CHO-gDNA1) là trình tự ADN của vùng hệ gen của gen BAK gốc. Chỉ dòng 'ZA_112_K32_BakI-II' có trình tự giống với gen BAK gốc. Các gen khác được thể hiện là có các đoạn xóa hoặc đoạn chèn trong trình tự của chúng. Các kết quả quan sát tương tự được thấy với BAX (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 9: Phân tích protein đối với sự bất hoạt BAX và BAK ở các dòng biểu hiện kháng HER2

Các dòng tế bào thu được từ tế bào đơn biểu hiện kháng HER2, bất hoạt BAX và BAK được thử nghiệm về sự biểu hiện protein BAX bằng cách sử dụng phương pháp phân tích thẩm tách Western (FIG.11). Các sản phẩm phân giải từ 6 triệu dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK được chuẩn bị bằng cách tái tạo huyền phù trong 100 μ l dung dịch đệm RIPA (Abcam) cộng với các chất ức chế proteaza (Sigma tablets, Sigma). Các sản phẩm phân giải được ủ trên đá trong 1 giờ trước khi được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút. Nồng độ protein được xác định bằng kit BCA (Pierce). 20 μ g protein được sử dụng cho phương pháp thẩm tách Western. Các phân chiết protein từ các dòng tế bào khác nhau được thăm dò bằng kháng thể kháng BAX (Abcam). Như được thể hiện trên FIG.11, dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK như BB15, BB12 và BBS19 đã không biểu hiện các protein BAX bất kỳ có thể phát hiện thấy. Ngược lại, dòng tế bào đối chứng dương, L082, đã thể hiện sự biểu hiện BAX có độ dài đầy đủ, protein 21-KD. Cần lưu ý rằng dòng tế bào UBB3 đã biểu hiện BAX còn dư lại mặc dù nó được đặc trưng là thiếu BAX về mặt di truyền qua việc giải trình tự gen. Các kết quả quan sát tương tự được thấy với BAK (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 10: Sự chết tế bào theo chương trình được ngăn chặn ở các dòng tế bào biểu hiện kháng HER2 thiếu BAX/BAK

Các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK được thử nghiệm về khả năng chống lại sự chết tế bào theo chương trình của chúng. Tính chất chống lại sự chết tế bào theo chương trình được đánh giá trong suốt quy trình nạp theo mẻ. Phân tích đếm tế bào theo dòng đối với các tế bào nhuộm Annexin V ngày 12 trong quy trình nuôi cấy cấp theo mẻ được thực hiện. Phương thức chuẩn sử dụng bộ kit phát hiện sự chết tế bào theo chương trình FITC Annexin V của BD Biosciences được thực hiện theo các điều kiện được khuyến nghị của nhà sản xuất. Các tế bào có thể được chia thành bốn giai đoạn và/hoặc quần thể trong suốt thử nghiệm sự chết tế bào theo chương trình: giai đoạn tế bào sống sót bình thường (giai đoạn 3, Q3), giai đoạn sớm của sự chết tế bào theo chương trình (giai đoạn 4, Q4), giai đoạn muộn của sự chết tế bào theo chương trình (giai đoạn 2, Q2), và giai đoạn tế bào chết (giai đoạn 1, Q1). Như được thể hiện trên FIG.12A, các tế bào L082 bình thường (đối chứng) mà không có bất hoạt đã thể hiện sự chết tế bào theo chương trình rất nặng như được biểu thị trong Q4 (11,8%) và Q2 (41,8%). Ngược lại, dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK (BB15) đã thể hiện khả năng sống sót được cải thiện rất nhiều (Q3, 80,9%) và thể hiện sự kháng lại sự chết tế bào theo chương trình (Q4, 13,2%; Q2, 3,5%) như được biểu thị trên FIG.12B. Do đó, các tế bào chết theo chương trình được quan sát là giảm từ 53% xuống 17%.

Ví dụ 11: Sản xuất protein tái tổ hợp được gia tăng ở các dòng tế bào biểu hiện kháng HER2 thiếu BAX/BAK

Việc sản xuất kháng thể được đánh giá cả trên quy trình theo mẻ và quy trình cấp theo mẻ (lần lượt ở các FIG.13 và 14). Trong điều kiện nuôi cấy theo mẻ, axit amin không tự nhiên pAF được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vào ngày 3 để bắt đầu sản xuất kháng thể kháng HER2 được lắp ráp đầy đủ với sự kết hợp đặc hiệu về vị trí của pAF. Như được trông đợi đối với việc xử lý chống sự chết tế bào theo chương trình, mật độ tế bào đỉnh như được đo bằng mật độ tế bào sống được (viable cell density: VCD) của các tế bào bất hoạt (FIG.13A) là cao hơn 25% so với các tế bào gốc và thời gian sản xuất (FIG.13B) được kéo dài đến 10 ngày từ 7 ngày đối với các tế bào gốc. Ngạc nhiên là, mức Qp mỗi ngày ở Ngày7 của các tế bào bất hoạt (FIG.13D) được cải thiện khoảng 50% so với các tế bào gốc, có thể do hoạt tính tế bào được duy trì nhờ việc xử lý chống sự chết tế bào theo chương trình. Các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK thể hiện sự

tăng 1,8 lần về độ chuẩn (270 mg/L so với 150 mg/L) so với các tế bào gốc (FIG.13C) ở ngày 7 của quá trình sản xuất.

Xu hướng tương tự được thấy trong các điều kiện nuôi cấy cấp theo mẻ (FIG.14), kết hợp của sự cải thiện sự sinh trưởng dựa trên mật độ tế bào đỉnh (VCD) như được thể hiện trên FIG.14A, thời gian sản xuất (FIG.14B) và năng suất đặc hiệu với tế bào (FIG.14D) đã dẫn đến sự tăng độ chuẩn 3,3 lần đối với các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK (FIG.14C) thể hiện dòng BB15 với độ chuẩn 1500 mg/L so với dòng tế bào gốc (L082, 450 mg/L).

Ví dụ 12: Chất lượng sản phẩm của các dòng tế bào biểu hiện kháng HER2 thiếu BAX/BAK

Chất lượng sản phẩm được phân tích bằng phổ khối nguyên vẹn (MS) và sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC) sử dụng các mẫu được sản xuất bằng quy trình sản xuất cấp theo mẻ từ dòng tế bào gốc biểu hiện kháng HER2 và dòng tế bào biểu hiện kháng HER2 bất hoạt kép BAX/BAK (bảng 4). Quan sát bằng MS thấy rằng trình tự axit amin sơ cấp của dòng được xử lý và dòng tế bào gốc là giống như được suy ra từ trình tự cDNA xác nhận sự định dạng của mAb, (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 4: Phân tích chất lượng các sản phẩm từ các dòng tế bào biểu hiện kháng HER2

	SEC			Khối lượng nguyên vẹn (% Glycoform)				
	HMW	Chính	LMW	Man 5	G0	G0F	G1F	G2F
HER2-BB15	4,4 %	92,6 %	3,1 %	0 %	1 %	77 %	21 %	2 %
HER2-L082	6,0 %	89,0 %	5,0 %	2,4 %	3,2 %	64,4 %	25,4 %	4,5 %

Như được thể hiện trên bảng 4, chất lượng sản phẩm được phân tích bằng cách sử dụng các mẫu được sản xuất bằng quy trình sản xuất cấp theo mẻ từ dòng tế bào gốc và dòng tế bào kháng HER2 bất hoạt kép BAX/BAK. Các biên dạng glycoform đạt được bằng MS là có thể so sánh trước, (HER2-L082), và sau bất hoạt, (HER2-BB15), và trong phạm vi phân bố thông thường đối với mAb ở giai đoạn chọn lọc dòng. SEC chỉ ra rằng phần trăm các khối kết tụ khối lượng phân tử cao (high molecular weight: HMW) và các

loại thoái biến khối lượng phân tử thấp (low molecular weight: LMW) đều nhỏ hơn 5% và có thể so sánh trước và sau khi xử lý, điều này chỉ ra rằng quy trình tách dòng tế bào đơn và bất hoạt không ảnh hưởng tiêu cực đến độ tinh khiết của sản phẩm.

Ví dụ 13: Sự tạo ra dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA thiếu BAX/BAK.

Sự cắt bỏ đồng thời BAX và BAK bằng cách sử dụng công nghệ CRISPR được thực hiện bằng cách chuyển nhiễm ba cấu trúc gRNA nhắm đích BAX và hai cấu trúc gRNA nhắm đích BAK vào dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA KO183. Các cấu trúc BAX và BAK được sử dụng trong thử nghiệm này được thiết kế và chuẩn bị như được mô tả trong các ví dụ trên đây và được minh họa trong các FIG.5-7 và các bảng 1-3. Các plasmid CRISPR được sử dụng trong các thử nghiệm bất hoạt liên quan đến kháng PSMA cũng được thiết kế như được thể hiện trong FIG.7 bằng cách sử dụng vector có bán trên thị trường, Geneart CRISPR Nuclease Vector (pGCNV), (Thermo Fisher Scientific). Phức kép oligo được chèn vào pGCNV, gồm năm (5) cặp oligo được tổng hợp có các trình tự SEQ ID NO. 83 đến SEQ ID NO. 92.

Ba plasmid mã hóa ba trình tự gRNA khác nhau nhắm đích các vị trí BAX và hai trình tự gRNA khác nhau nhắm đích các vị trí BAK được đồng chuyển nhiễm vào các dòng tế bào ổn định thu được từ tế bào CHO mà đã được xử lý để có pAF-RS và pAF-tRNA cộng với gen kháng PSMA hoặc mảnh của nó. 72 giờ sau khi chuyển nhiễm, ADN hệ gen được phân lập và một phần của locut BAK được khuếch đại PCR sử dụng các oligo của SEQ ID NO. 45 và 46 như được mô tả trong ví dụ 8. Locut BAX được khuếch đại PCR bằng cách sử dụng các oligo của SEQ ID NO. 43 và 44. Phân tích ADN đối với các dòng biểu hiện kháng PSMA thiếu BAX và BAK được thực hiện như được mô tả trong các ví dụ trên đây. Như được thể hiện trên FIG.15, thử nghiệm khảo sát được thực hiện để xác định hiệu suất bất hoạt trong các quần thể tế bào biểu hiện kháng PSMA dựa trên công nghệ chỉnh sửa CRISPR. Tỷ lệ dải gốc trước và sau khi bất hoạt CRISPR được sử dụng để đo hiệu suất bất hoạt. Hiệu suất bất hoạt đối với BAX và BAK lần lượt là 42% và 53%, dẫn đến hiệu suất bất hoạt kép tính được là khoảng 20%.

Bảy ngày sau, lô tế bào đã được chuyển nhiễm được tách dòng phụ ở mật độ gieo cấy 1 tế bào/lỗ vào 40 đĩa sử dụng FACS. Khoảng 1000 dòng thu được từ tế bào đơn, được xác nhận bằng hình ảnh được chọn lọc và sàng lọc thông qua các đĩa 96 lỗ,

24 lỗ và 24 lỗ sâu về năng suất, sự sinh trưởng, và kiểu di truyền bằng cách giải trình tự ADN đích.

Phân tích ADN đối với các dòng biểu hiện kháng PSMA thiếu BAX và BAK được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 8 (dữ liệu không được thể hiện). Các dòng bất hoạt kép BAX/BAK KO183 dẫn đầu (KO183 BB KO) được chọn để đánh giá tiếp về sự sinh trưởng và năng suất bằng việc thử nghiệm độ ổn định 2 tháng và để xác nhận tình trạng bất hoạt bằng phương pháp thẩm tách Western.

Như được thể hiện trên FIG.16, sự phân tích protein đối với sự bất hoạt BAX và BAK ở các dòng biểu hiện kháng PSMA được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp thẩm tách Western. Các sản phẩm phân giải từ 6 triệu dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK được chuẩn bị bằng cách tái tạo huyền phù trong 100 ul dung dịch đệm RIPA (Abcam) cộng với các chất ức chế proteaza (Sigma tablets; Sigma). Các sản phẩm phân giải được ủ trên đá trong 1 giờ trước khi được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút. Nồng độ protein được xác định bằng kit BCA (Pierce). 20 ug protein được sử dụng cho phương pháp thẩm tách Western. Các phần chiết protein từ các dòng tế bào khác nhau được thăm dò bằng kháng thể kháng BAX (Abcam).

FIG.16A thể hiện sự bất hoạt BAX ở các dòng biểu hiện kháng PSMA được xử lý bằng cách sử dụng CRISPR. FIG.16B thể hiện sự bất hoạt BAK ở các dòng biểu hiện kháng PSMA được xử lý bằng cách sử dụng CRISPR. Trong số 15 dòng dẫn đầu được mô tả, 5 dòng được bất hoạt kép BAX/BAK. L082 là dòng tế bào đối chứng dương biểu hiện BAX kiểu dại hoặc có độ dài đầy đủ, protein 21KD và BAK kiểu dại, protein 24KD. Các tế bào BB15 biểu hiện kháng HER2 được sử dụng làm đối chứng bất hoạt kép.

Phân tích sự chết tế bào theo chương trình được thực hiện tiếp ở các dòng biểu hiện kháng PSMA theo sáng chế bằng thử nghiệm sự chết tế bào theo chương trình liên kết Annexin-V. Như được biểu thị trên FIG.17, các dòng bất hoạt kép BAX/BAK, ví dụ PSMA-192 và PSMA-719, thể hiện khả năng sống sót tế bào là khoảng 85%, so với khoảng 35-37% quan sát được ở các dòng bất hoạt đơn, ví dụ các dòng PSMA-882, và các dòng không bất hoạt, ví dụ PSMA-484.

Ví dụ 14: Sản xuất protein tái tổ hợp được gia tăng ở các dòng biểu hiện kháng PSMA thiếu BAX/BAK

Dựa vào sự phân tích các dòng BAX và BAK biểu hiện PSMA bằng cách thâm tách Western và phân tích Annexin V, số lượng các dòng ổn định được chọn để tối ưu hóa tiếp. Ba (3) dòng ổn định 192, 719 (đều có BAX/BAK bất hoạt) và 882 (bất hoạt BAK) được chọn để xử lý tối ưu hóa để cải thiện độ chuẩn dựa trên năng suất cao, sự sinh trưởng mạnh mẽ và độ ổn định trong 2 tháng quan sát được đối với mỗi dòng.

Việc sản xuất kháng thể được đánh giá theo quy trình cấp theo mẻ như được biểu thị trên FIG.18. Trong điều kiện nuôi cấy theo mẻ, dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK (PSMA-BBKO-192) thể hiện mức tăng độ chuẩn là 3 lần (1400 mg/L so với 500 mg/L), (FIG.18C) ở ngày 10 của quá trình sản xuất. Đồng thời, khả năng sống sót cũng được cải thiện đáng kể (FIG.18B) là lớn hơn 90%. Dòng tế bào không được xử lý PSMA-S-164 được sử dụng làm đối chứng.

Ví dụ 15: Chất lượng sản phẩm của các dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA thiếu BAX/BAK

Chất lượng sản phẩm được phân tích bằng phổ khối nguyên vẹn (MS) và sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC) sử dụng các mẫu được sản xuất bằng quy trình sản xuất cấp theo mẻ từ dòng tế bào đối chứng biểu hiện kháng PSMA (PSMA-S-164), và dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA bất hoạt kép BAX/BAK (PSMA-BBKO-192) như được bộc lộ trên bảng 5. Quan sát bằng MS thấy rằng trình tự axit amin sơ cấp của dòng được xử lý và dòng tế bào gốc là giống như được suy ra từ trình tự cDNA xác nhận sự định dạng của mAb, (dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 5: Phân tích chất lượng của sản phẩm từ các dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA

	SEC			nrCE-SDS			Khối lượng nguyên vẹn (% Glycoform)					
	HM W	Chính	LM W	Chính	Fra g.	HM W	mAB	Man 5	G0	G0F	G1F	G2 F
PSMA - BBKO -192	3,2 %	94,7%	2,1 %	96,5 %	3,5 %	0 %	0,2 %	0 %	1 %	77 %	21 %	2 %
PSMA -S-164	2,4 %	97,6%	0 %	96,1 %	3,8 %	0 %	0,5 %	1 %	1 %	64 %	29 %	5 %

Như được thể hiện trên bảng 5, các biên dạng glycoform được đánh giá bằng MS là có thể so sánh giữa dòng không được xử lý (PSMA-S-164) và dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK (PSMA-BBKO-192) và trong khoảng phân bố bình thường đối với mAb ở giai đoạn chọn lọc dòng. SEC đo phần trăm các khối kết tụ khối lượng phân tử cao (high molecular weight: HMW) và nrCE-SDS đo phần trăm các loại thoái biến khối lượng phân tử thấp (low molecular weight: LMW). Các khối kết tụ HMW và các loại thoái biến LMW là thấp hơn 5% và có thể so sánh giữa các dòng tế bào được xử lý và không được xử lý biểu hiện kháng PSMA. Các biên dạng chất lượng thể hiện rằng việc xử lý CRISPR-Cas9 và tách dòng tế bào đơn tiếp đó không có ảnh hưởng bất lợi đến chất lượng sản phẩm của các dòng tế bào biểu hiện kháng PSMA.

Ví dụ 16: Tạo ra dòng tế bào biểu hiện kháng CD70 thiếu BAX/BAK.

Sự cắt bỏ đồng thời BAX và BAK bằng cách sử dụng công nghệ chỉnh sửa CRISPR-Cas9 được thực hiện bằng cách chuyển nhiễm ba cấu trúc gRNA nhắm đích BAX và hai cấu trúc gRNA nhắm đích BAK vào quần thể tế bào lô nhỏ biểu hiện kháng CD70 (CD70-MW-108). Các cấu trúc BAX và BAK được sử dụng trong thử nghiệm này được thiết kế và chuẩn bị như được mô tả trong các ví dụ trên đây và được minh họa trong các FIG.5-7 và các bảng 1-3. Các plasmit CRISPR được sử dụng trong các thử nghiệm bất hoạt liên quan đến kháng CD70 cũng được thiết kế như được thể hiện trong FIG.7 bằng cách sử dụng vectơ có bán trên thị trường, Geneart CRISPR Nuclease Vector (pGCNV), (Thermo Fisher Scientific). Phức kép oligo được chèn vào pGCNV, gồm năm (5) cặp oligo được tổng hợp có các trình tự SEQ ID No: 83 đến SEQ ID No:92.

Ba plasmit mã hóa ba trình tự gRNA khác nhau nhắm đích các vị trí BAX và hai trình tự gRNA khác nhau nhắm đích các vị trí BAK được đồng chuyển nhiễm vào các dòng tế bào ổn định thu được từ tế bào CHO mà đã được xử lý để có pAF-RS và pAF-tRNA cộng với gen kháng PSMA hoặc mảnh của nó. 72 giờ sau khi chuyển nhiễm, ADN hệ gen được phân lập và một phần của locut BAK được khuếch đại PCR sử dụng các oligo của SEQ ID NO: 45 và 46 như được mô tả trong ví dụ 5. Locut BAX được khuếch đại PCR bằng cách sử dụng các oligo của SEQ ID NO: 43 và 44. Như được thể hiện trên FIG.19, thử nghiệm khảo sát được thực hiện để xác định hiệu suất bất hoạt trong các quần thể tế bào biểu hiện kháng CD70 dựa trên công nghệ chỉnh sửa CRISPR. Tỷ lệ dải gốc trước và sau khi bất hoạt CRISPR được định lượng bằng cách phân tích đo mật độ

hình ảnh quét được bằng phần mềm Image J và được sử dụng để đo hiệu suất bất hoạt. Hiệu suất bất hoạt đối với BAX và BAK lần lượt là 51% và 23%, dẫn đến hiệu suất bất hoạt kép tính được là khoảng 10%. Dải không đặc hiệu được quan sát trong thử nghiệm này. Dải này được tin là có thể do bản chất lô nhỏ của quần thể tế bào.

Bảy ngày sau, lô tế bào đã được chuyển nhiễm được tách dòng phụ ở mật độ gieo cấy 1 tế bào/lỗ vào 40 đĩa sử dụng FACS. Khoảng 1000 dòng thu được từ tế bào đơn, được xác nhận bằng hình ảnh được chọn lọc và sàng lọc thông qua các đĩa 96 lỗ, 24 lỗ và 24 lỗ sâu về năng suất, sự sinh trưởng, và kiểu di truyền bằng cách giải trình tự ADN đích. Phân tích ADN đối với các dòng biểu hiện kháng CD70 thiếu BAX và BAK được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 8 (dữ liệu không được thể hiện). Từ số lượng các dòng biểu hiện kháng CD70 được tạo ra, các dòng bất hoạt kép BAX/BAK, được chọn để đánh giá tiếp về sự sinh trưởng và năng suất bằng việc thử nghiệm độ ổn định 2 tháng và để xác nhận tình trạng bất hoạt bằng phương pháp thẩm tách Western.

Như được thể hiện trên FIG.20, sự phân tích protein đối với sự bất hoạt BAX và BAK ở các dòng biểu hiện kháng CD70 được đánh giá bằng cách sử dụng phương pháp thẩm tách Western. Các sản phẩm phân giải từ 6 triệu dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK được chuẩn bị bằng cách tái tạo huyền phù trong 100 μ l dung dịch đệm RIPA (Abcam) cộng với các chất ức chế proteaza (Sigma tablets; Sigma). Các sản phẩm phân giải được ủ trên đá trong 1 giờ trước khi được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút. Nồng độ protein được xác định bằng kit BCA (Pierce). 20 μ g protein được sử dụng cho phương pháp thẩm tách Western. Các phần chiết protein từ các dòng tế bào khác nhau được thăm dò bằng kháng thể kháng BAX (Abcam). FIG.20A, thể hiện sự bất hoạt BAX ở các dòng biểu hiện kháng CD70 được xử lý bằng cách sử dụng CRISPR. Như được thể hiện trên FIG.20B, sự bất hoạt BAK ở các dòng biểu hiện kháng CD70 được thiết kế bằng cách sử dụng CRISPR được quan sát ở một số dòng. Trong số 13 dòng dẫn đầu được mô tả, 8 dòng được bất hoạt kép BAX/BAK. Lưu ý rằng dòng tế bào gốc 108 dòng vô tính vẫn giữ lại sự biểu hiện protein BAK còn dư. L082 là dòng tế bào đối chứng dương tính biểu hiện BAX kiểu dại hoặc có chiều dài đầy đủ, protein 21-KD và protein kiểu dại BAK, dài tại 24 KD.

Phân tích sự chết tế bào theo chương trình được thực hiện tiếp ở các dòng biểu hiện kháng CD70 theo sáng chế bằng thử nghiệm sự chết tế bào theo chương trình liên

kết Annexin-V. Như được biểu thị trên FIG.21, các dòng bất hoạt kép BAX/BAK, ví dụ CD70-BBKO-563, thể hiện khả năng sống của tế bào là khoảng 60%, so với khoảng 18% quan sát được ở dòng tế bào gốc CD70-MW-108. Đồng thời, các tế bào chết theo chương trình giảm từ 80% xuống 40% như quan sát được từ Q2 và Q4 đối với mỗi dòng tế bào.

Ví dụ 17: Sản xuất protein tái tổ hợp được gia tăng ở các dòng biểu hiện kháng CD70 thiếu BAX/BAK

Dựa vào sự phân tích các dòng BAX và BAK biểu hiện kháng CD70 bằng cách thẩm tách Western và phân tích Annexin V, số lượng các dòng ổn định được chọn để tối ưu hóa tiếp. Như được biểu thị trên FIG.21, chín (9) dòng ổn định với sự bất hoạt cả hai BAX/BAK, được chọn cho việc tối ưu hóa quy trình để cải thiện độ chuẩn dựa trên năng suất cao, sự sinh trưởng mạnh mẽ và độ ổn định trong 2 tháng quan sát được đối với mỗi dòng.

Việc sản xuất kháng thể được đánh giá theo quy trình cấp theo mẻ như được biểu thị trên FIG.22. Trong điều kiện nuôi cấy cấp theo mẻ, dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK biểu hiện kháng CD70 (CD70-BBKO-563) thể hiện độ chuẩn 1000 mg/L trong cả điều kiện bình lắc và điều kiện bình phản ứng sinh học kiểu benchtop, (FIG.22C) ở ngày 14 của quá trình sản xuất. Khả năng sống sót của tế bào trong cả điều kiện bình lắc và điều kiện bình phản ứng sinh học kiểu benchtop (FIG.22B) đều là khoảng 90%. Nói chung, biên dạng sản xuất, VCD, khả năng sống sót và độ chuẩn trong điều kiện bình lắc và điều kiện bình phản ứng sinh học là có thể so sánh và xác nhận rằng quy trình có thể mở rộng quy mô. Các nghiên cứu khác được thực hiện trong các điều kiện bình phản ứng sinh học và các quy trình dựa trên năng suất và biên dạng sinh trưởng khả năng được phân tích (dữ liệu không được thể hiện). Nghiên cứu này xác nhận phương án theo sáng chế kiểm soát được các tác nhân gây áp lực chết tế bào theo chương trình mà ảnh hưởng đến sự sinh trưởng tế bào trong các điều kiện của thiết bị phản ứng sinh học bằng cách sử dụng công nghệ CRISPR để bất hoạt các gen kiểm soát hoặc điều hòa sự chết tế bào theo chương trình.

Ví dụ 18: Chất lượng sản phẩm của các dòng tế bào biểu hiện kháng CD70 thiếu BAX/BAK

Chất lượng sản phẩm được phân tích bằng phổ khối nguyên vẹn (MS) và sắc ký loại trừ theo kích thước (SEC) sử dụng các mẫu được sản xuất bằng quy trình sản xuất cấp theo mẻ từ các dòng tế bào bất hoạt kép BAX/BAK biểu hiện kháng CD70 trong điều kiện bình lắc và thiết bị phản ứng sinh học như được bộc lộ trong bảng 6.

Bảng 6: Phân tích chất lượng sản phẩm từ các dòng tế bào biểu hiện kháng CD70

	SEC			Khối lượng nguyên vẹn (% Glycoform)				
	HMW	Chính	LMW	Man5	G0	G0F	G1F	G2F
Bình lắc	7,7 %	90,7 %	1,6 %	1,5 %	1,7 %	68,7 %	22,8 %	5,4 %
Thiết bị phản ứng sinh học	6,9 %	92,1 %	1,1 %	1,8 %	2,3 %	63,3 %	28,7 %	%

Như được thể hiện trên bảng 5, các biên dạng glycoform được đánh giá bằng MS là có thể so sánh giữa điều kiện phản ứng bình lắc và điều kiện phản ứng thiết bị sinh học và nằm trong khoảng phân bố bình thường đối với mAb ở giai đoạn chọn lọc dòng. SEC đo phần trăm các khối kết tụ khối lượng phân tử cao (high molecular weight: HMW) và phần trăm các loại thoái biến khối lượng phân tử thấp (low molecular weight: LMW). Cả các khối kết tụ HMW và các loại thoái biến LMW đều nằm trong phạm vi bình thường ở giai đoạn chọn lọc dòng. Lượng HMW cao hơn 5% một chút được thấy là được giảm xuống 2-3% sau khi tinh chế (dữ liệu không được thể hiện). Các biên dạng chất lượng thể hiện rằng CRISPR và tách dòng tế bào đơn tiếp đó không có ảnh hưởng bất lợi đến chất lượng sản phẩm của các dòng tế bào biểu hiện kháng CD70. Cũng cần lưu ý rằng các thuộc tính chất lượng sản phẩm (các khối kết tụ, tính nguyên vẹn và các glycoform), trong các điều kiện thiết bị phản ứng sinh học khớp với các thuộc tính tương ứng trong điều kiện bình lắc, điều này chứng minh rằng quy trình có thể mở rộng quy mô.

Cần hiểu rằng các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây không chỉ giới hạn ở các phương áp, các phương thức, các dòng tế bào, các cấu trúc, và các tác nhân phản ứng cụ thể được mô tả ở đây mà có thể thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không nhằm giới hạn phạm vi của các phương pháp và các chế phẩm được mô tả ở đây, mà phạm vi này sẽ chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Như được sử dụng ở đây và trong yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một" và "cái" và "chiếc" bao gồm cả các dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ theo cách khác. Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế này. Mặc dù các phương pháp, các thiết bị, và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả có thể được dùng để thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp, các thiết bị và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả dưới đây.

Tất cả các công bố và các patent đã nêu trong bản mô tả này được kết hợp vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm mục đích mô tả và bộc lộ, ví dụ, các cấu trúc và các phương pháp mà được mô tả trong các công bố có thể được sử dụng cùng với sáng chế. Các công bố được bàn luận ở đây được cung cấp chỉ đối với trường hợp các bộc lộ của chúng là trước ngày nộp đơn của đơn sáng chế này. Không có phần nào ở đây được hiểu như là thừa nhận rằng sáng chế được mô tả ở đây không được hưởng quyền đề ngày trước những bộc lộ bởi sáng chế trước đó hoặc bởi lý do khác.

Mặc dù sáng chế nêu trên đã được mô tả mở mức chi tiết nhất định nhằm mục đích làm rõ ràng và nhằm để hiểu rõ, nhưng người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ từ việc đọc phần mô tả này rằng các thay đổi khác nhau về dạng và chi tiết mà có thể được tạo ra là không trệt khỏi phạm vi đích thực của sáng chế. Ví dụ, tất cả các kỹ thuật và các thiết bị được mô tả ở đây đều có thể sử dụng theo các cách kết hợp khác. Cần hiểu rằng các ví dụ và phương án được mô tả trong bản mô tả chỉ nhằm mục đích minh họa và nhiều cải biến hoặc thay đổi khác nhau từ đó sẽ được đề xuất đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này và nằm trong tinh thần và nội dung của đơn và phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Kết hợp bằng cách viện dẫn

Tất cả các công bố, các patent, các đơn yêu cầu cấp patent, và/hoặc các tài liệu khác được nêu trong đơn sáng chế này đều được kết hợp vào đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích đến mức độ như là mỗi công bố, patent, đơn yêu cầu cấp patent, và/hoặc tài liệu khác được thể hiện một cách riêng rẽ để được kết hợp bằng cách viện dẫn nhằm tất cả các mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra dòng tế bào đã giảm sự chết tế bào theo chương trình để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, phương pháp này bao gồm bước làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích trong tế bào, trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích này có liên quan đến con đường chết tế bào theo chương trình, trong đó tế bào biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm, và trong đó tế bào chứa aminoacyl tRNA synthetaza trực giao (orthogonal aminoacyl tRNA synthetase: O-RS), và tRNA ức chế trực giao (orthogonal suppressor tRNA: O-tRNA).
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tạo ra phân tử axit nucleic có khả năng làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích trong tế bào, và đưa phân tử axit nucleic này vào tế bào, trong đó phân tử axit nucleic này làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích; tùy ý trong đó phân tử axit nucleic này được chọn từ các SEQ ID NO. 1 đến 18 và 28 đến 36.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích là gen thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình (pro-apoptotic gene).
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó dòng tế bào là dòng tế bào có nhân điển hình; tùy ý trong đó dòng tế bào được chọn từ COS, CHO, VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, hoặc HEK293.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dòng tế bào là dòng tế bào tạm thời, quần thể dòng tế bào ổn định hoặc dòng tế bào dòng vô tính ổn định.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó axit amin không tự nhiên được chọn từ para-axetyl phenylalanin, *p*-nitrophenylalanin, *p*-sulfotyrosin, *p*-carboxyphenylalanin, o-nitrophenylalanin, m-nitrophenylalanin, *p*-boronyl phenylalanin, o-boronylphenylalanin, m-boronylphenylalanin, *p*-aminophenylalanin, o-aminophenylalanin, m-aminophenylalanin, *p*-axylphenylalanin, o-axylphenylalanin, m-axylphenylalanin, *p*-OMe phenylalanin, o-OMe phenylalanin, m-OMe phenylalanin, *p*-sulfophenylalanin, o-sulfophenylalanin,

m-sulfophenylalanin, 5-nitro His, 3-nitro Tyr, 2-nitro Tyr, Leu được thế nitro, His được thế nitro, De được thế nitro, Trp được thế nitro, 2-nitro Trp, 4-nitro Trp, 5-nitro Trp, 6-nitro Trp, 7-nitro Trp, 3-aminotyrosin, 2-aminotyrosin, O-sulfotyrosin, 2-sulfooxyphenylalanin, 3-sulfooxyphenylalanin, o-carboxyphenylalanin, m-carboxyphenylalanin, *p*-axetyl-L-phenylalanin, *p*-propargyl-phenylalanin, O-metyl-L-tyrosin, L-3-(2-naphtyl)alanin, 3-metyl-phenylalanin, O-4-alyl-L-tyrosin, 4-propyl-L-tyrosin, tri-O-axetyl-GlcNAc β -serin, L-Dopa, phenylalanin được flo hóa, isopropyl-L-phenylalanin, *p*-azido-L-phenylalanin, *p*-axyl-L-phenylalanin, *p*-benzoyl-L-phenylalanin, L-phosphoserin, phosphoserin, phosphotyrosin, *p*-iodo-phenylalanin, *p*-bromophenylalanin, *p*-amino-L-phenylalanin, isopropyl-L-phenylalanin và *p*-propargyloxy-L-phenylalanin.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó axit amin không tự nhiên được kết hợp một cách đặc hiệu về vị trí vào protein đã nêu.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó gen cần quan tâm là gen trị liệu sinh học; tùy ý trong đó gen trị liệu sinh học này là vacxin.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó gen cần quan tâm mã hóa kháng thể, scFv, protein dung hợp scFv, protein dung hợp Fc, Yếu tố VII, Yếu tố VIII, hoặc Yếu tố IV; tùy ý trong đó gen cần quan tâm mã hóa kháng thể.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó gen cần quan tâm:
 - a) mã hóa xytokin, interleukin, interferon, chemokin, yếu tố sinh trưởng, hormon, hoặc thụ thể, chất tương đồng, thể đặc hiệu kép hoặc mảnh của chúng; hoặc
 - b) mã hóa HER2, CD-70, PSMA, 5T4, EGFR, TROP2, CD3, IL-2, IL-3, IL-10, IL-15, GPC3, DLL3, ROR1, leptin, FGF-21, FGF-23, HGH, FcR, insulin, TNFR1, TRAIL, EPO, hoặc chất tương đồng, thể đặc hiệu kép hoặc mảnh của chúng.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích là:

- a) vị trí hoặc vùng họ Bcl-2; tùy ý trong đó vị trí hoặc vùng họ Bcl-2 này được chọn từ Bcl-xl, Bak, Bax, Bcl-xs, Bid, Bim, Bad và Bik; hoặc
 - b) Bax; tùy ý trong đó gen cần quan tâm mã hóa kháng thể; hoặc
 - c) Bak; tùy ý trong đó gen cần quan tâm mã hóa kháng thể; hoặc
 - d) Bax và Bak; tùy ý trong đó gen cần quan tâm mã hóa kháng thể.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích được làm vô hoạt hoàn toàn hoặc được làm vô hoạt một phần.
13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích là giống hoặc khác nhau.
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó codon chọn lọc là:
- a) codon vô nghĩa, codon hiếm, hoặc codon bốn bazơ; hoặc
 - b) codon ochre, codon opal, hoặc codon amber.
15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, để tối ưu hóa hiệu suất sản xuất protein chứa axit amin không tự nhiên trong dòng tế bào; tùy ý trong đó hiệu suất sản xuất protein chứa axit amin không tự nhiên lớn hơn ít nhất là 0,5 lần hoặc nhiều hơn thế so với trường hợp không có sự vô hoạt một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích.
16. Phương pháp làm giảm hoặc giảm bớt sự chết tế bào theo chương trình ở tế bào, trong đó tế bào này biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm, và trong đó tế bào này chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS) và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA), phương pháp này bao gồm bước làm vô hoạt một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích thúc đẩy sự chết tế bào theo chương trình trong tế bào.
17. Phương pháp tạo ra tế bào hoặc dòng tế bào đã giảm sự chết tế bào theo chương trình để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, phương pháp này bao gồm các bước: cung cấp tế bào hoặc dòng tế bào biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm, và chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS) và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA); đưa vào dòng tế bào này phân tử axit nucleic có khả năng làm vô

hoạt một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích trong tế bào hoặc dòng tế bào; trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích này có liên quan đến con đường chết tế bào theo chương trình; và tùy ý cung cấp axit amin không tự nhiên cho tế bào hoặc dòng tế bào.

18. Tế bào hoặc dòng tế bào được phân lập được sản xuất theo phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17.
19. Tế bào hoặc dòng tế bào đã giảm sự chết tế bào theo chương trình để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, trong đó tế bào này biểu hiện gen chứa codon chọn lọc cần quan tâm, trong đó tế bào này chứa aminoacyl tRNA synthetase trực giao (O-RS), và tRNA ức chế trực giao (O-tRNA); và trong đó tế bào này chứa một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích được làm vô hoạt, trong đó một hoặc nhiều vị trí đích hoặc vùng đích được làm vô hoạt này có liên quan đến con đường chết tế bào theo chương trình.

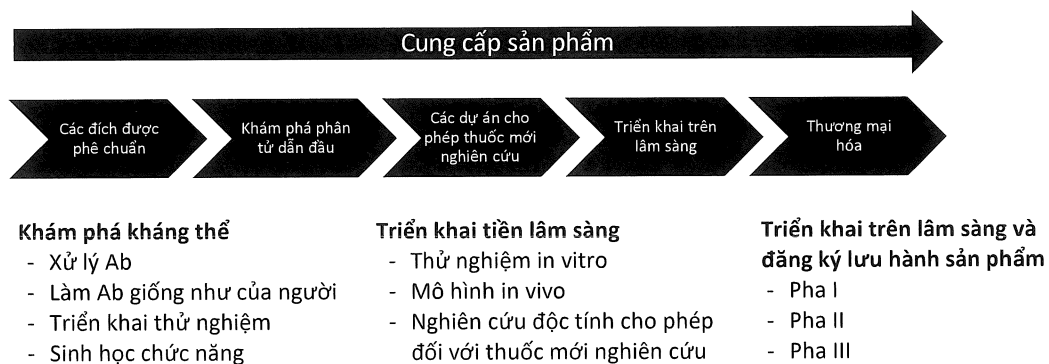
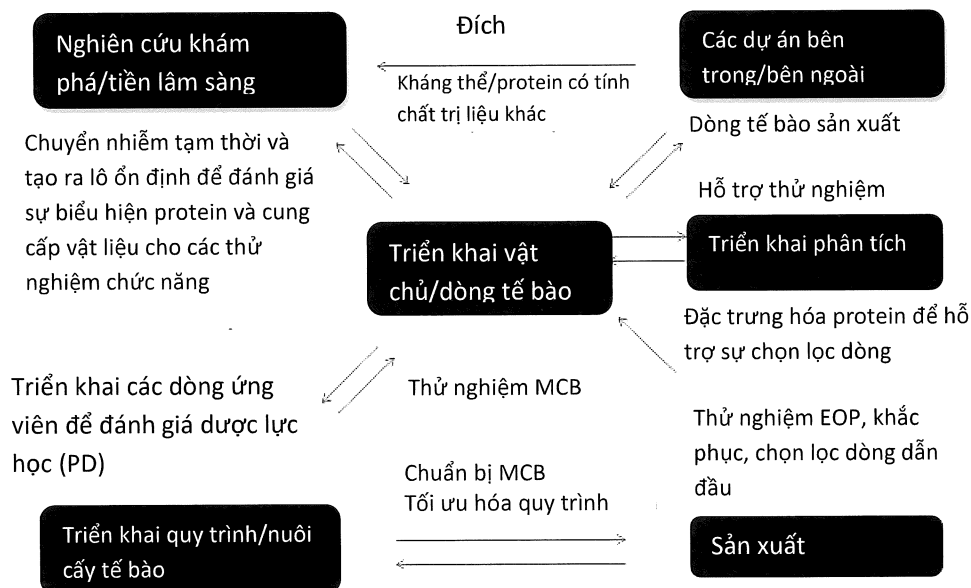
1/22

A.**Phát triển dòng tế bào và quy trình**

- Tạo ra vật chủ/vectơ/dòng tế bào
- Thử nghiệm, tạo ngân hàng và đặc trưng hóa dòng tế bào
- Phát triển quy trình
- Sản xuất trên quy mô thí điểm
- Triển khai thử nghiệm
- Phối chế

Sản xuất

- Sản xuất cGMP
- Quy mô đến >2000L
- Gam đến kilogram

**B.****FIG. 1**

2/22

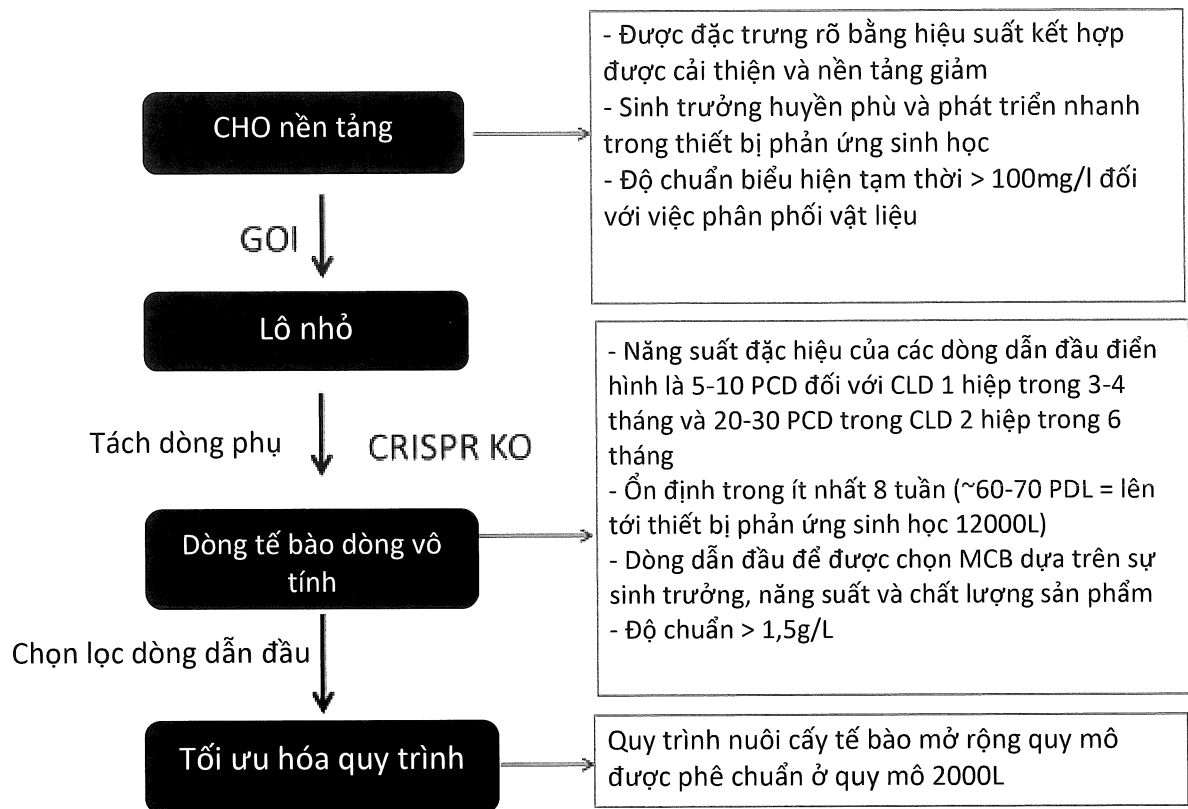


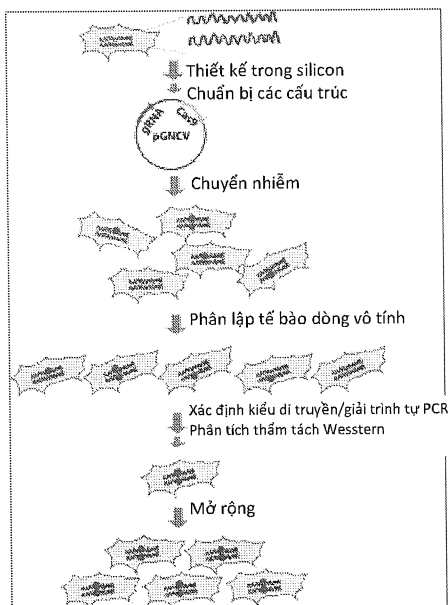
FIG. 2

3/22

A. Hiệu suất FACS SCD của sản phẩm sinh trưởng nhanh đơn dòng gấp 3 lần so với LDC truyền thống

	Mật độ gieo cấy	Tỷ lệ kết tủa	Tỷ lệ sản phẩm sinh trưởng nhanh	Tỷ lệ sản phẩm sinh trưởng nhanh đơn dòng
FACS SCD	1 tế bào/lỗ	63%	53%	49%
LDC	0,5 tế bào/lỗ	72%	65%	32%

B.



Chương trình CRISPy (đặc hiệu với CHO)

- Các trình tự gRNA không có sai lệch
- Các exon sớm

Thử nghiệm khảo sát tế bào được gom lại

- Hiệu suất KO 30-90%

Sàng lọc và đặc trưng hóa

1. Giải trình tự ADN nhắm đích HT

Hiệu suất KO 50-80%

2. Phân tích thẩm tách Western

Hiệu suất KO 50-90%

3. Thử nghiệm chức năng

C.

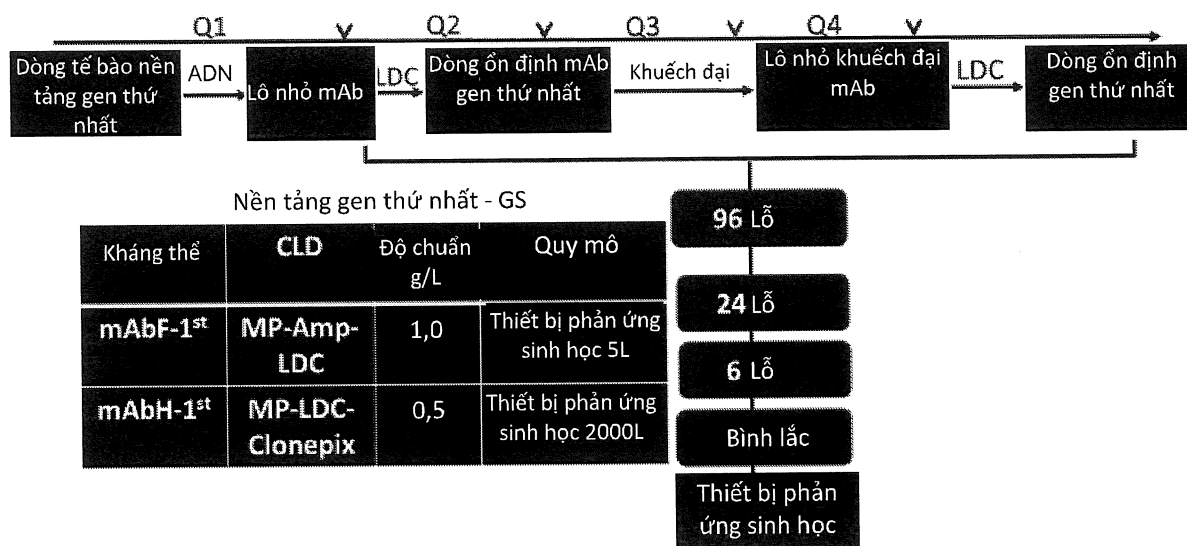
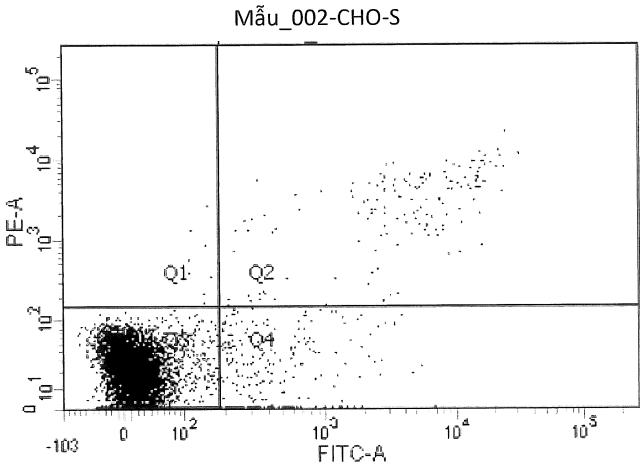


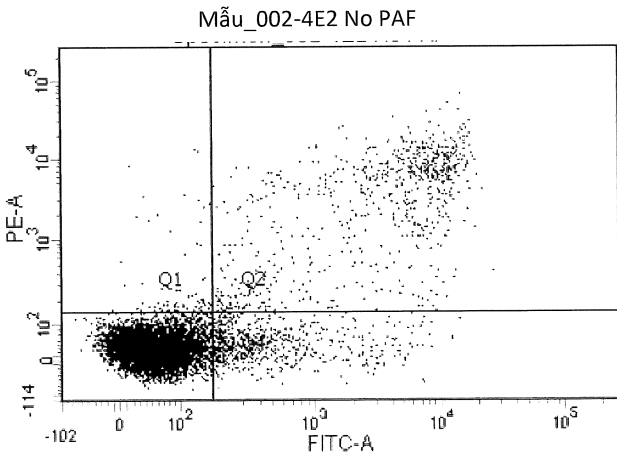
FIG. 3

4/22

A.



B.



Dòng tế bào	Tế bào sống sót (Q3)	Tế bào chết theo chương trình sớm (Q4)	Tế bào chết theo chương trình muộn (Q2)	Tế bào chết (Q1)
CHO-S	96%	2,4%	1,5%	0,1%
4E2	85%	6,7%	7,4%	0,7%

FIG. 4

Đoạn mồi thuận X-F

1 **GGTTATGAG CCTCCCTAGC** CCCCTCGCTC TTCCGGGAACTAGGAGTCC AGGCACTCCT TCCCTCCTCT CTCCACCAGG
CCCAATACTC GGAGGATCG GGGAGCGAG AAGGCCCTTG GATCCTCAGG TCCGTGAGGA AGGAGGAGA GAGTGGTCC
gRNA vj tri-II

90 GCCCACCAGC TCTGAGCAGA TCATGAAGAC AGGGCCCTTT TTGCTACAGG GTGAGGTGTG AGGCGCTGTT GTGTTGGGT
CGGGTGGTCG AGACTCGTCT AGTACTTCTG TCCCGGAAA AACGATGTCC CCACTCACAC TCCGCGACAA CACCACCCA
gRNA vj tri-III

170 GGGCTTCAGG AGCAAGGCTC AGTTCCCCTCT CTGGCCCTCC GTCCCCCGC TTCCATTAC ATCTAGTTTC ATCCAGTATC
CCCGAAGTCC TCGTTCCGAG TCAAGGGTGA GACGGGGAGG CAGGGGGGG AGGTAAGT TAGATCAAAG TAGTCCATAG
Exon 1

250 **CAGCTGGCAG** GATGGCCGGG GATACACCTG AGCTGACCTT GGAGCAGCCA CCCAGGATC CGACCACCAA GAAGTTGAGC
CTCGACCTC CTACCGGCC CTATGTGGAC TCGACTGGAA CCTCGTCGGT GGGGTCCCTAG GCTGGTGGT CTTCAACTCG
Exon 2

330 GAGTGCTCA GGCGAATTGG AGATCAGCTG GACAGCAACA TGGAGCTGCA GAGGTGTGGT TCCTGGGTCC TGGGTCCAT
CTCAGGAGT CCGCTTAACC TCTACTCGAC CTGTCGTTGT ACCTCGACGT CTCACACCA AGGACCCAGG ACCCCAGGTA
gRNA vj tri-I

410 CCGGGGATTT CGTGTACCT CAAGAACTCA GGATTCGTAC ACTCTTGTC TCCCAAGGGA CCAGGTGTT CACCATTCA
GGCCCCATAA GCACAATGGA GTTCTTGAGT CCGTAGCATG TGAGAACAGG AGGTTCCCT GTTCCACAAG GTGGTGAAGT

490 GATATTCCGT GCTGGGCATA GAATCCAGG TCTCTTTTACA TGGTAGCC
CTATAAGGCA CGACCGGTAT CTTAGGTCCC **AGAGAAATGT ACCATCGG**

Đoạn mồi nghịch X-R

FIG. 5

6/22

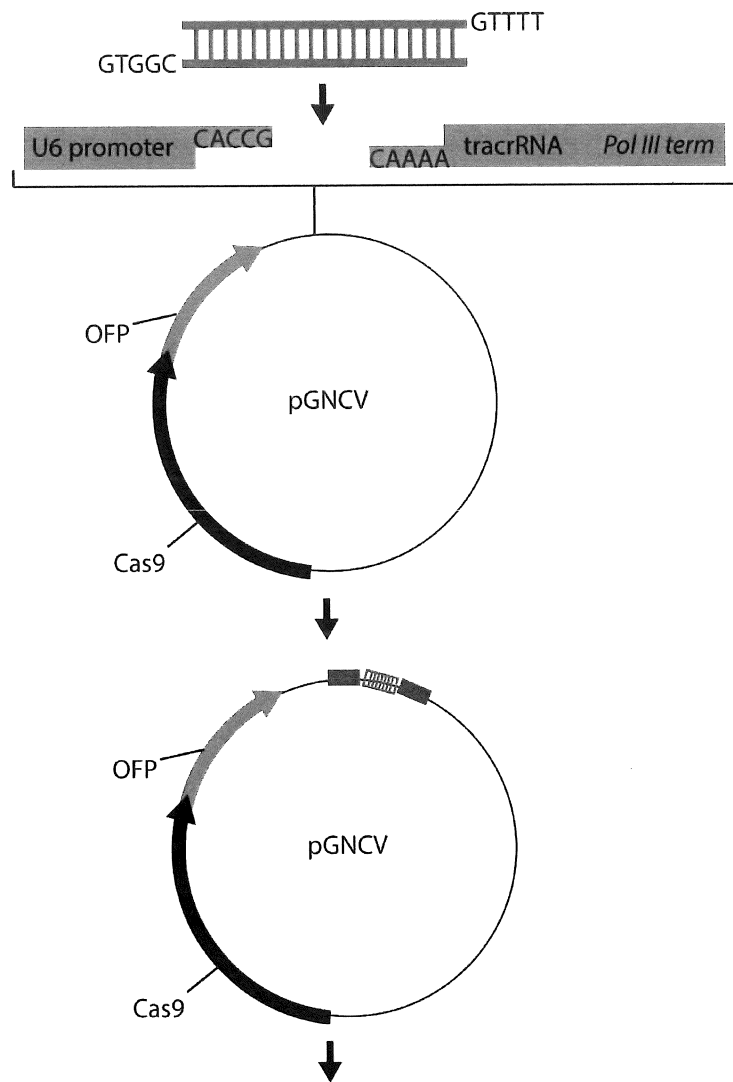
Đoạn mồi thuận K-F

1	CAGACAGCCT TCTCTTGCTG	ACTCCAGCT	CTACCCOAG	AACAGAGGT	GGCCAGGAC	ACAGAGGAG	TCTTTCAAG
	GTCTGTGGA	AGAGAACGAC	TGAGGTGCA	GACTGGGTC	TTGTCTCCA	CCGGTCTCTG	TGTCCTCTCC AGAAGCTTC
81	CTATGTTTC	CATCTCCAC	ATCAGGAACA	AGAGACCCAG	GGGGGGGCTG	CCCTTGCCAA	CCCCAGATG GACAATTTGC
	GATACAAAAG	GTAGAGGTGG	TAGTCCTTGT	TCTCTGGGTC	CCCCGCCGAC	GGGACGGTT	GGGGCTCTAC CTGTTAAACG
Exon 2							
	gRNA vị tri-I						
161	TCCTAGAACC	CAACAGGTAA	GCTCCAGCCC	CAGGGGGACA	GTCCCGGGG	GGAGGGGAC	TGGACTTATC TCTGTCATCT
	AGGATCTTGG	GTGTGCCATT	CGAGGTGGG	GTCCCCCTGT	CCAGGGCCCC	CCTCCOCTG	ACCTGAATAG AGACAGTAGA
241	CTCTCCCTTC	TCAATCTGGT	CCCCCCCCCA	TCTGCAGTCC	TATACTCCTT	TCAGGACATG	CCCGTCCTGT CCTTAGCACACA
	GAGAGGAAG	AGTTAGACCA	GGGGGGGGGT	AGAGTCTAGG	ATATGAGGAA	AGTCCTGTAC	GGGCAGGACA GGAATCGTGT
321	GGCCTCCTGG	CCACTGTGCA	GGACGTTGGC	GGTCCGGGGT	AAAGTCTGCT	CCTACCCCCA	CCCCAGGAGA ATCCATTCTG
	CGGAGGACC	GGTGACAGCT	CCTGCAACCG	CCAGGCCCCA	TTTCAGACGA	GGATGGGGGT	GGGGTCTCTCT TAGGTAAGAC
401	TGCCACGAGC	CGGTTTCCCA	ATCTCCAAT	CCCGTTCTTA	CAGCATCTTG	GGTCAGGTGG	CCCGGCAGCT TGCTATCATTT
	ACGGTGCTCG	GCCCAAGGGT	TAGAGGTTGA	GGGCAAGAAAT	GTCGTAGAAC	CCAGTCCACC	CGGCCGTCGA ACGATAGTAA
Exon 3							
	gRNA vị tri-II						
481	GGAGATGACA	TTAACCGGAG	ATACGACACA	GAGTTCACGA	ATTTACTGGA	GCAGCTGCAG	CCCACAGCTG GGAATGCCTTA
	CCCTCTACTGT	AATTGGCCTC	TATGCTGTGT	CTCAAGGTCT	TAAATGACCT	CGTCGACGTC	GGGTGTCGAC CCTTAGGGAT
561	CGAACTCTTC	ACCAAGATTG	CCTCCAGGTA	CCCACCACCA	CCTGACCCAG	CACACACGTG	ATGGGTCCC TGGGTGGGGA
	GCTTGAGAAG	TGGTTCTAAC	GGAGTCCAT	GGGTGGTGGT	GGACTGGGTC	GTGTGTGCAC	TACCCAGGG ACCGACCCCT
641	CCGAGTTCGT	GAATCAGAT	ACGATCCCCG	CCCATCTCCC	CGTCTCTGGG	CCCCACTGCG	TGTCCTTCTGC ATACTTGCTG
	GGCTCAAGCA	CTTGAGTCTA	TGCTAGGGGC	GGGTAGAGGG	GCAGAGACCC	GGGGTGAGCG	ACAGAGAGCG TATGAACGAC
721	TCATGCCTCT	CAGGAGCTCT					
	AGTACCGAGA GTCTTCGAGA						

Đoạn mồi nghịch K-R

FIG. 6

7/22



Chuyển nhiễm, kết tủa tế bào đơn, sàng lọc bằng cách giải trình tự ADN

FIG. 7

8/22

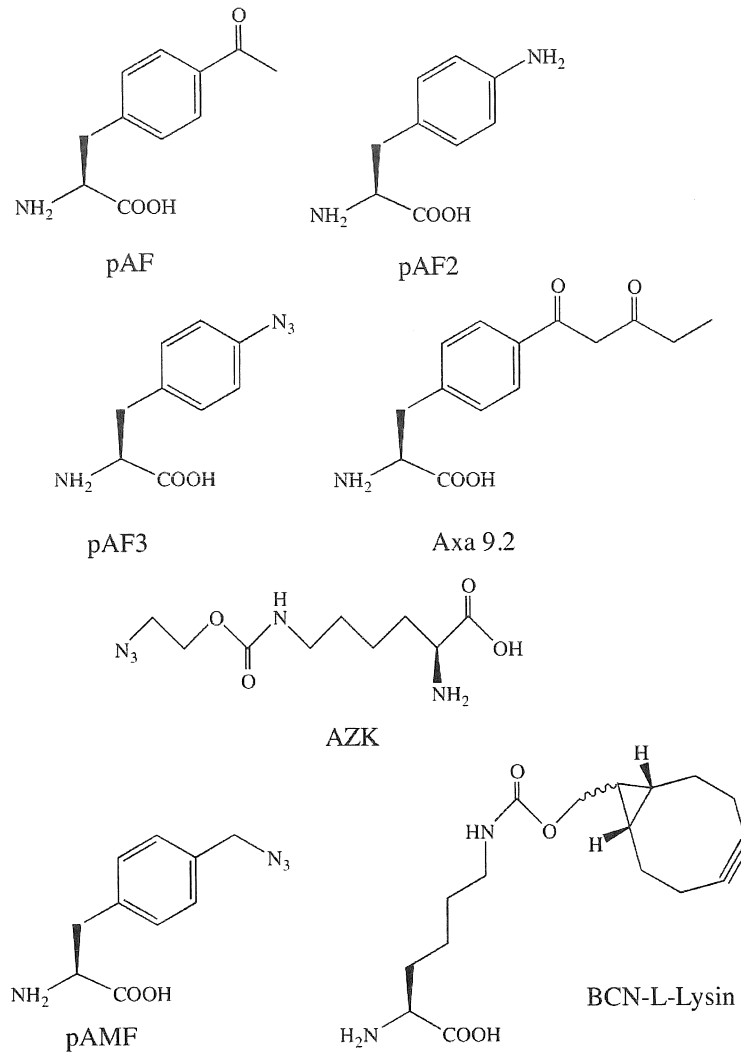


FIG. 8

9/2

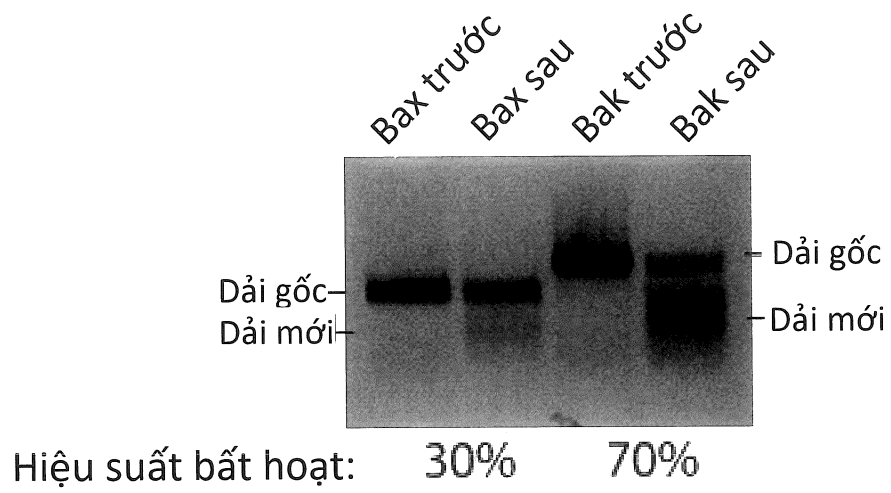


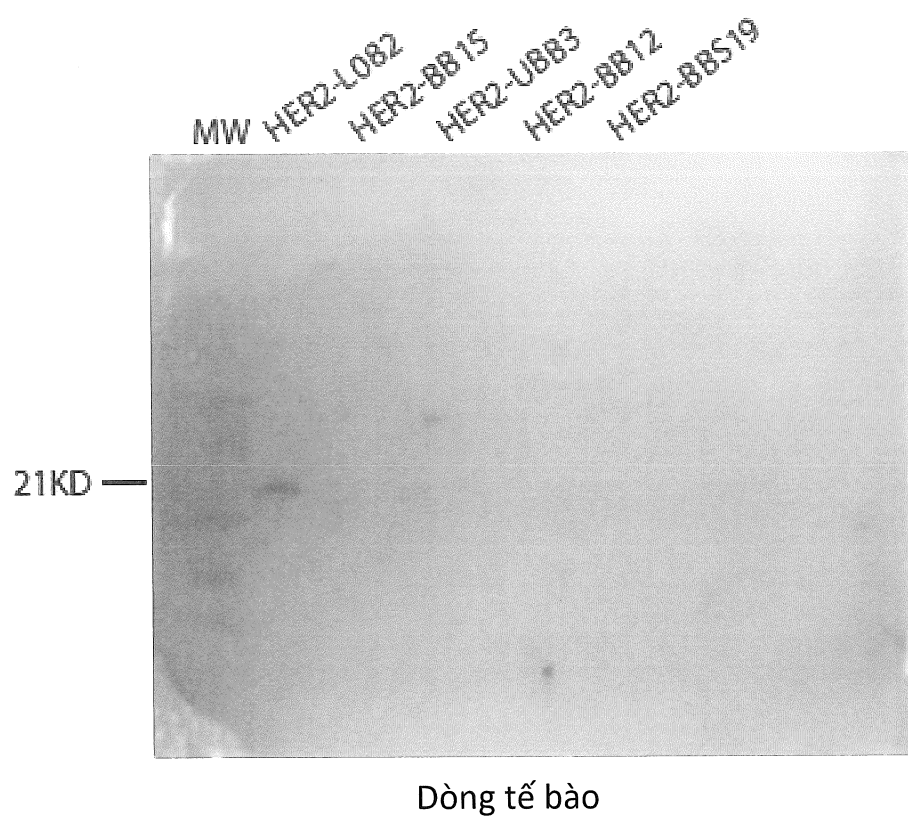
FIG. 9

10/22

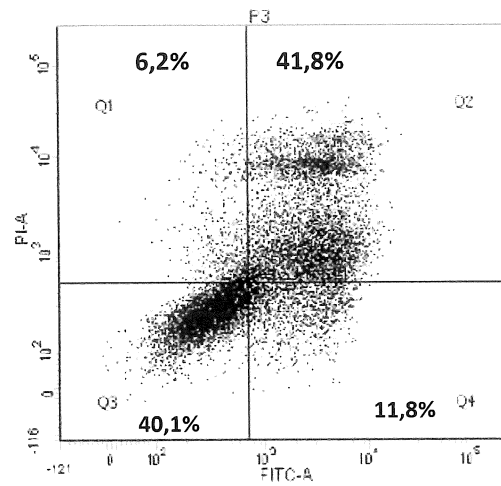
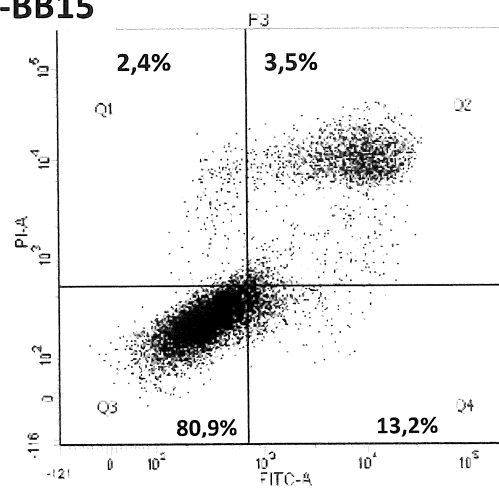
	(447)	447	460	470	480	490	3'
Bak-CHO-gDNA1	(418)	CCAAATCTCAAAC	TCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
YA_082_K2_BakI-II	(388)	CCAATCTCAAAC	T-----TACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
YA_084_K4_BakI-II	(388)	CCAATCTCAAAC	-----ATCTTGGGTCAGGTGGG				
YA_086_K6_BakI-II	(107)	CAAACCCCGA-C	--CCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
YA_088_K8_BakI-II	(108)	CAAACCCCGA-C	--CCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
YA_090_K10_BakI-II	(106)	CAAACCCCGA	---CA---TTAACCCCGATAT	TAACCCGAGAT			
YA_092_K12_BakI-II	(106)	CAAACCCCGA-C	--CCGTTCTTACGGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
YA_093_K13_BakI-II	(110)	CAAACCCCGA-C	--CCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
YA_095_K15_BakI-II	(103)	CAAACCCCGA-G	--CCGTTCTTACCGCAT	CTTGGGTCACGGGG			
ZA_097_K17_BakI-II	(388)	CAAATTGTCCAT	CCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_098_K18_BakI-II	(388)	CAAATCTCAAAC	TCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_100_K20_BakI-II	(96)	CAAACCCCGAGC	--CCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_101_K21_BakI-II	(97)	CAAACCCCGA-C	--CCG-----TCTTGCCCT	CTTGGGTCAGGTGGA			
ZA_103_K23_BakI-II	(104)	CAAACCCCGA-C	--GCGGGAT	TACAGCATCTCTGGGTCACGTGGG			
ZA_105_K25_BakI-II	(389)	CAAATCTCAAAC	TCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_106_K26_BakI-II	(389)	CAAATCTCAAAC	TCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_108_K28_BakI-II	(104)	CAAACCCCGA-C	--CTGGA	CTTACTGCTCCTAGAGTCCAGTGGC			
ZA_109_K29_BakI-II	(373)	CAAATCTCAAAC	TCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_110_K30_BakI-II	(104)	CAAACCCCGA-C	--CCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_111_K31_BakI-II	(98)	CAAACCCCGA-C	--CCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			
ZA_112_K32_BakI-II	(387)	CAAATCTCAAAC	TCCCGTTCTTACAGCAT	CTTGGGTCAGGTGGG			

FIG. 10

11/22

**FIG. 11**

12/22

A. HER2-L082**B. HER2-BB15**

Dòng tế bào	Tế bào sống sót (Q3)	Tế bào chết theo chương trình sớm (Q4)	Tế bào chết theo chương trình muộn (Q2)	Tế bào chết (Q1)
HER2-L082	40,1%	11,8%	41,8%	6,2%
HER2-BB15	80,9%	13,2%	3,5%	2,4%

FIG. 12

13/22

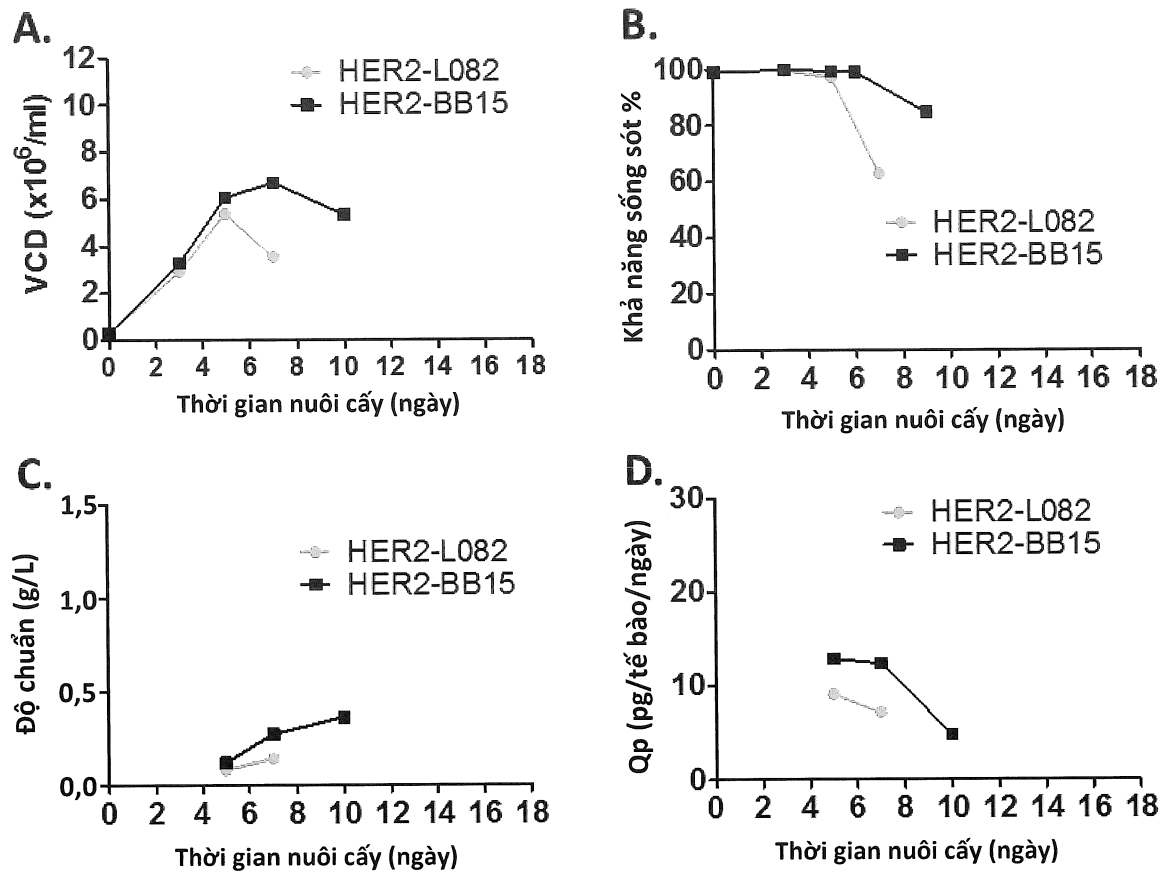


FIG. 13

14/22

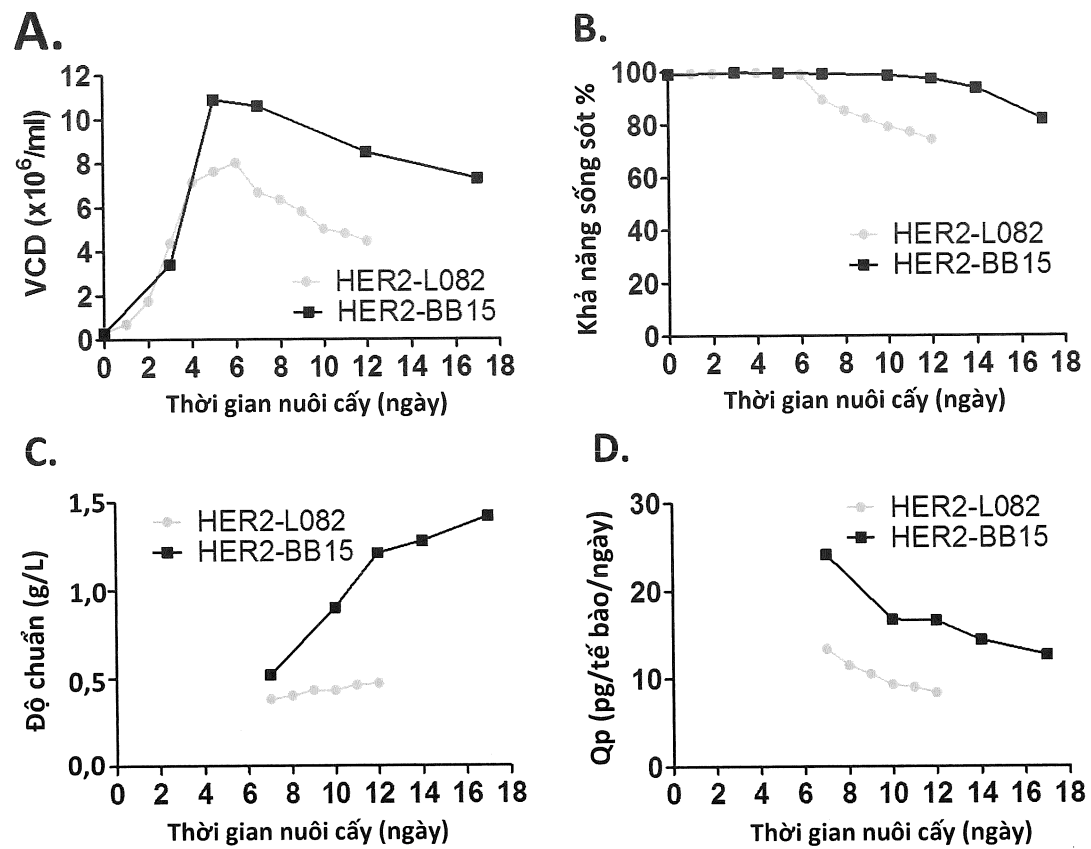


FIG. 14

15/22

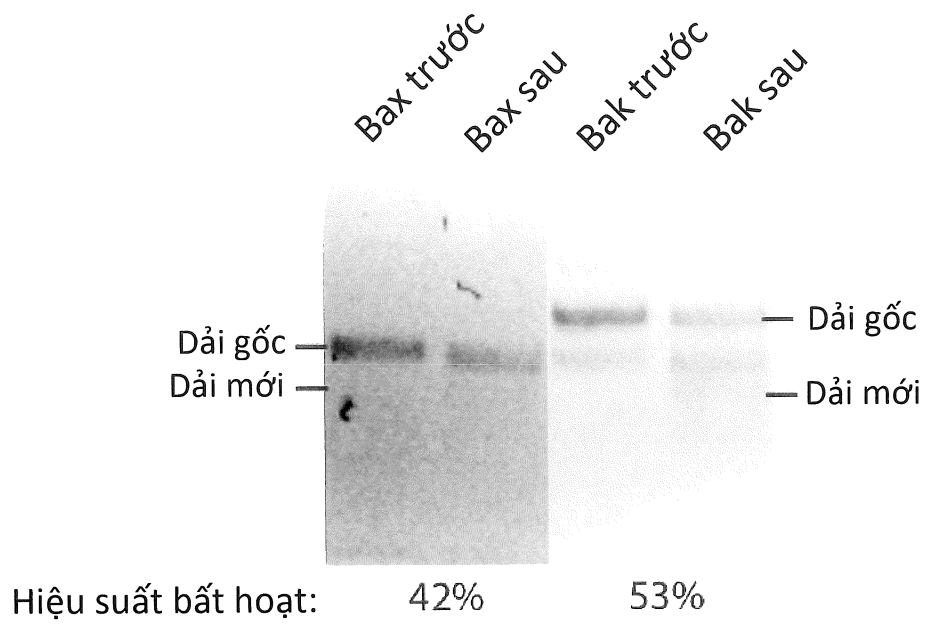
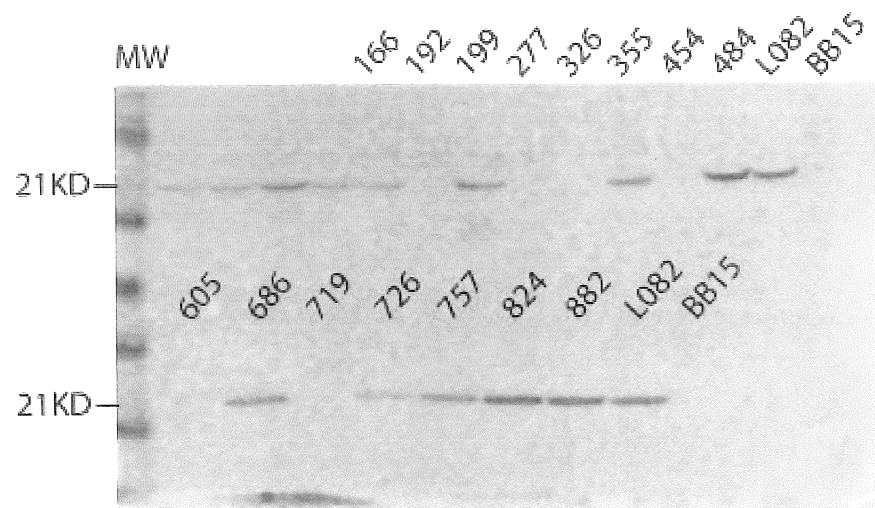
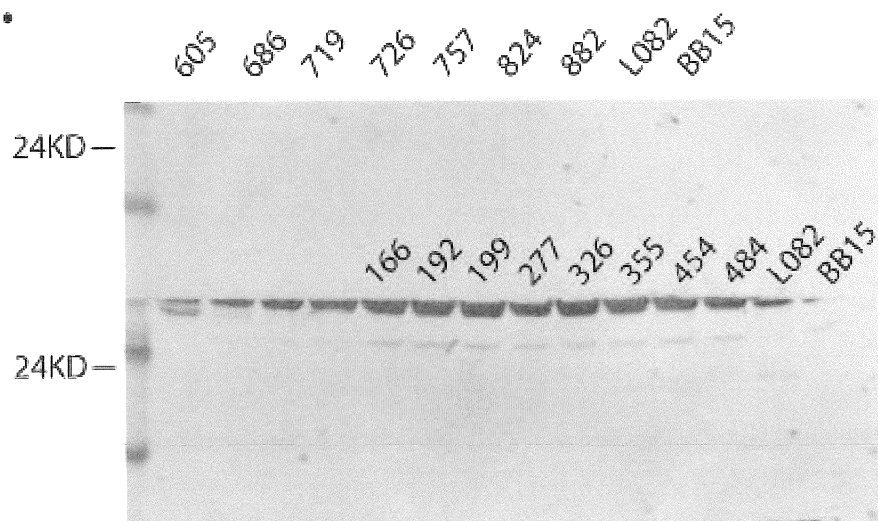
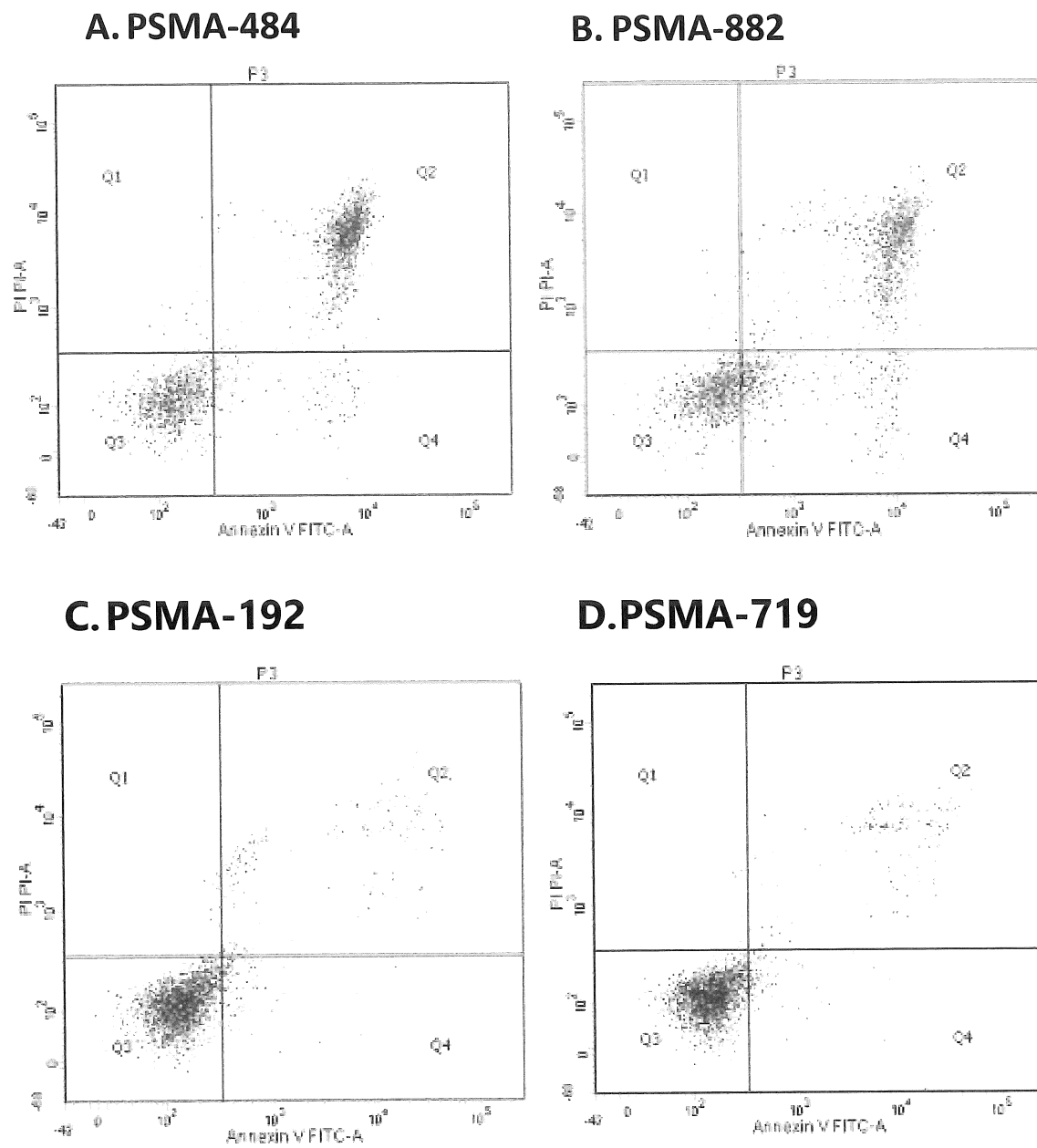


FIG. 15

16/22

A.**B.****FIG. 16**

17/22

**FIG. 17**

18/22

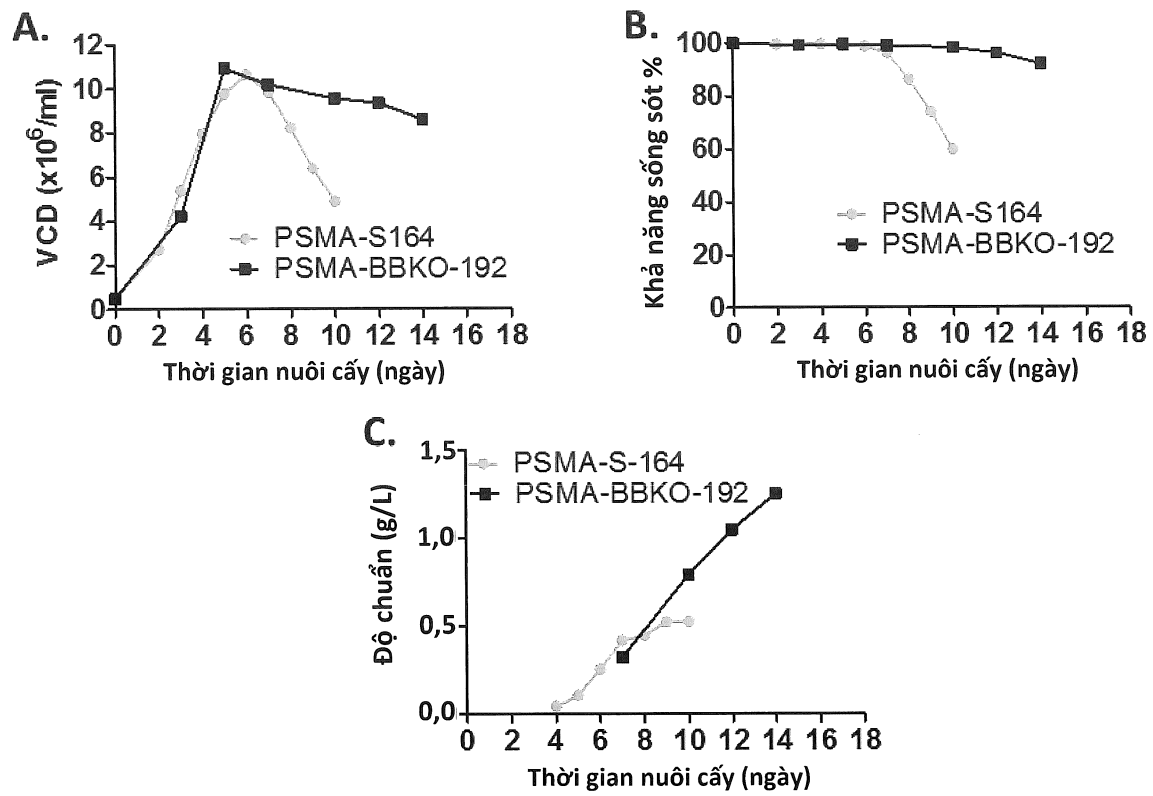


FIG. 18

19/22

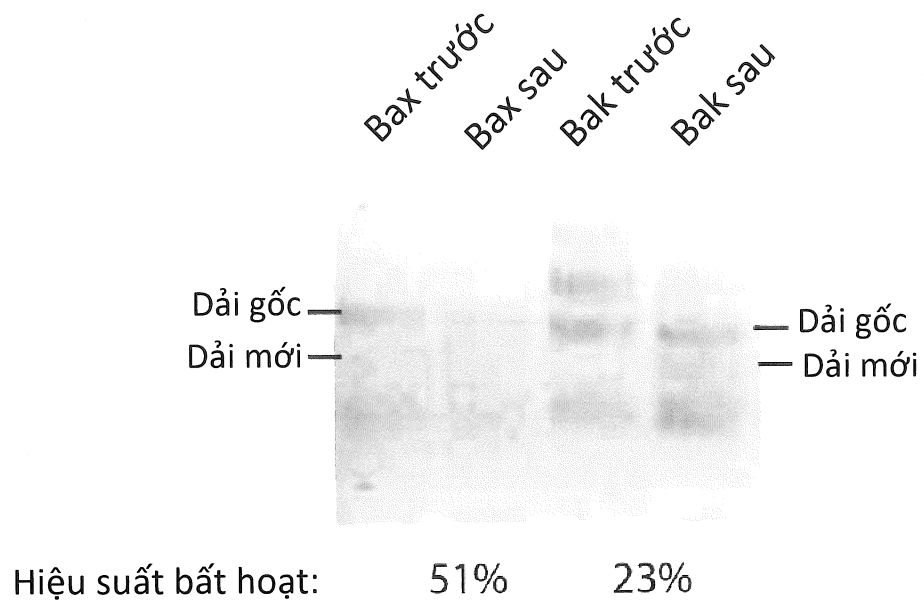
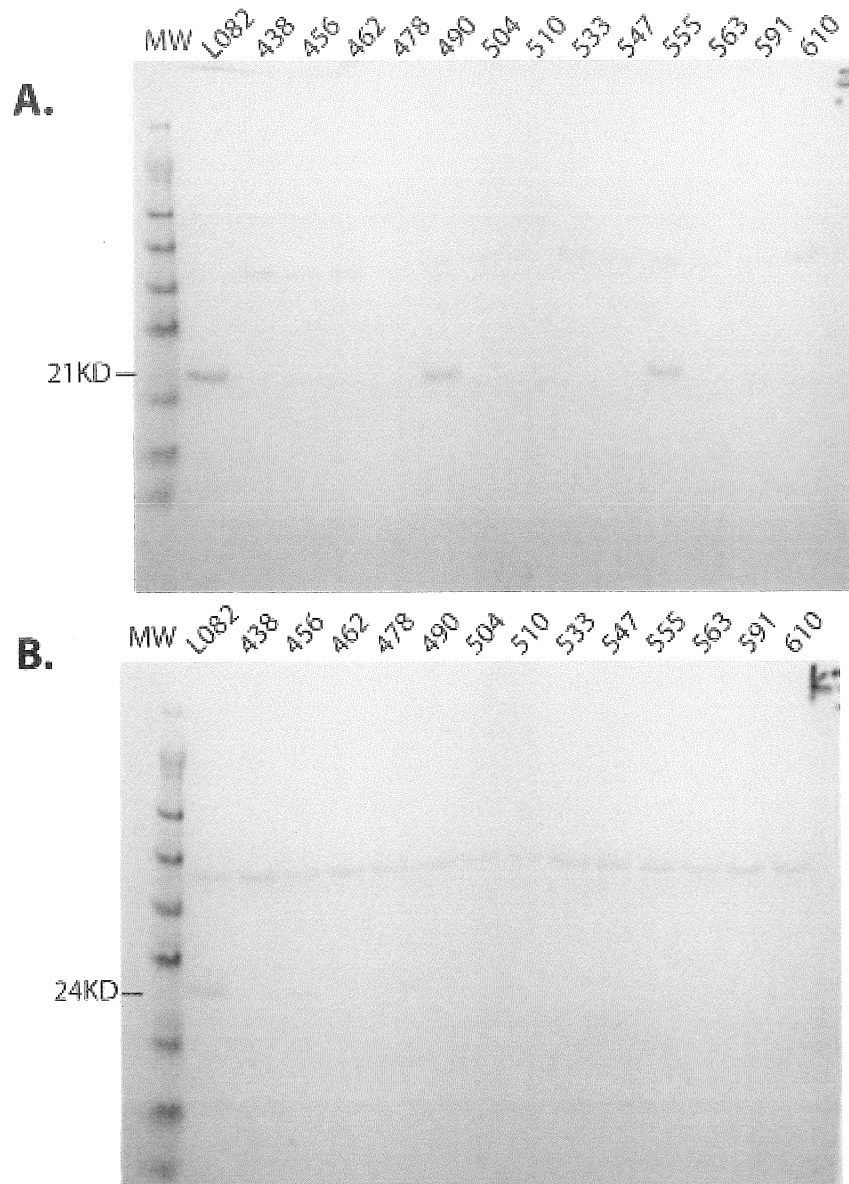
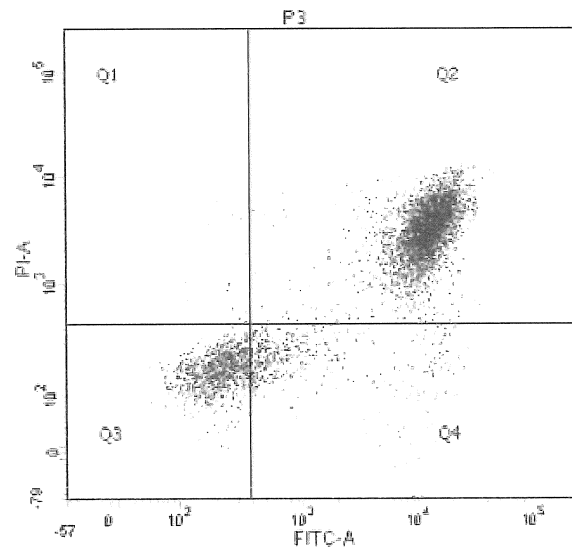
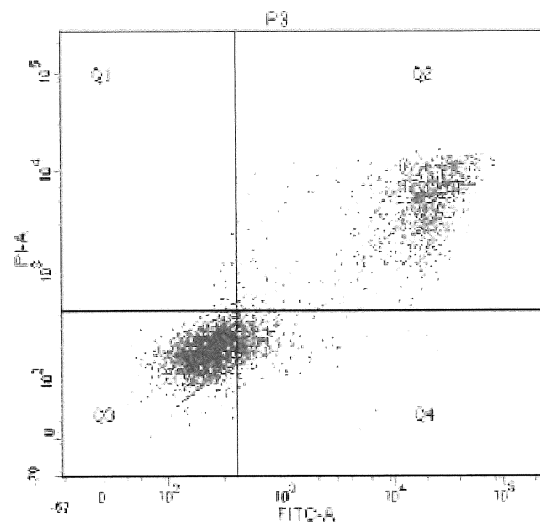


FIG. 19

20/22

**FIG. 20**

21/22

A. CD70-MW-108**B. CD70-BBKO-563**

Dòng tế bào	Tế bào sống sót (Q3)	Tế bào chết theo chương trình sớm (Q4)	Tế bào chết theo chương trình muộn (Q2)	Tế bào chết (Q1)
CD70-MW-108	18,3%	8,8%	72,5%	0,3%
CD70-BBKO-563	60,3%	11,4%	27,9%	0,5%

FIG. 21

22/22

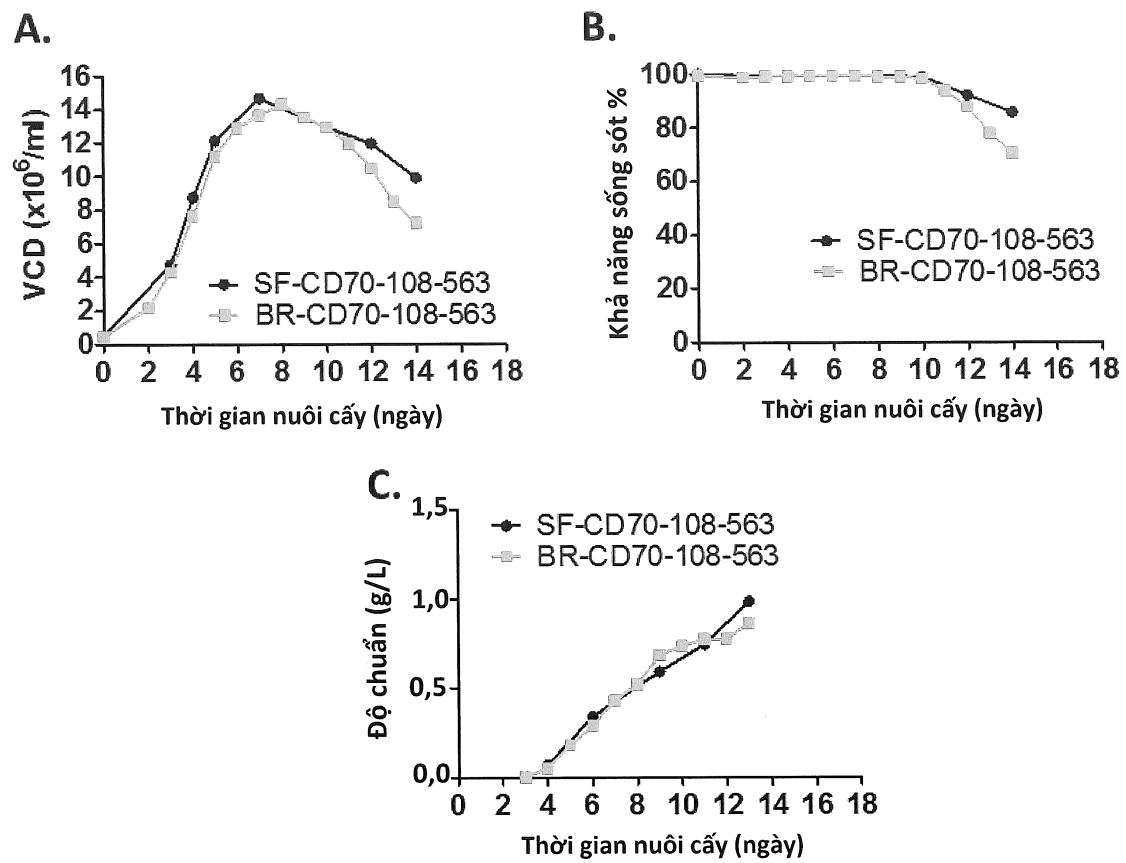


FIG. 22

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Ambrx, Inc
Chen, Sigeng
Lu, Yingchun
Tian, Feng

<120> Phương pháp tạo ra dòng tế bào đã giảm sự chết tế bào theo chương trình để kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein và tế bào hoặc dòng tế bào được phân lập được sản xuất theo phương pháp này

<130> AMBX-0223.00PCT

<150> US62/514,754

<151> 02/06/2017

<160> 92

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 1

aggcactcgc tcaacttct

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 2

tgagtgtgac cggctgttg

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 3

tttcatccag tatcgagct

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 4
gaacaaattg tccatctcg

<210> 5
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 5
atgctgtaag aacgggagt

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 6
gaagccggtc aaaccacgt

<210> 7
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 7
tcatggattg gccagtaac

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 8
ccactgggcg agacggtgc

<210> 9

<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 9
gaagcaccgg tcttgatc

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 10
agctctgtag gtggcgac

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 11
tgacatatgc ctcggaat

<210> 12
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 12
taatcggtgg accccgaat

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 13
aacaggagta tactctcttg

<210> 14
<211> 21
<212> ADN

<213> CHO

<400> 14

cgccagacaa agcctatcgc a

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> CHO

<400> 15

agcctacgat cccaaggggg

<210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 16

gcctcctcga tgtgcctgg

<210> 17

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 17

cattgtccag gtccccctt

<210> 18

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 18

acaatgcccg tcgtctgac

<210> 19

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 19
tgaccctggt catcagcgc

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 20
tcagcgcggt ccaggacca

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 21
tccaggacca ggtggtgcc

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 22
tcgatgagct gatgctttg

<210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 23
agctgatgct ttgggccga

<210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 24
gaggactgcc ccgaagtcc

<210> 25
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 25
ggcgggtgttc gccgagatc

<210> 26
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 26
ccgagatcgg cccgcgcat

<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 27
gcgcatggcc gagttgagc

<210> 28
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 28
cagggcctcg gccgagcct

<210> 29
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 29
cccgtgccg cccccctgt

<210> 30
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 30
ggcttgggga tgccctgcg

<210> 31
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 31
tacatcatcg cccagtgtg

<210> 32
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 32
agcttcttct tgaattcgc

<210> 33
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 33
atgaagacga agagggtca

<210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 34
agatgccccat attattggc

<210> 35
<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 35

atctggactc agaccctt

<210> 36

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 36

gcaggcaatg cattggact

<210> 37

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 37

ctcttttgg cacgtcca

<210> 38

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 38

atccacagtg aatttgtgc

<210> 39

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 39

cgttttgccc gttaagaa

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> CHO

<400> 40
gcagatatgt tattctccgc

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 41
gatccgtcca caacctgggc

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 42
gataaactgc aatctggttg

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 43
agggttatga gcctccctag

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 44
ggctaccatg taaagagacc

<210> 45
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 45

cagacagcct tctcttgct

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> CHO

<400> 46

agagctcctg agaggcatga

<210> 47

<211> 19

<212> ADN

<213> CHO

<400> 47

tttcacgctg tgacaccca

<210> 48

<211> 20

<212> ADN

<213> CHO

<400> 48

cagaaccaca ccaagaattg

<210> 49

<211> 20

<212> ADN

<213> CHO

<400> 49

tgtttaggac cttcggttc

<210> 50

<211> 20

<212> ADN

<213> CHO

<400> 50

atgtcaaggg cactatagac

<210> 51
<211> 19
<212> ADN
<213> CHO

<400> 51
cccaacgcaa gagaccttc

<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 52
agagtgaacc tcagegcacg

<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 53
agtgaaagag agaggagagg

<210> 54
<211> 22
<212> ADN
<213> CHO

<400> 54
gatgaagtga agttgctcta cc

<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 55
ctacgcaagg cacgaggttc

<210> 56

<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 56
ataagcctct gctactccag

<210> 57
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 57
cacttgaaca aaggcatcaa g

<210> 58
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 58
tctcattgag aaggcatgtg c

<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 59
gggaattcca aataggaccc

<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> CHO

<400> 60
ctgctcggga aggttatgtt

<210> 61
<211> 21
<212> ADN

<213> CHO

<400> 61

atggccaagt tgaccagtgc c

<210> 62

<211> 21

<212> ADN

<213> CHO

<400> 62

tcagtctctgc tcctcggcca c

<210> 63

<211> 21

<212> ADN

<213> CHO

<400> 63

atgaaaaagc ctgaactcac c

<210> 64

<211> 21

<212> ADN

<213> CHO

<400> 64

tcattctctt gccctcggac g

<210> 65

<211> 21

<212> ADN

<213> CHO

<400> 65

atgaccgagt acaagcccac g

<210> 66

<211> 21

<212> ADN

<213> CHO

<400> 66
agtccgtggc ccgaacgccc a

<210> 67
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 67
ggcagcgcggt cagccccctg c

<210> 68
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 68
tcagtgccag ttttcttggc t

<210> 69
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 69
gctgagggggg cagcaagctg c

<210> 70
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 70
ctgcccagcc cgaggaggca g

<210> 71
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 71
atgaagctac tcgagaactc c

<210> 72
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 72
tttcacctc accaccctgg c

<210> 73
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 73
caggtgggct cacatcttg c

<210> 74
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 74
tcacatacag atcactggaa c

<210> 75
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 75
tcatactgtg ttgagtggga c

<210> 76
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 76
ccacactaga gagcccacaa c

<210> 77

<211> 24
<212> ADN
<213> CHO

<400> 77
atgccatcat atatcgtgag catc

<210> 78
<211> 23
<212> ADN
<213> CHO

<400> 78
aaacaagctt gttccctaac tag

<210> 79
<211> 22
<212> ADN
<213> CHO

<400> 79
aggagtgtag tgtagtgatg at

<210> 80
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 80
atttgctctg ctgccctaac t

<210> 81
<211> 21
<212> ADN
<213> CHO

<400> 81
tgacagcaat ggactgttct c

<210> 82
<211> 22
<212> ADN

<213> CHO

<400> 82

cagcttcagg atatgtaggg ta

<210> 83

<211> 24

<212> ADN

<213> CHO

<400> 83

aggcactcgc tcaacttcgg tttt

<210> 84

<211> 24

<212> ADN

<213> CHO

<400> 84

cgaagttgag cgagtcctc ggtg

<210> 85

<211> 24

<212> ADN

<213> CHO

<400> 85

tgagtgtgac cggctgttgg tttt

<210> 86

<211> 25

<212> ADN

<213> CHO

<400> 86

caacagcgcc tcactcac cggtg

<210> 87

<211> 25

<212> ADN

<213> CHO

<400> 87

tttcatccat gtatcgagct gtttt

<210> 88

<211> 25

<212> ADN

<213> CHO

<400> 88

agctcgatac tggatgaaga cgggtg

<210> 89

<211> 24

<212> ADN

<213> CHO

<400> 89

gaacaaattg tccatctcgg tttt

<210> 90

<211> 24

<212> ADN

<213> CHO

<400> 90

cgagatggac aatttgttcc ggtg

<210> 91

<211> 24

<212> ADN

<213> CHO

<400> 91

atgctgtaag aacgggagtg tttt

<210> 92

<211> 25

<212> ADN

<213> CHO

<400> 92

cactcccggtt cttacagcat cgggtg