



(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)



1-0048565

(51)^{2020.01} A61K 35/39; C12N 5/071; C12N 5/16; (13) B
C12N 5/074; C12N 5/10; C07K 14/74;
C12N 5/0735

(21) 1-2022-02101

(22) 04/09/2020

(86) PCT/IB2020/058279 04/09/2020

(87) WO 2021/044377 11/03/2021

(30) 62/896,477 05/09/2019 US; 62/979,756 21/02/2020 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/10/2022 415A

(73) CRISPR THERAPEUTICS AG (CH)

Baarerstrasse 14, 6300 Zug, Switzerland

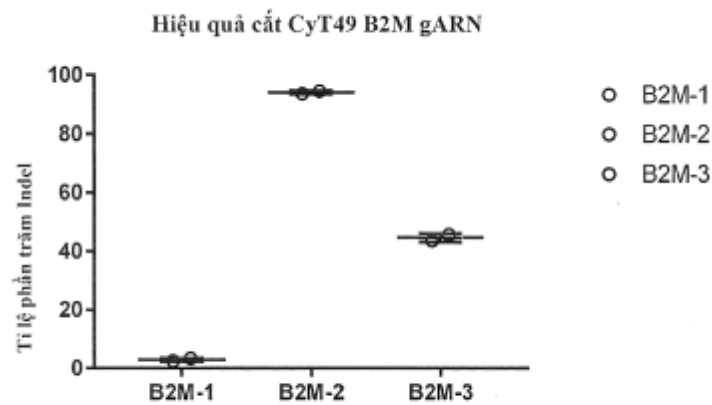
(72) Alireza REZANIA (US); Rebeca RAMOS-ZAYAS (US).

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

(54) TẾ BÀO BIẾN ĐỔI GEN VÀ QUẦN THỂ TẾ BÀO

(21) 1-2022-02101

(57) Sáng chế đề xuất tế bào biến đổi gen chứa trình tự mã hóa mạch E alpha của kháng nguyên tương hợp mô thuộc HLA nhóm 1 (HLA-E) được chèn vào trong gen mã hóa protein tương tác thioredoxin (TXNIP), trong đó tế bào biến đổi gen này biểu hiện HLA-E và không biểu hiện TXNIP. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất quần thể tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn thu được từ nhiều tế bào biến đổi gen.



HÌNH 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Trái ngược với sự biểu hiện tế bào rộng của các gen MHC-I, sự biểu hiện của gen MHC-II bị giới hạn ở tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào đuôi gai, đại thực bào, và tế bào B. Gen kháng nguyên HLA là gen đa hình nhất được quan sát thấy trong hệ gen người (Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow transplantation--how much

is enough?" N Engl J Med., 2001, 345:1842–1844). Sự tạo ra của tế bào "cho vạn năng" mà tương thích với kiểu gen HLA bất kỳ tạo ra chiến lược thay thế mà có thể giải quyết vấn đề về sự thải bỏ miễn dịch và chi phí kinh tế liên quan của các phương pháp hiện nay đối với sự xâm nhập miễn dịch.

Để tạo ra dòng tế bào cho vạn năng này, một phương pháp trước đây là phá vỡ về mặt chức năng sự biểu hiện của các gen lớp MHC-I và MHC-II. Điều này có thể đạt được thông qua sự đứt đoạn di truyền, *ví dụ*, của cả hai alen di truyền mã hóa chuỗi nhẹ MHC-I, B2M. Dòng tế bào không chứa B2M thu được và các dẫn xuất của nó được mong đợi là biểu hiện MHC-I bề mặt được giảm mạnh và do đó, làm giảm tính gây miễn dịch cho các tế bào CD8⁺ T dị sinh. Phương pháp hướng đích nucleaza tác động giống chất hoạt hóa phiên mã (TALEN) đã được sử dụng để tạo ra dòng hESC thiếu hụt B2M bằng cách làm khuyết một số nucleotit trong exon 2 của gen B2M (Lu, P. et al., "Generating hypoinmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin," Stem Cell Rev. 2013, 9:806–813). Mặc dù dòng hESC được hướng đích B2M dường như là thiếu hụt HLA-I bề mặt, chúng được phát hiện là vẫn chứa mARN đặc hiệu đối với B2M và MHC-I. Các mARN của B2M và MHC-I được biểu hiện ở các cấp độ tương đương với các mARN của hESC không được hướng đích (cả cơ định và được gây cảm ứng bởi IFN-g). Do đó, có sự quan tâm về các dòng hESC được hướng đích TALEN B2M có thể biểu hiện MHC-I bề mặt tế bào còn lại mà đủ để gây ra sự thải bỏ miễn dịch, như đã được quan sát thấy với tế bào chuột nhắt B2M2/2 mà cũng biểu hiện B2M mARN (Gross, R. and Rappuoli, R. "Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation," Proc Natl Acad Sci, 1993, 90:3913–3917). Mặc dù dòng hESC được hướng đích B2M TALEN không được đánh giá về các sự kiện phân cắt lệch đích, sự xảy ra của sự phân cắt không đặc hiệu khi sử dụng TALEN vẫn là vấn đề đáng chú ý mà đặt ra mối quan tâm chính về độ an toàn khi sử dụng chúng trong lâm sàng (Grau, J. et al. "TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction," Bioinformatics, 2013, 29:2931–2932; Guilinger J.P. et al. "Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity," Nat Methods 2014, 11:429–435). Hơn nữa, một báo cáo khác tạo ra tế bào IPS mà trốn thoát khỏi sự nhận diện dị sinh bằng cách làm bất hoạt alen B2M thứ nhất và đính gen HLA-E ở alen B2M thứ hai, mà dẫn đến sự biểu hiện bề mặt của dime hoặc trime HLA-E khi không có sự biểu hiện bề mặt của HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C (Gornalusse,

G.G. et al., "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells," *Nature Biotechnology*, 2017, 35, 765-773).

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một số khía cạnh, sáng chế bao hàm phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng. Phương pháp này bao gồm bước phân phối cho tế bào (a) nucleaza hướng vị trí hướng đích vị trí bên trong hoặc gần gen mà mã hóa yếu tố sống sót, và (b) axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch mà được gắn sườn bởi (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích của (a) và (ii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích của (a), trong đó nucleaza hướng vị trí này phân tách vị trí đích của (a) và axit nucleic của (b) được chèn vào ở vị trí mà chồng lấp một phần, chồng lấp hoàn toàn, hoặc được chứa bên trong, vị trí của (a), nhờ đó sinh ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng này có sự sống sót tế bào tăng so với tế bào trong đó axit nucleic của (b) không được chèn vào.

Theo một số phương án, yếu tố sống sót là TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK, hoặc MANF, và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47. Theo các phương án cụ thể, yếu tố sống sót là TXNIP và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là HLA-E. Theo các phương án trong đó nucleaza hướng vị trí là hệ thống CRISPR bao gồm CRISPR nucleaza và ARN dẫn (gARN), CRISPR nucleaza là Cas9 nucleaza loại II hoặc Cpf1 nucleaza loại V, và CRISPR nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân. Theo một số phương án, gARN hướng đích trình tự polynucleotit được chọn từ các SEQ ID NO: 15-24 hoặc 45-54, và (i) về cơ bản gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 25 và (ii) về cơ bản gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 32.

Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước phân phối cho tế bào (c) nucleaza hướng vị trí hướng đích vị trí bên trong hoặc gần gen mà mã hóa một hoặc nhiều loại trong số kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, và (d) axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch mà được gắn sườn bởi (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích của (c) và (iv) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích của (c), trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch của (d) khác với yếu tố sinh dung nạp miễn dịch (b), trong đó nucleaza hướng vị trí tách vị trí đích của (c) và axit nucleic của (d) được chèn vào ở vị trí mà chồng lấp một phần, chồng lấp hoàn toàn, hoặc được chứa bên trong, vị trí của (c), trong đó tế bào cho vượn năng có sự lẫn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào trong đó axit nucleic của (d) không được chèn vào.

Theo một số phương án, gen mà mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là gen MHC-I được chọn từ HLA-A, HLA-B, hoặc HLA-C, gen MHC-II được chọn từ HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, hoặc HLA-DR, hoặc gen được chọn từ B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, hoặc RFXANK, và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47. Theo các phương án cụ thể, gen mà mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là B2M, và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là

PD-L1. Theo các phương án trong đó nucleaza hướng vị trí là hệ thống CRISPR bao gồm CRISPR nucleaza và gARN, CRISPR nucleaza là Cas9 nucleaza loại II hoặc Cpf1 nucleaza loại V, và CRISPR nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân. Theo một số phương án, gARN hướng đích trình tự polynucleotit được chọn từ các SEQ ID NO: 1-3 hoặc 35-44, và (iii) về cơ bản gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 7, và (iv) về cơ bản gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch của (b) và (d) được liên kết hoạt động với trình tự khởi động ngoại sinh. Trình tự khởi động ngoại sinh này có thể được chọn từ trình tự khởi động cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, đặc hiệu mô, hoặc đặc hiệu loại tế bào. Theo một số phương án, trình tự khởi động ngoại sinh là trình tự khởi động CMV, EF1a, PGK, CAG, hoặc UBC. Theo các phương án cụ thể, trình tự khởi động này là trình tự khởi động CAG.

Sáng chế cũng bao hàm các tế bào cho vạn năng được tạo ra bằng các phương pháp được bộc lộ ở đây. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào người. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào gốc đa năng (PSC), tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc và tổ tiên tạo huyết (HSPC) (còn được gọi là tế bào gốc tạo huyết (HSC)). Theo một số phương án, tế bào này là tế bào được biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào soma.

Nói chung, tế bào cho vạn năng được bộc lộ ở đây có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn. Theo một số phương án, tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, các tế bào tiền thân trung mô, các tế bào tiền thân cơ, các tế bào nguyên bào, các tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh, và các tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là các tế bào tiết nội tiết như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, thí nghiệm nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào hệ miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào tim.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng cần điều trị, trong đó phương pháp này bao gồm bước thu được hoặc đã thu được tế bào cho vạn

năng như được bộc lộ ở đây sau sự biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn, và dùng tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn cho đối tượng. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp thu được tế bào để sử dụng cho đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước thu hoặc đã thu được tế bào cho vạn năng như được bộc lộ ở đây, và giữ tế bào cho vạn năng trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện để để tế bào biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn. Theo một số phương án, đối tượng này là người mà bị, nghi ngờ bị, hoặc có nguy cơ bị bệnh. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh có thể di truyền.

Vẫn theo khía cạnh khác của sáng chế bao hàm gARN hướng đích trình tự polynucleotit được chọn từ SEQ ID NO: 15-24 hoặc 45-54.

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

Các dấu hiệu và ưu điểm khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng ở phần mô tả chi tiết sau đây về các phương án của sáng chế, kết hợp với sự tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện phân tích TIDE của việc cắt B2M gARN trong tế bào CyT49. Các gARN của B2M-1, B2M-2, và B2M-3 được thử nghiệm.

Hình 2A-2B thể hiện đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện B2M có và không có IFN- γ trong tế bào WT CyT49 (Hình 2A) và tế bào B2M KO CyT49 (Hình 2B).

Hình 3 thể hiện bản đồ plasmit của vectơ cho B2M-CAGGS-PD-L1 đối với HDR.

Hình 4 thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự đa năng của các tế bào gốc B2M KO/PD-L1 KI CyT49. Các dòng vô tính được tạo dẫn xuất có >99% dương

tính kép đối với OCT4 và SOX2, hai yếu tố phiên mã sống còn đối với sự đa năng. IgG được sử dụng làm đối chứng âm.

Hình 5A-5B thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng của các dòng vô tính tế bào gốc có nguồn gốc từ WT CyT49 (Hình 5A) và KO B2M/KI PD-L1 (Hình 5B). Tế bào WT điều hòa tăng sự biểu hiện B2M khi đáp ứng với IFN γ . Các dòng vô tính KO B2M/KI PD-L1 biểu hiện đầy đủ PD-L1 và không biểu hiện B2M có hoặc không có sự xử lý IFN γ . NT-1= không xử lý. INTG-1= tế bào đã được xử lý 48 giờ bằng 50 ng/ml IFN γ .

Hình 6 thể hiện sự đếm tế bào theo dòng đối với FOXA2 và SOX17 ở tế bào Giai đoạn 1 (nội bì chính thức) được biệt hóa từ tế bào CyT49 kiểu dại, PD-L1 KI/B2M KO, hoặc B2M KO CyT49.

Hình 7 thể hiện tỉ lệ phần trăm định lượng của sự biểu hiện FOXA2 và SOX17 ở tế bào Giai đoạn 1 (Nội Bì Chính Thức) đã biệt hóa từ tế bào kiểu dại, KI PD-L1/KO B2M, hoặc KO B2M.

Hình 8 thể hiện tỉ lệ phần trăm định lượng của sự biểu hiện CHGA, PDX1 và NKX6.1 ở tế bào Giai đoạn 4 (PEC) được biệt hóa từ tế bào kiểu dại, PD-L1 KI/B2M KO, hoặc B2M KO.

Hình 9 thể hiện quần thể khác loại của tế bào ở Giai đoạn 4 (PEC).

Hình 10 thể hiện sự biểu hiện gen được chọn qua khoảng thời gian biệt hóa ở tế bào được biệt hóa từ tế bào kiểu dại, PD-L1 KI/B2M KO, hoặc B2M KO.

Hình 11A-11F thể hiện sự biểu hiện gen được chọn lọc qua khoảng thời gian biệt hóa ở tế bào được biệt hóa từ tế bào kiểu dại, PD-L1 KI/B2M KO, hoặc B2M KO. Hình 11A thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào kiểu dại. Hình 11B thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào KO B2M. Hình 11C thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào KI PD-L1/B2M KO. Hình 11D thể hiện sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào kiểu dại. Hình 11E thể hiện sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào B2M KO. Hình 11F thể hiện sự biểu hiện PD-L1 ở tế bào PD-L1 KI/B2M KO.

Hình 12A-12F thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I và lớp II ở giai đoạn PEC ở tế bào đã biệt hóa từ tế bào kiểu dại, KI PD-L1/B2M KO, hoặc B2M KO. Hình 12A thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I ở tế bào kiểu dại. Hình 12B thể hiện sự biểu hiện MHC

lớp I ở tế bào B2M KO. Hình **12C** thể hiện sự biểu hiện MHC lớp I ở tế bào PD-L1 KI/B2M KO. Hình **12D** thể hiện sự biểu hiện PD-L1 MHC lớp II ở tế bào kiểu đại. Hình **12E** thể hiện sự biểu hiện MHC lớp II ở tế bào B2M KO. Hình **12F** thể hiện sự biểu hiện MHC lớp II ở tế bào PD-L1 KI/B2M KO.

Hình **13** thể hiện phân tích TIDE của việc cắt TXNIP gARN ở các TC1133 hiPSC. T5 dẫn thể hiện là tốt nhất ở sự cắt tại exon 1.

Hình **14** thể hiện bản đồ plasmid của vector cho TXNIP-CAGGS-HLA-E đối với HDR.

Hình **15** thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự đa năng của các tế bào gốc B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI CyT49. Các dòng vô tính được tạo dẫn xuất có >99% dương tính kép đối với OCT4 và SOX2, hai yếu tố phiên mã sống còn đối với sự đa năng. Các dòng vô tính cũng không biểu hiện B2M. Các dòng vô tính không biểu hiện MHC-I.

Hình **16** thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự đa năng của các tế bào gốc B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI CyT49. Các dòng vô tính được tạo dẫn xuất biểu hiện PD-L1 và HLA-E sau khi trải qua sự biệt hóa đến Giai đoạn 6 (tế bào beta chưa trưởng thành). IgG được sử dụng làm đối chứng âm.

Hình **17** thể hiện tỉ lệ phần trăm định lượng của sự biểu hiện CHGA, PDX1 và NKX6.1 ở tế bào Giai đoạn 4 (PEC) được biệt hóa từ kiểu đại, B2M KO, PD-L1 KI/B2M KO (V1A), hoặc TXNIP KO/HLA-E KI (V1B) hESC.

Hình **18A-18B** thể hiện sự biểu hiện gen được chọn lọc qua khoảng thời gian biệt hóa ở tế bào TXNIP KO (Hình **18A**) hoặc tế bào TXNIP KO/HLA-E KI (V1B) (Hình **18B**).

Hình **19A-19B** thể hiện phân tích đếm tế bào theo dòng đối với sự hoạt hóa tế bào T bằng cách sử dụng thử nghiệm tăng sinh CFSE. Tế bào CD3⁺ T sơ cấp của người được đồng ủ với PEC thu được từ các dòng vô tính WT, B2M KO, B2M KO/PD-L1 KI, hoặc B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI CyT49 (Hình **19A**). Hình **19B** tóm tắt sự hoạt hóa tế bào T ở các tế bào khác nhau. ANOVA một chiều ($\alpha = 0,05$ với kiểm định so sánh nhiều thành phần của Dunnett) với “một mình CFSE-T” được đặt làm đối chứng. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. n.s. = không đáng kể.

Hình 20 thể hiện sự biểu hiện gen được chọn qua khoảng thời gian biệt hóa của tế bào được biệt hóa từ tế bào TXNIP KO.

Hình 21 thể hiện sự đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện PDX1 và NKX6.1 ở tế bào PEC được biệt hóa từ tế bào TXNIP KO.

Hình 22 thể hiện hình thái học của các dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI khác nhau (“S6-V1B-H9,” “S6-V1B-3B11,” “S6-V1B-1G7,” và “S6-V1B-3C2”) so với các tế bào kiểu dại (“WT”) và tế bào đối chứng dẫn không cắt (“NCG#1”) sau sự biệt hóa đến Giai đoạn 6.

Hình 23A-23F thể hiện sự biểu hiện gen được chọn của các dòng vô tính sau sự biệt hóa đến Giai đoạn 6. Hình 23A thể hiện sự biểu hiện gen được chọn lọc qua khoảng thời gian biệt hóa từ dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI làm ví dụ. Hình 23B-23F thể hiện sự biểu hiện gen của *INS* (Hình 23B), *NKX6.1* (Hình 23C), *GCG* (Hình 23D), *SST* (Hình 23E), và *GCK* (Hình 23F) ở tế bào kiểu dại (“S6-Cyt49 WT”), tế bào đối chứng dẫn không cắt (“S6-NCG#1”), và các dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI khác nhau (“S6-V1B-H9,” “S6-V1B-3B11,” “S6-V1B-1G7,” và “S6-V1B-3C2”) mà được biệt hóa đến Giai đoạn 6 với dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI chưa được biệt hóa (“ES-V1B-H9”) và đảo kiểu dại (“Đảo”) làm đối chứng.

Hình 24A-24B thể hiện sự đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện *INS* và *GCG* (Hình 24A) và sự biểu hiện *INS* và *NKX6.1* (Hình 24B) ở tế bào Giai đoạn 6 được biệt hóa từ dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI.

Hình 25A-25B thể hiện tỉ lệ phần trăm của sự biểu hiện *INS* (Hình 25A) và sự biểu hiện *NKX6.1* (Hình 25B) ở tế bào Giai đoạn 6 được biệt hóa từ tế bào kiểu dại (“S6-WT”), tế bào đối chứng dẫn không cắt (“S6-NCG#1”), và hai dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI (“S6-V1B003” và “V1B-H9”).

Hình 26A thể hiện sự đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện PDX1 và NKX6.1 ở tế bào Giai đoạn 4 được biệt hóa từ dòng tế bào vô tính 1 (B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI) với các mật độ cấy giống khác nhau.

Hình 26B thể hiện sự đánh giá đếm tế bào theo dòng đối với sự biểu hiện PD-L1 và HLA-E ở tế bào Giai đoạn 4 được biệt hóa từ tế bào dòng vô tính 1 (B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI).

Hình 27A-27C thể hiện sự phân tích đặc điểm của dòng vô tính giống được biệt hóa đến giai đoạn PEC. Hình 27A thể hiện hình thái học, Hình 27B thể hiện sự biểu hiện gen được chọn lọc qua khoảng thời gian biệt hóa, và Hình 27C thể hiện tỉ lệ phần trăm của tế bào biểu hiện CHGA⁺/NKX6.1⁺/PDX1⁺ ở quần thể được biệt hóa.

Hình 28 thể hiện sự biểu hiện gen được chọn lọc qua khoảng thời gian biệt hóa của tế bào được biệt hóa từ dòng vô tính TXNIP KO/HLA-E KI.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Sự làm khuyết: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sự làm khuyết", mà có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với các thuật ngữ "sự làm khuyết di truyền" hoặc "bất hoạt", thường dùng để chỉ cải biến di truyền trong đó vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen được loại bỏ bằng phương pháp sinh học phân tử bất kỳ, ví dụ, phương pháp được mô tả ở đây, ví dụ, bằng cách phân phối đến vị trí của ADN hệ gen endonucleaza và ít nhất một gARN. Số lượng bất kỳ của nucleotit có thể được làm khuyết. Theo một số phương án, sự làm khuyết bao gồm sự loại bỏ của ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất mười, ít nhất mười lăm, ít nhất hai mươi, hoặc ít nhất 25 nucleotit. Theo một số phương án, sự làm khuyết bao gồm sự loại bỏ 10-50, 25-75, 50-100, 50-200, hoặc nhiều hơn 100 nucleotit. Theo một số phương án, sự làm khuyết bao gồm sự loại bỏ toàn bộ gen đích, ví dụ, gen B2M. Theo một số phương án, sự làm khuyết bao gồm sự loại bỏ một phần của gen đích, ví dụ, tất cả hoặc một phần của trình tự khởi động và/hoặc trình tự mã hóa của gen B2M. Theo một số phương án, sự làm khuyết bao gồm sự loại bỏ của yếu tố điều hòa phiên mã, ví dụ, vùng khởi động, của gen đích. Theo một số phương án, sự làm khuyết bao gồm sự loại bỏ của tất cả hoặc một phần của vùng mã hóa nhờ đó sản phẩm được biểu hiện bình thường bởi vùng mã hóa không còn được biểu hiện nữa, được biểu hiện dưới dạng bị cắt cụt, hoặc được biểu hiện ở mức độ giảm. Theo một số phương án, sự làm khuyết dẫn đến sự giảm đi sự biểu hiện của gen so với tế bào không được cải biến.

Endonucleaza: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "endonucleaza" thường dùng để chỉ enzym mà phân cắt liên kết phosphodiester ở trong polynucleotit. Theo một số phương án, endonucleaza phân cắt đặc hiệu liên kết phosphodiester ở trong polynucleotit ADN. Theo một số phương án, endonucleaza là nucleaza ngón tay kềm (ZFN), nucleaza tác động giống chất hoạt hóa phiên mã (TALEN), endonucleaza về nhà (HE), meganucleaza, MegaTAL, hoặc endonucleaza kết hợp CRISPR. Theo một số phương án, endonucleaza là endonucleaza được dẫn bằng ARN. Theo các khía cạnh nhất định, endonucleaza được dẫn bằng ARN là CRISPR nucleaza, ví dụ, CRISPR Cas9 endonucleaza loại II hoặc CRISPR Cpf1 endonucleaza loại V. Theo một số phương án, endonucleaza là Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (còn được biết là Csn1 và Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, hoặc Cpf1 endonucleaza, hoặc thể tương đồng của nó, sự tái tổ hợp của phân tử xuất hiện tự nhiên của nó, phiên bản được tối ưu hóa codon của nó, hoặc phiên bản được cải biến của nó, hoặc các tổ hợp của nó. Theo một số phương án, endonucleaza có thể đưa vào một hoặc nhiều chỗ đứt sợi đơn (SSB) và/hoặc một hoặc nhiều chỗ đứt sợi kép (DSB).

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

ARN dẫn (gARN): Như được dùng ở đây, thuật ngữ "ARN dẫn" hoặc "gARN" thường dùng để chỉ axit ribonucleic ngắn mà có thể tương tác với, ví dụ, liên kết với, endonucleaza và liên kết, hoặc lai hóa với vị trí hoặc vùng hệ gen đích. Theo một số phương án, gARN là ARN dẫn đơn phân tử (sgARN). Theo một số phương án, gARN

có thể bao gồm vùng mở rộng đoạn đệm. Theo một số phương án, gARN có thể bao gồm vùng mở rộng tracrARN. Theo một số phương án, gARN là sợi đơn. Theo một số phương án, gARN bao gồm nucleotit xuất hiện tự nhiên. Theo một số phương án, gARN là gARN được cải biến hóa học. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học là gARN mà bao gồm ít nhất một nucleotit có sự cải biến hóa học, *ví dụ*, sự cải biến đường 2'-O-metyl. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học bao gồm khung axit nucleic được cải biến. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học bao gồm gốc 2'-O-metyl-phosphorothioat. Theo một số phương án, gARN có thể được tạo phức hợp trước với ADN endonucleaza.

Sự cài xen: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "sự cài xen" mà có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với các thuật ngữ "sự cài xen di truyền" hoặc "đính vào", thường dùng để chỉ cải biến di truyền trong đó polynucleotit được đưa vào hoặc được bổ sung vào vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen bằng phương pháp sinh học phân tử bất kỳ, *ví dụ*, phương pháp được mô tả ở đây, *ví dụ*, bằng cách phân phối đến vị trí của ADN hệ gen endonucleaza và ít nhất một gARN. Theo một số phương án, sự cài xen có thể xảy ra ở trong hoặc ở gần vị trí của ADN hệ gen mà đã là vị trí của sự cải biến di truyền trước đó, *ví dụ*, sự làm khuyết hoặc đột biến cài xen-làm khuyết. Theo một số phương án, sự cài xen xảy ra tại vị trí của ADN hệ gen mà gôi lên một phần, gôi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong vị trí của sự cải biến di truyền trước đó, *ví dụ*, sự làm khuyết hoặc đột biến cài xen-làm khuyết. Theo một số phương án, sự cài xen xảy ra ở locut ẩn chứa an toàn. Theo một số phương án, sự cài xen bao gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa protein được quan tâm. Theo một số phương án, sự cài xen bao gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch. Theo một số phương án, sự cài xen bao gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa yếu tố sống sót. Theo một số phương án, sự cài xen bao gồm sự đưa vào của trình tự khởi động ngoại sinh, *ví dụ*, trình tự khởi động cơ định, *ví dụ*, trình tự khởi động CAG. Theo một số phương án, sự cài xen bao gồm sự đưa vào của polynucleotit mà mã hóa gen không mã hóa. Nhìn chung, polynucleotit cần được cài xen được tạo sườn bởi các trình tự (*ví dụ*, các nhánh tương đồng) có độ tương đồng trình tự đáng kể với ADN hệ gen ở hoặc ở gần vị trí của sự cài xen.

Phức hệ tương thích mô chủ yếu lớp I (MHC-I): Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "phức hệ tương thích mô chủ yếu lớp I" hoặc "MHC-I" thường dùng để chỉ

lớp của các phân tử sinh học mà được phát hiện trên bề mặt tế bào của tất cả các tế bào có nhân ở động vật có xương sống, bao gồm động vật có vú, *ví dụ*, người; và có chức năng thể hiện peptit của kháng nguyên không tự thân hoặc lạ, *ví dụ*, protein, từ trong tế bào (*tức là* bào tương) cho tế bào T gây độc tế bào, *ví dụ*, tế bào T CD8+, để kích thích đáp ứng miễn dịch. Theo một số phương án, phân tử sinh học MHC-I là gen MHC-I hoặc protein MHC-I. Sự tạo phức của protein MHC-I với protein beta-2 microglobulin (B2M) là cần thiết đối với sự biểu hiện bề mặt tế bào của tất cả các protein MHC-I. Theo một số phương án, việc làm giảm sự biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu MHC-I người (HLA) so với tế bào không được cải biến bao gồm sự giảm đi (hay sự hạ thấp) sự biểu hiện của gen MHC-I. Theo một số phương án, việc làm giảm sự biểu hiện của kháng nguyên bạch cầu MHC-I người (HLA) so với tế bào không được cải biến bao gồm sự giảm đi (hay sự hạ thấp) sự biểu hiện bề mặt tế bào của protein MHC-I. Theo một số phương án, phân tử sinh học MHC-I là HLA-A (ID Gen NCBI Số: 3105), HLA-B (ID Gen NCBI Số: 3106), HLA-C (ID Gen NCBI Số: 3107), hoặc B2M (ID Gen NCBI Số: 567).

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

HLA-DQA (ID Gen NCBI Số: 3117), HLA-DQB (ID Gen NCBI Số: 3119), HLA-DRA (ID Gen NCBI Số: 3122), hoặc HLA-DRB (ID Gen NCBI Số: 3123).

Polynucleotit: Như được dùng ở đây, thuật ngữ "polynucleotit", mà có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ "axit nucleic" thường dùng để chỉ phân tử sinh học mà bao gồm hai hoặc hơn hai nucleotit. Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm ít nhất hai, ít nhất năm ít nhất mười, ít nhất hai mươi, ít nhất 30, ít nhất 40, ít nhất 50, ít nhất 100, ít nhất 200, ít nhất 250, ít nhất 500, hoặc số lượng bất kỳ của nucleotit. Ví dụ, polynucleotit này có thể bao gồm ít nhất 500 nucleotit, ít nhất khoảng 600 nucleotit, ít nhất khoảng 700 nucleotit, ít nhất khoảng 800 nucleotit, ít nhất khoảng 900 nucleotit, ít nhất khoảng 1000 nucleotit, ít nhất khoảng 2000 nucleotit, ít nhất khoảng 3000 nucleotit, ít nhất khoảng 4000 nucleotit, ít nhất khoảng 4500 nucleotit, hoặc ít nhất khoảng 5000 nucleotit. Polynucleotit có thể là phân tử ADN hoặc ARN hoặc phân tử ADN/ARN lai. Polynucleotit có thể là sợi đơn hoặc sợi kép. Theo một số phương án, polynucleotit là vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen. Theo một số phương án, polynucleotit là gen nội sinh mà được chứa ở trong hệ gen của tế bào không được cải biến hoặc tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, polynucleotit là polynucleotit ngoại sinh mà không được tích hợp vào trong ADN hệ gen. Theo một số phương án, polynucleotit là polynucleotit ngoại sinh mà được tích hợp vào trong ADN hệ gen. Theo một số phương án, polynucleotit là plasmid hoặc vector virus kết hợp adeno. Theo một số phương án, polynucleotit là phân tử mạch vòng hoặc mạch thẳng.

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

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

Đối tượng: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đối tượng" để chỉ động vật có vú. Theo một số phương án, đối tượng là động vật linh trưởng không phải là người hoặc động vật gặm nhấm. Theo một số phương án, đối tượng là người. Theo một số phương án, đối tượng mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc, bệnh hoặc rối loạn. Theo một số phương án, đối tượng có một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh hoặc rối loạn.

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

một số phương án, sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa MANF làm cho tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng, sống sót sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ sống sót cao hơn so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, sự làm khuyết hoặc đột biến cài xen-làm khuyết ở trong hoặc ở gần gen ZNF143, TXNIP, FOXO1, hoặc JNK làm cho tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng, sống sót sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ sống sót cao hơn so với tế bào không được cải biến.

Yếu tố sinh dung nạp miễn dịch: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "yếu tố dung nạp" thường dùng để chỉ protein (*ví dụ*, được biểu hiện bằng cách polynucleotit như mô tả ở đây) mà, khi tăng lên hoặc giảm đi tế bào, làm cho tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng, ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ ở tỉ lệ cao hơn so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là yếu tố sinh dung nạp miễn dịch của người. Theo một số phương án, sự cải biến di truyền của ít nhất một yếu tố sinh dung nạp miễn dịch (*ví dụ*, sự cài xen hoặc sự làm khuyết của ít nhất một yếu tố sinh dung nạp miễn dịch) làm cho tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch với tỉ lệ cao hơn ít nhất 1,05, ít nhất 1,1, ít nhất 1,25, ít nhất 1,5, ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 10, ít nhất 20, hoặc ít nhất 50 lần so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là HLA-E (ID Gen NCBI Số: 3133), HLA-G (ID Gen NCBI Số: 3135), CTLA-4 (ID Gen NCBI Số: 1493), CD47 (ID Gen NCBI Số: 961), hoặc PD-L1 (ID Gen NCBI Số: 29126). Theo một số phương án, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch được chèn vào trong tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch được loại bỏ tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, và/hoặc PD-L1 làm cho tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng, ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ.

Yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II" nói chung để chỉ phân tử sinh học mà điều biến, *ví dụ*., làm tăng hoặc giảm, sự biểu hiện của kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và/hoặc MHC-II. Theo một số phương án, phân tử sinh học là polynucleotit, *ví dụ*, gen, hoặc protein. Theo một số phương án, yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II sẽ làm tăng hoặc làm giảm sự biểu hiện bề mặt tế bào của

ít nhất là một protein MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II sẽ làm tăng hoặc làm giảm sự biểu hiện của ít nhất là một gen MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, yếu tố điều hòa phiên mã là CIITA (ID Gen NCBI Số: 4261) hoặc NLRC5 (ID Gen NCBI Số: 84166). Theo một số phương án, sự làm khuyết hoặc sự hạ thấp của sự biểu hiện của CIITA hoặc NLRC5 làm giảm sự biểu hiện của ít nhất một gen MHC-I hoặc MHC-II.

Tế bào cho vạn năng: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tế bào cho vạn năng" thường dùng để chỉ tế bào được cải biến di truyền mà ít khả năng bị thải bỏ dị sinh hơn trong quá trình cấy tế bào và/hoặc chứng tỏ sự sống sót tăng lên sau khi cấy, so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào được cải biến di truyền như mô tả ở đây là tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng làm tăng sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng làm tăng sự sống sót tế bào so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc hoặc tổ tiên tạo huyết (HSPC) (còn được gọi là tế bào gốc tạo huyết (HSC)). Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào được biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể là tế bào soma (ví dụ, tế bào hệ thống miễn dịch). Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được dùng cho đối tượng. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được dùng cho đối tượng mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma biệt hóa đầy đủ. Theo một số phương án, tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tủy, các tổ tiên nội tiết tủy, các tế bào tiền thân trung mô, các tế bào tiền thân cơ, các tế bào nguyên bào, các tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh. Theo một số phương án, tế bào soma biệt hóa đầy đủ là tế bào tiết nội tiết như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào hệ thống miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào tim.

Tế bào không được cải biến: Như dùng ở đây, thuật ngữ "tế bào không được cải biến" dùng để chỉ tế bào mà không được tiến hành cải biến di truyền bao gồm

polynucleotit hoặc gen mà mã hóa MHC-I, MHC-II, yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II, yếu tố sống sót, và/hoặc yếu tố sinh dung nạp miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc hoặc tế bào tiền thân tạo huyết (HSPC) (còn được gọi là tế bào gốc tạo huyết (HSC)). Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể là tế bào được biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào không được cải biến có thể được chọn từ tế bào soma (ví dụ, tế bào hệ thống miễn dịch, ví dụ, tế bào T, ví dụ, tế bào CD8⁺ T). Nếu tế bào cho vạn năng được so sánh “so với tế bào chưa được cải biến”, tế bào cho vạn năng và tế bào chưa được cải biến là cùng loại tế bào hoặc có chung dòng tế bào bố mẹ thông thường, ví dụ, iPSC cho vạn năng được so sánh so với iPSC chưa được cải biến.

Ở trong hoặc ở gần gen: Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ở trong hoặc ở gần gen" dùng để chỉ vị trí hoặc vùng của ADN hệ gen mà là thành phần intron hoặc exon của gen đó hoặc nằm gần với gen đó. Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen là ở trong gen nếu nó bao gồm ít nhất một phần của intron hoặc exon của gen đó. Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen được định vị gần gen có thể là ở đầu 5' hoặc 3' của gen này (ví dụ, đầu 5' hoặc 3' của vùng mã hóa của gen này). Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen nằm ở gần gen có thể là trình tự khởi động hoặc vùng kìm hãm mà điều biến sự biểu hiện của gen đó. Theo một số phương án, vị trí của ADN hệ gen nằm ở gần gen có thể là ở trên cùng một nhiễm sắc thể như gen đó. Theo một số phương án, vị trí của vùng của ADN hệ gen ở gần gen nếu nó nằm trong 50Kb, 40Kb, 30Kb, 20Kb, 10Kb, 5Kb, 1Kb, hoặc gần với đầu 5' hoặc 3' của gen này (ví dụ, đầu 5' hoặc 3' của vùng mã hóa của gen đã nêu).

II. Phương pháp chỉnh sửa hệ gen

Sự chỉnh sửa hệ gen thường dùng để chỉ quy trình cải biến trình tự nucleotit của hệ gen, tốt hơn là theo phương thức định trước hoặc chính xác. Theo một số phương án, phương pháp chỉnh sửa hệ gen như mô tả ở đây, ví dụ, hệ thống CRISPR-endonucleaza, có thể được sử dụng để cải biến di truyền tế bào như mô tả ở đây, ví dụ, để tạo ra tế bào cho vạn năng. Theo một số phương án, phương pháp chỉnh sửa hệ gen như mô tả ở đây,

ví dụ, hệ thống CRISPR-endonucleaza, có thể được sử dụng để cải biến di truyền tế bào như mô tả ở đây, *ví dụ*, để đưa vào ít nhất một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất một gen mà làm giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và/hoặc MHC-II hoặc thành phần khác của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II so với tế bào không được cải biến; để đưa vào ít nhất một cải biến di truyền mà làm tăng sự biểu hiện của ít nhất một polynucleotit mà mã hóa yếu tố dung nạp so với tế bào không được cải biến; và/hoặc để đưa vào ít nhất một cải biến di truyền mà làm tăng hoặc làm giảm sự biểu hiện của ít nhất một gen mà mã hóa yếu tố sống sót so với tế bào không được cải biến.

Ví dụ về phương pháp chỉnh sửa hệ gen được mô tả ở đây bao gồm phương pháp sử dụng nucleaza hướng vị trí để cắt axit deoxyribonucleic (ADN) ở các vị trí đích chính xác ở hệ gen, nhờ đó tạo ra các điểm đứt gãy ADN sợi đơn hoặc sợi kép ở vị trí cụ thể bên trong hệ gen. Các điểm đứt gãy này có thể và thường xuyên được sửa chữa bằng các quy trình tế bào nội sinh, tự nhiên, như sự sửa chữa định hướng tương đồng (HDR) và sự kết hợp đầu không tương đồng (NHEJ), như đã mô tả trong Cox *et al.*, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges," Nature Medicine, 2015, 21(2), 121-31. Hai quy trình sửa chữa ADN chính này gồm một họ các con đường thay thế. NHEJ kết hợp trực tiếp các đầu ADN tạo ra từ sự đứt gãy sợi kép, đôi khi với sự mất đi hoặc sự thêm vào trình tự nucleotit, mà có thể phá vỡ hoặc tăng cường sự biểu hiện gen. HDR sử dụng trình tự tương đồng, hoặc trình tự cho, làm khuôn để cài xen trình tự ADN xác định tại điểm đứt gãy. Trình tự tương đồng có thể ở trong hệ gen nội sinh, như nhiễm sắc tử chị em. Theo cách khác, trình tự cho có thể là polynucleotit ngoại sinh, như plasmid, oligonucleotit sợi đơn, oligonucleotit sợi kép, oligonucleotit bộ đôi hoặc virus, mà có các vùng (*ví dụ*, các nhánh tương đồng bên trái và bên phải) có độ tương đồng cao với locus được phân cắt bằng nucleaza, nhưng mà cũng có thể chứa trình tự hoặc sự thay đổi trình tự bổ sung bao gồm sự làm khuyết mà có thể được kết hợp vào locus đích đã được phân cắt. Cơ chế sửa chữa thứ ba là sự kết hợp đầu qua trung gian vi tương đồng (MMEJ), còn được gọi là "NHEJ Luân Phiên," trong đó kết quả di truyền tương tự với NHEJ trong đó sự làm khuyết và sự cài xen nhỏ có thể xảy ra tại vị trí phân cắt. MMEJ có thể tạo ra việc sử dụng các trình tự tương đồng của một ít cặp bazơ kẹp hai bên vị trí đứt ADN để tạo ra kết quả sửa chữa kết hợp đầu ADN được ưa thích hơn, và các báo cáo gần đây làm sáng tỏ thêm cơ chế phân tử của quy trình này; xem, *ví dụ*,

Cho and Greenberg, *Nature*, 2015, 518, 174-76; Kent *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2015, 22(3):230-7; Mateos-Gomez *et al.*, *Nature*, 2015, 518, 254-57; Ceccaldi *et al.*, *Nature*, 2015, 528, 258-62. Trong một số trường hợp, có thể dự đoán được kết quả sửa chữa có thể xảy ra dựa trên phân tích của độ vi tương đồng tiềm năng tại vị trí của sự đứt gãy ADN.

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

Hệ thống CRISPR Endonucleaza

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

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

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

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

Theo một số phương án, endonucleaza là Cas9 (protein kết hợp CRISPR 9). Theo một số phương án, Cas9 endonucleaza là từ *Streptococcus pyogenes*, mặc dù các dạng tương đồng Cas9 khác có thể được sử dụng, ví dụ, *S. aureus* Cas9, *N. meningitidis* Cas9, *S. thermophilus* CRISPR 1 Cas9, *S. thermophilus* CRISPR 3 Cas9, hoặc *T. denticola* Cas9. Trong các trường hợp khác, CRISPR endonucleaza là Cpf1, ví dụ, ND2006 Cpf1 *L. bacterium* hoặc BV3L6 Cpf1 *Acidaminococcus* sp.. Theo một số phương án, endonucleaza là Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (còn được biết đến là Csn1 và Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, hoặc Cpf1 endonucleaza. Theo một số phương án, các biến thể kiểu đại có thể được sử dụng. Theo một số phương án, các phiên bản cải biến (ví dụ, chất tương đồng của chúng, sự tái tổ hợp của phân tử xuất hiện tự nhiên của chúng, phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của chúng, hoặc các phiên bản cải biến của chúng) của các endonucleaza trước đây có thể được sử dụng.

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

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

Nucleaza ngón tay kềm

Nucleaza ngón tay kẽm (ZFN) là protein môđun bao gồm miền liên kết ADN ngón tay kẽm được thiết kế được liên kết với miền xúc tác của endonucleaza FokI loại II. Vì FokI chỉ hoạt động dưới dạng dime, cặp ZFN phải được thiết kế để liên kết với các trình tự “nửa vị trí” đích cùng nguồn trên sợi ADN đối diện và với khoảng cách chính xác giữa chúng để có thể tạo thành dime FokI có hoạt tính xúc tác. Khi dime hóa miền FokI, mà bản thân nó không có tính đặc hiệu trình tự thực chất, sự đứt gãy sợi kép ADN được tạo ra giữa các nửa vị trí ZFN như là bước khởi đầu trong việc chỉnh sửa hệ gen.

Miền liên kết ADN của mỗi ZFN thường gồm có 3-6 ngón tay kẽm có kiến trúc Cys2-His2 dư thừa, với mỗi ngón tay chủ yếu nhận diện bộ ba của nucleotit trên một sợi của trình tự ADN đích, mặc dù sự tương tác chéo sợi với nucleotit thứ tư cũng có thể là điều quan trọng. Sự thay đổi của axit amin của ngón tay ở các vị trí mà tạo ra sự tiếp xúc then chốt với ADN làm thay đổi tính đặc hiệu trình tự của ngón tay nhất định. Do đó, protein ngón tay kẽm có bốn ngón tay sẽ nhận diện chọn lọc trình tự đích 12 bp, nơi mà trình tự đích là đa hợp của sự ưu tiên bộ ba đóng góp bởi mỗi ngón tay, mặc dù sự ưu tiên bộ ba có thể bị ảnh hưởng đến mức độ khác nhau bởi các ngón tay lân cận. Khía cạnh quan trọng của ZFN là chúng có thể được hướng đích lại dễ dàng đến hầu như là địa chỉ hệ gen bất kỳ đơn giản là bằng cách cải biến ngón tay cụ thể. Trong hầu hết các ứng dụng của ZFN, protein gồm 4-6 ngón tay được sử dụng, lần lượt nhận diện 12-18 bp. Do đó, cặp ZFN thường nhận diện trình tự đích được kết hợp gồm 24-36 bp, không bao gồm vùng đệm 5-7 bp thông thường giữa các nửa vị trí. Các vị trí liên kết có thể được phân tách thêm bằng vùng đệm lớn hơn, bao gồm 15-17 bp. Trình tự đích có chiều dài này có khả năng là độc nhất trong hệ gen người, giả sử các trình tự lặp lại hoặc chất đồng đẳng gen được loại trừ trong quy trình thiết kế. Tuy vậy, sự tương tác protein-ADN ZFN không phải là tuyệt đối ở tính đặc hiệu của chúng do đó các sự kiện liên kết và phân cắt lệch đích xảy ra, dưới dạng heterodime giữa hai ZFN, hoặc dưới dạng dime cùng loại của ZFN này hoặc ZFN kia. Khả năng sau được triệt tiêu hiệu quả bằng cách thiết kế mặt phân cách dime hóa của miền FokI để tạo ra biến thể “cộng” và “trừ”, cũng đã biết dưới dạng biến thể heterodime bắt buộc, mà có thể chỉ dime hóa với nhau, và không với bản thân chúng. Việc cưỡng ép dime khác loại bắt buộc ngăn chặn sự tạo thành của dime cùng loại. Điều này làm tăng cường đáng kể tính đặc hiệu của ZFN, cũng như là nucleaza khác bất kỳ mà tuân theo các biến thể FokI này.

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

Nucleaza Tác Động Giống Chất Hoạt Hóa Phiên Mã (TALEN)

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

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

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

Endonucleaza về nhà

Endonucleaza về nhà (HE) là các endonucleaza đặc hiệu trình tự mà có các trình tự nhận diện dài (14-44 cặp bazơ) và phân tách ADN với độ đặc hiệu cao – thường ở các vị trí duy nhất trong hệ gen. Có ít nhất sáu họ đã biết của HE như được phân loại theo cấu trúc của chúng, bao gồm GIY-YIG, hộp His-Cis, H-N-H, PD-(D/E)xK, và tương tự Vsr mà có nguồn gốc từ phạm vi vật chủ rộng, bao gồm sinh vật nhân chuẩn, sinh vật nguyên sinh, vi khuẩn, vi khuẩn cổ, vi khuẩn lam và thể thực khuẩn. Như với ZFN và TALEN, HE có thể được sử dụng để tạo ra DSB tại locut đích dưới dạng bước ban đầu trong việc chỉnh sửa hệ gen. Ngoài ra, một số HE tự nhiên và được thiết kế chỉ cắt sợi đơn của ADN, bằng cách đó hoạt động như là nickaza đặc hiệu vị trí. Trình tự đích lớn của HE và tính đặc hiệu mà chúng mang lại làm cho chúng trở thành các ứng viên hấp dẫn để tạo ra DSB đặc hiệu vị trí.

Nhiều hệ thống dựa vào HE đã được mô tả trong lĩnh vực, và các cải biến của nó được báo cáo thường xuyên; xem, *ví dụ*, sự tổng hợp của Steentoft et al., Glycobiology, 2014, 24(8):663-80; Belfort and Bonocora, Methods Mol Biol., 2014, 1123:1-26; và Hafez and Hausner, Genome, 2012, 55(8):553-69.

MegaTAL / Tev-mTALEN / MegaTev

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

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

dCas9-FokI Hoặc dCpf1-FokI và các nucleaza khác

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

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

Endonucleaza được dẫn bằng ARN

Hệ thống endonucleaza được dẫn bằng ARN như được sử dụng ở đây có thể có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất 10%, ít nhất 15%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 99%, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại làm ví dụ, ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, US2014/0068797 Sequence ID No. 8 hoặc Sapranaukas *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 39(21): 9275-9282 (2011). Endonucleaza có thể có độ tương đồng ít nhất 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) qua 10 axit amin liên tiếp. Endonucleaza có thể có độ tương đồng nhiều nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) qua 10 axit amin liên tiếp. Endonucleaza có thể có độ tương đồng ít nhất: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) qua 10 axit amin liên tiếp ở miền HNH nucleaza của endonucleaza. Endonucleaza có thể có độ tương đồng nhiều nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) qua 10 axit amin liên tiếp ở miền HNH nucleaza của endonucleaza. Endonucleaza có thể có độ tương đồng ít nhất: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) qua 10 axit amin liên tiếp ở miền RuvC nucleaza của endonucleaza. Endonucleaza có thể có độ tương đồng nhiều nhất là: 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99, hoặc 100% với endonucleaza kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên) qua 10 axit amin liên tiếp ở miền RuvC nucleaza của endonucleaza.

Endonucleaza có thể bao gồm dạng được cải biến của endonucleaza ví dụ kiểu đại. Dạng được cải biến của endonucleaza ví dụ kiểu đại có thể bao gồm đột biến mà hạ thấp hoạt tính phân cắt axit nucleic của endonucleaza. Dạng được cải biến của endonucleaza ví dụ kiểu đại có thể có ít hơn 90%, ít hơn 80%, ít hơn 70%, ít hơn 60%, ít hơn 50%, ít hơn 40%, ít hơn 30%, ít hơn 20%, ít hơn 10%, ít hơn 5%, hoặc ít hơn 1% của hoạt tính phân cắt axit nucleic của endonucleaza ví dụ kiểu đại (ví dụ, Cas9 từ *S. pyogenes*, nêu trên). Dạng được cải biến của endonucleaza có thể không có hoạt tính phân cắt axit nucleic đáng kể. Khi endonucleaza là dạng được cải biến mà không có hoạt tính phân cắt axit nucleic đáng kể, ở đây nó được đề cập đến dưới dạng "không có hoạt tính enzym."

Các đột biến được dự tính có thể bao gồm sự thế, sự thêm, và sự làm khuyết, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành alanin. Theo một số phương án, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành axit amin khác (ví dụ, glyxin, serin, threonin, xystein, valin, leuxin, isoleuxin, methionin, prolin, phenylalanin, tyrosin, tryptophan, axit aspartic, axit glutamic, asparagin, glutamin, histidin, lysin, hoặc arginin). Theo một số phương án, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành axit amin không tự nhiên (ví dụ, selenomethionin). Theo một số phương án, đột biến chuyển đổi axit amin được gây đột biến thành chất bắt chước axit amin (ví dụ, phosphomimic). Đột biến có thể là đột biến bảo toàn. Ví dụ, sự biến đổi chuyển hóa axit amin đột biến thành các axit amin mà giống kích thước, hình dạng, điện tích, tính phân cực, cấu hình, và/hoặc đồng phân quay của các axit amin đột biến (ví dụ, đột biến xystein/serin, đột biến lysin/asparagin, đột biến histidin/phenylalanin). Đột biến có thể gây ra sự dịch chuyển trong khung đọc và/hoặc sự tạo ra bộ ba kết thúc sớm. Các đột biến có thể gây ra sự thay đổi đối với vùng điều hòa của gen hoặc locut mà ảnh hưởng đến sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen.

Các ARN dẫn

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

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

gARN có thể là ARN dẫn phân tử kép. gARN có thể là ARN dẫn đơn phân tử.

ARN dẫn phân tử kép có thể bao gồm hai sợi của ARN. Sợi thứ nhất chứa theo chiều từ đầu 5' đến 3', trình tự kéo dài vùng đệm tùy chọn, trình tự vùng đệm và trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu. Sợi thứ hai có thể chứa trình tự tracrARN tối thiểu (bổ sung với trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu), trình tự tracrARN đầu 3' và trình tự kéo dài tracrARN tùy chọn.

ARN dẫn đơn phân tử (sgARN) có thể chứa, theo chiều từ đầu 5' đến 3', trình tự kéo dài vùng đệm tùy chọn, trình tự vùng đệm, trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu, cầu nối dẫn đơn phân tử, trình tự tracrARN tối thiểu, trình tự tracrARN đầu 3' và trình tự kéo dài tracrARN tùy chọn. Sự mở rộng tracrARN tùy chọn có thể bao gồm các thành phần mà đóng góp chức năng bổ sung (*ví dụ*, tính ổn định) cho ARN dẫn. Cầu nối dẫn đơn phân tử có thể nối đoạn lặp CRISPR tối thiểu và trình tự tracrARN tối thiểu để tạo thành cấu trúc kẹp tóc. Sự mở rộng tracrARN tùy chọn có thể bao gồm một hoặc nhiều kẹp tóc.

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

Theo một số phương án, sgARN bao gồm trình tự kéo dài vùng đệm mà bao gồm gốc khác (*ví dụ*, trình tự kiểm soát tính ổn định, trình tự liên kết endoribonucleaza, hoặc ribozym). Gốc này có thể làm giảm hoặc làm tăng độ ổn định của axit nucleic hướng đích axit nucleic. Gốc này có thể là đoạn kết thúc phiên mã (*tức là*, trình tự kết thúc phiên mã). Gốc này có thể hoạt động trong tế bào nhân chuẩn. Gốc này có thể hoạt động trong tế bào nhân sơ. Gốc này có thể hoạt động trong cả tế bào nhân chuẩn và tế bào nhân sơ. Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về các gốc thích hợp bao gồm: mũ 5'

(ví dụ, mũ 7-methylguanylat (m⁷ G)), trình tự công tắc ribo (ví dụ, để cho phép độ ổn định được điều hòa và/hoặc khả năng tiếp cận được điều hòa bằng protein và phức hợp protein), trình tự mà tạo thành bộ đôi dsARN (tức là, kẹp tóc), trình tự mà hướng đích ARN đến vị trí dưới tế bào (ví dụ, nhân, ty thể, lục lạp, và dạng tương tự), sự cải biến hoặc trình tự mà mang lại sự theo dõi (ví dụ, định hướng sự liên hợp với phân tử huỳnh quang, sự liên hợp với gốc mà làm thuận lợi cho sự phát hiện huỳnh quang, trình tự mà cho phép sự phát hiện huỳnh quang, v.v.), và/hoặc sự cải biến hoặc trình tự mà tạo ra vị trí liên kết cho protein (ví dụ, protein mà tác động lên ADN, bao gồm chất hoạt hóa phiên mã, chất kìm hãm phiên mã, ADN methyltransferaza, ADN demethylaza, histon acetyltransferaza, histon deacetylaza, và dạng tương tự).

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

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

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

Trình tự vùng đệm mà lai hóa với polynucleotit đích có thể có chiều dài bằng ít nhất khoảng 6 nucleotit (nt). Trình tự vùng đệm có thể có ít nhất khoảng 6 nt, ít nhất

khoảng 10 nt, ít nhất khoảng 15 nt, ít nhất khoảng 18 nt, ít nhất khoảng 19 nt, ít nhất khoảng 20 nt, ít nhất khoảng 25 nt, ít nhất khoảng 30 nt, ít nhất khoảng 35 nt hoặc ít nhất khoảng 40 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 6 nt đến khoảng 19 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 19 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 19 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 45 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 50 nt, hoặc từ khoảng 20 nt đến khoảng 60 nt. Trong một số ví dụ, trình tự vùng đệm có thể bao gồm 20 nucleotit. Trong một số ví dụ, vùng đệm có thể bao gồm 19 nucleotit. Trong một số ví dụ, vùng đệm có thể bao gồm 18 nucleotit. Trong một số ví dụ, vùng đệm có thể bao gồm 22 nucleotit.

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

có thể khác nhau ở từ 1 đến 6 nucleotit, mà có thể được cho là ở dạng phân phình hoặc các phân phình.

Trình tự tracrARN có thể bao gồm các nucleotit mà lai hóa với trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu trong tế bào. Trình tự tracrARN tối thiểu và trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu có thể tạo thành bộ đôi, tức là cấu trúc sợi kép bắt cặp bazơ. Cùng nhau, trình tự tracrARN tối thiểu và đoạn lặp CRISPR tối thiểu có thể liên kết với endonucleaza được dẫn bằng ARN. Ít nhất một phần của trình tự tracrARN tối thiểu có thể lai hóa với trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu. Trình tự tracrARN tối thiểu có thể bổ sung ít nhất khoảng 30%, khoảng 40%, khoảng 50%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, khoảng 95%, hoặc 100% với trình tự đoạn lặp CRISPR tối thiểu.

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

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

Bộ đôi giữa CRISPR ARN tối thiểu và tracrARN tối thiểu có thể bao gồm xoắn kép. Bộ đôi giữa CRISPR ARN tối thiểu và tracrARN tối thiểu có thể bao gồm ít nhất khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit hoặc nhiều hơn. Bộ đôi giữa CRISPR ARN tối thiểu và tracrARN tối thiểu có thể bao gồm nhiều nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit hoặc nhiều hơn.

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

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

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

Trình tự kéo dài tracrARN có thể bao gồm gốc hoạt động (*ví dụ*, trình tự kiểm soát độ ổn định, ribozyme, trình tự liên kết endoribonucleaza). Gốc hoạt động có thể bao gồm đoạn kết thúc phiên mã (*tức là*, trình tự kết thúc phiên mã). Gốc hoạt động có thể có tổng chiều dài từ khoảng 10 nucleotit (nt) đến khoảng 100 nucleotit, từ khoảng 10 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 30 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 40 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 50 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 60 nt đến khoảng 70 nt, từ khoảng 70 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 80 nt đến khoảng 90 nt, hoặc từ khoảng 90 nt đến khoảng 100 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 80 nt, từ

khoảng 15 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 30 nt, hoặc từ khoảng 15 nt đến khoảng 25 nt.

Theo một số phương án, sgARN có thể bao gồm trình tự cầu nối có chiều dài từ khoảng 3 nucleotit đến khoảng 100 nucleotit. Trong Jinek *et al.*, *nêu trên*, ví dụ, "vòng bốn" 4 nucleotit đơn giản (-GAAA-) được sử dụng (Jinek *et al.*, Science, 2012, 337(6096):816-821). Cầu nối minh họa có chiều dài từ khoảng 3 nucleotit (nt) đến khoảng 90 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 70 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 3 nt đến khoảng 10 nt. Ví dụ, cầu nối có thể có chiều dài từ khoảng 3 nt đến khoảng 5 nt, từ khoảng 5 nt đến khoảng 10 nt, từ khoảng 10 nt đến khoảng 15 nt, từ khoảng 15 nt đến khoảng 20 nt, từ khoảng 20 nt đến khoảng 25 nt, từ khoảng 25 nt đến khoảng 30 nt, từ khoảng 30 nt đến khoảng 35 nt, từ khoảng 35 nt đến khoảng 40 nt, từ khoảng 40 nt đến khoảng 50 nt, từ khoảng 50 nt đến khoảng 60 nt, từ khoảng 60 nt đến khoảng 70 nt, từ khoảng 70 nt đến khoảng 80 nt, từ khoảng 80 nt đến khoảng 90 nt, hoặc từ khoảng 90 nt đến khoảng 100 nt. Cầu nối của axit nucleic dẫn đơn phân tử có thể có từ 4 đến 40 nucleotit. Cầu nối này có thể có ít nhất khoảng 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, hoặc 7000 nucleotit hoặc nhiều hơn. Cầu nối này có thể có nhiều nhất khoảng 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, hoặc 7000 nucleotit hoặc nhiều hơn.

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

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

trình tự cầu nối có thể bao gồm nhiều nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, hoặc 5 hoặc hơn 5 gốc hoạt động.

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

sgARN có thể được cải biến hóa học. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học là gARN mà bao gồm ít nhất một nucleotit có sự cải biến hóa học, *ví dụ*, sự cải biến đường 2'-O-methyl. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học bao gồm khung axit nucleic được cải biến. Theo một số phương án, gARN được cải biến hóa học bao gồm gốc 2'-O-methyl-phosphorothioat. Theo một số phương án, các cải biến hóa học làm tăng cường độ ổn định, làm giảm khả năng xảy ra hoặc mức độ của đáp ứng miễn dịch bẩm sinh, và/hoặc làm tăng cường các thuộc tính khác, như được mô tả trong lĩnh vực.

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

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

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

Theo một số phương án, gARN được cải biến có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc đường được thế, *ví dụ*, một trong số các gốc sau đây tại vị trí 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂, hoặc O(CH₂)_n CH₃, trong đó n nằm trong khoảng từ 1 đến khoảng 10; từ C1 đến C10 alkyl bậc thấp, alkoxyalkoxy, alkyl bậc thấp được thế, alkaryl hoặc aralkyl; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, hoặc N-alkyl; O-, S-, hoặc N-alkenyl; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocycloalkyl;

heterocycloalkaryl; aminoalkylamino; polyalkylamino; silyl được thế; nhóm dôi chuyển ARN; nhóm báo cáo; chất xen giữa; 2'-O-(2-metoxyletyl); 2'-metoxy (2'-O-CH₃); 2'-propoxy (2'-OCH₂ CH₂CH₃); và 2'-flo (2'-F). Các cải biến tương tự cũng có thể được tạo ra ở các vị trí khác trên gARN, cụ thể là vị trí 3' của đường trên nucleotit ở đầu cùng 3' và vị trí 5' của nucleotit ở đầu cùng 5'. Trong một số ví dụ, cả đường và liên kết giữa các nucleosit, *tức là*, khung, của các đơn vị nucleotit có thể được thay thế bằng nhóm mới.

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

Các nucleobazơ được cải biến có thể bao gồm các nucleobazơ tổng hợp và tự nhiên khác, như 5-methylxytosin (5-me-C), 5-hydroxymethyl xytosin, xanthin, hypoxanthin, 2-amino adenin, 6-metyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-propyl và các dẫn xuất alkyl khác của adenin và guanin, 2-thiouraxin, 2-thiotymin và 2-thioxytosin, 5-halouraxin và xytosin, 5-propynyl uraxin và xytosin, 6-azo uraxin, xytosin và tymin, 5-uraxin (giả-uraxin), 4-thiouraxin, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl và adenin và guanin được thế 8 khác, 5-halo cụ thể là 5-bromo,

5-triflometyl và uraxin và xytosin được thế 5 khác, 7-metylquanin và 7-metyladenin, 8-azaguanin và 8-azaadenin, 7-deazaguanin và 7-deazaadenin, và 3-deazaguanin và 3-deazaadenin.

Phức hợp của axit nucleic hướng đích hệ gen và endonucleaza

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

Mỗi endonucleaza và gARN có thể được dùng riêng rẽ cho tế bào hoặc đối tượng. Theo một số phương án, endonucleaza có thể được tạo phức hợp từ trước với một hoặc nhiều ARN dẫn, hoặc một hoặc nhiều crARN cùng với tracrARN. Sau đó nguyên liệu đã được tạo phức hợp từ trước này có thể được dùng cho tế bào hoặc đối tượng. Nguyên liệu đã được tạo phức hợp từ trước này đã được biết đến dưới dạng hạt ribonucleoprotein (RNP). Endonucleaza trong RNP có thể là, ví dụ, Cas9 endonucleaza hoặc Cpf1 endonucleaza. Endonucleaza có thể được tạo sườn ở đầu cùng N, đầu cùng C, hoặc cả đầu cùng N và đầu cùng C bằng một hoặc nhiều tín hiệu định vị nhân (NLS). Ví dụ, Cas9 endonucleaza có thể được tạo sườn bằng hai NLS, một NLS nằm ở đầu cùng N và NLS thứ hai nằm ở đầu cùng C. NLS có thể là NLS bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, như NLS SV40. Tỷ lệ phân tử của axit nucleic hướng đích hệ gen so với endonucleaza trong RNP có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1:1 đến khoảng 10:1. Ví dụ, tỷ lệ mol của sgARN so với Cas9 endonucleaza trong RNP có thể là 3:1.

Axit nucleic mã hóa các thành phần hệ thống

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

Axit nucleic mã hóa axit nucleic hướng đích vào hệ gen theo sáng chế, endonucleaza theo sáng chế, và/hoặc phân tử axit nucleic hoặc protein bất kỳ cần để thực hiện khía cạnh của phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm vectơ (ví dụ, vectơ biểu hiện tái tổ hợp).

Thuật ngữ "vectơ" để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Một loại vectơ là "plasmid", mà dùng để chỉ vòng ADN

sợi kép mạch vòng mà các đoạn axit nucleic khác có thể được nối vào đó. Một loại vector khác là vector virus, trong đó mảnh axit nucleic khác có thể được nối vào hệ gen virus. Một số vector có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (*ví dụ*, các vector vi khuẩn có gốc sao chép vi khuẩn và các vector động vật có vú thể bổ sung). Các vector khác (*ví dụ*, các vector động vật có vú không phải thể bổ sung) được tích hợp vào bộ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được sao chép cùng với bộ gen vật chủ.

Trong một số ví dụ, các vector nhất định có thể có khả năng định hướng sự biểu hiện của axit nucleic mà chúng được liên kết hoạt động với. Các vector như vậy được đề cập đến ở đây là "vector biểu hiện tái tổ hợp", hoặc đơn giản hơn là "vector biểu hiện", mà đóng vai trò chức năng tương đương.

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

Vector biểu hiện được dự tính bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vector virus dựa trên virus đậu mùa, virus bại liệt, adenovirus, virus kết hợp adeno, SV40, virus đơn dạng herpes, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, retrovirus (*ví dụ*, virus gây bệnh bạch cầu ở chuột nhắt, virus gây hoại tử lách, và vector có nguồn gốc từ retrovirus như virus ung thư mô liên kết Rous, virus ung thư mô liên kết Harvey, virus gây bệnh bạch cầu ở gia cầm, lentivirus, virus gây suy giảm miễn dịch ở người, virus gây ung thư mô liên kết tăng sinh tủy xương, và virus khối u vú) và các vector tái tổ hợp khác. Các vector khác được dự tính đối với tế bào đích nhân chuẩn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, vector pXT1,

pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG, và pSVLSV40 (Pharmacia). Vector khác có thể được sử dụng miễn là chúng tương thích với tế bào chủ.

Trong một số ví dụ, vector có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần kiểm soát phiên mã và/hoặc dịch mã. Tùy thuộc vào hệ vật chủ/vector được sử dụng, thành phần kiểm soát phiên mã và dịch mã bất kỳ trong số một số lượng các thành phần kiểm soát phiên mã và dịch mã thích hợp, bao gồm trình tự khởi động cấu trúc và cảm ứng, thành phần tăng cường phiên mã, vùng kết thúc phiên mã, v.v. có thể được sử dụng trong vector biểu hiện. Vector có thể là vector tự bất hoạt mà làm bất hoạt các trình tự virus hoặc các thành phần của bộ máy CRISPR hoặc các thành phần khác.

Các ví dụ không giới hạn về các trình tự khởi động sinh vật nhân chuẩn thích hợp (*tức là*, các trình tự khởi động hoạt động ở tế bào nhân chuẩn) bao gồm các trình tự khởi động từ cytomegalovirus (CMV) sớm tức thì, thymidin kinase virus đơn dạng herpes (HSV), SV40 sớm và muộn, các đoạn lặp đầu cùng dài (LTR) từ retrovirus, trình tự khởi động α của yếu tố kéo dài 1 của người (EF1 α), trình tự khởi động beta-actin của gà (CBA), trình tự khởi động ubiquitin C (UBC), cấu trúc lai bao gồm trình tự tăng cường cytomegalovirus được dung hợp với trình tự khởi động beta-actin của gà (CAG), cấu trúc lai bao gồm trình tự tăng cường cytomegalovirus được dung hợp với trình tự khởi động, exon thứ nhất, và intron thứ nhất của gen beta-actin gà (CAG hoặc CAGGS), trình tự khởi động virus tế bào gốc chuột (MSCV), trình tự khởi động locut phosphoglycerat kinase-1 (PGK), và trình tự khởi động metallothionein-I chuột nhắt.

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

Sự đưa các phức hợp, các polypeptit, và các axit nucleic theo sáng chế vào trong các tế bào có thể xảy ra bởi sự chuyển nhiễm virus hoặc thể thực khuẩn, chuyển nạp, liên hợp, dung hợp tế bào trần, chuyển nạp nhờ lysosom, xung điện, chuyển nhiễm nhờ

axit nucleic, sự kết tủa canxi phosphat, sự chuyển nạp qua trung gian polyethyleneimin (PEI), sự chuyển nạp qua trung gian DEAE-dextran, sự chuyển nạp qua trung gian liposom, công nghệ bắn hạt, sự kết tủa canxi phosphat, vi tiêm trực tiếp, phân phối axit nucleic qua trung gian hạt nano, và loại tương tự.

III. Các Chiến Lược Để Tránh Khỏi Đáp Ứng Miễn Dịch Và Làm Tăng Sự Sống Sót

Được mô tả ở đây là các chiến lược để cho phép tế bào được cải biến di truyền, *tức là*, tế bào cho vạn năng, tăng sự sống sót hoặc khả năng sống được của chúng và/hoặc lẫn tránh sự đáp ứng miễn dịch sau khi ghép vào đối tượng. Theo một số phương án, các chiến lược này cho phép tế bào cho vạn năng sống sót và/hoặc lẫn tránh sự đáp ứng miễn dịch ở tỉ lệ thành công cao hơn so với tế bào chưa được cải biến. Theo một số phương án, các tế bào được cải biến di truyền bao gồm sự đưa ít nhất một sự cải biến di truyền vào bên trong hoặc gần ít nhất một gen mà mã hóa yếu tố sống sót, trong đó sự cải biến di truyền này bao gồm sự cài xen của polynucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch. Tế bào cho vạn năng này có thể còn bao gồm ít nhất một sự cải biến di truyền bên trong hoặc gần gen mà mã hóa một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, trong đó sự cải biến di truyền này bao gồm sự cài xen của polynucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai.

Theo một số phương án, tế bào được cải biến di truyền bao gồm sự đưa vào ít nhất một cải biến di truyền ở trong hoặc ở gần ít nhất một gen mà làm giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II so với tế bào không được cải biến; ít nhất một cải biến di truyền mà làm tăng sự biểu hiện của ít nhất một polynucleotit mà mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch so với tế bào không được cải biến; và ít nhất một cải biến di truyền mà làm thay đổi sự biểu hiện của ít nhất một gen mà mã hóa yếu tố sống sót so với tế bào không được cải biến. Theo phương án khác, tế bào được cải biến di truyền bao gồm ít nhất một sự làm khuyết hoặc đột biến cài xen-làm khuyết ở trong hoặc ở gần ít nhất một gen mà làm thay đổi sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II so với tế bào không được cải biến; và ít nhất một sự cài xen của polynucleotit mà mã hóa ít nhất một

yếu tố sinh dung nạp miễn dịch tại vị trí mà gồi lên một phần, gồi lên hoàn toàn, hoặc được chứa trong, vị trí của sự làm khuyết của gen mà làm thay đổi sự biểu hiện của một hoặc nhiều HLA MHC-I và MHC-II. Theo phương án khác nữa, tế bào được cải biến di truyền bao gồm ít nhất một cải biến di truyền mà làm thay đổi sự biểu hiện của ít nhất một gen mà mã hóa yếu tố sống sót so với tế bào không được cải biến.

Các gen mà mã hóa phức hệ tương thích mô chủ yếu (MHC) nằm trên Chr. 6P21 của người. Các protein thu được được mã hóa bởi các gen MHC là loạt protein bề mặt mà thiết yếu trong khả năng tương thích thể cho trong quá trình cấy tế bào. Các gen MHC được chia thành MHC lớp I (MHC-I) và MHC lớp II (MHC-II). Các gen MHC-I (HLA-A, HLA-B, và HLA-C) được biểu hiện ở hầu hết tất cả các loại tế bào mô, trình diện peptit được xử lý bằng kháng nguyên “không tự thân” với tế bào CD8⁺ T, nhờ đó thúc đẩy sự hoạt hóa của chúng thành tế bào CD8⁺ T dung giải tế bào. Tế bào được cấy hoặc được ghép biểu hiện các phân tử MHC-I “không tự thân” sẽ gây ra sự đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh được định hướng ở các tế bào này và cuối cùng dẫn đến sự chết đi của chúng do tế bào CD8⁺ T dung giải tế bào đã được hoạt hóa. Protein MHC-I ban đầu được kết hợp với beta-2-microglobulin (B2M) trong lưới nội chất, mà thiết yếu để tạo thành các phân tử MHC-I chức năng trên bề mặt tế bào. Ngoài ra, có ba phân tử MHC-Ib không cổ điển (HLA-E, HLA-F, và HLA-G), mà có chức năng điều hòa miễn dịch. Phân tử sinh học MHC-II bao gồm HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, và HLA-DR. Do chức năng cơ bản của chúng trong đáp ứng miễn dịch, các phân tử sinh học MHC-I và MHC-II đóng góp vào sự thải bỏ miễn dịch sau khi ghép tế bào của tế bào không phải của vật chủ, *ví dụ*, ghép tế bào nhằm mục đích làm thuốc tái tạo.

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

Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự cải biến hệ gen của một hoặc nhiều gen MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự cải biến hệ gen của một hoặc nhiều trình tự polynucleotit mà điều hòa sự biểu hiện của MHC-I và/hoặc MHC-II. Theo một số phương án, cải biến di truyền theo sáng chế được thực hiện bằng

cách sử dụng phương pháp chỉnh sửa gen bất kỳ bao gồm nhưng không giới hạn ở các phương pháp được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, việc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II so với tế bào không được cải biến được thực hiện bằng cách hướng đích, *ví dụ*, để làm khuyết và/hoặc cài xen di truyền của ít nhất một cặp bazơ, trong gen MHC-I và/hoặc MHC-II một cách trực tiếp. Theo một số phương án, việc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II so với tế bào không được cải biến được thực hiện bằng cách hướng đích, *ví dụ*, để làm khuyết di truyền, gen CIITA. Theo một số phương án, việc làm giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I và MHC-II so với tế bào không được cải biến được thực hiện bằng cách hướng đích, *ví dụ*, để làm khuyết di truyền, ít nhất một yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II là gen NLRC5, hoặc CIITA. Theo một số phương án, yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II là gen RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF-1, và/hoặc TAP1.

Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen HLA-A, HLA-B, và/hoặc HLA-C. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của trình tự khởi động của gen HLA-A, HLA-B, và/hoặc HLA-C. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của gen mà mã hóa yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II. Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm khuyết toàn bộ hoặc một phần của trình tự khởi động của gen mà mã hóa yếu tố điều hòa phiên mã của MHC-I hoặc MHC-II.

Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm giảm sự biểu hiện của beta-2-microglobulin (B2M). B2M là gen không đa hình mà mã hóa tiểu đơn vị protein chung cần thiết cho sự biểu hiện bề mặt của tất cả các chuỗi nặng MHC lớp I đa hình. Protein HLA-I ban đầu được kết hợp với B2M trong lưới nội chất, mà thiết yếu để tạo thành các phân tử HLA-I được biểu hiện ở bề mặt tế bào, có chức năng. Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen B2M bao gồm trình tự 5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3' (SEQ ID NO: 1). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen B2M bao gồm trình tự

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

Theo một số phương án, hệ gen của tế bào đã được cải biến để làm giảm sự biểu hiện của protein tương tác với thioredoxin (TXNIP). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GAAGCGTGTCTTCATAGCGC-3' (SEQ ID NO: 15). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TTACTCGTGTCAAAGCCGTT-3' (SEQ ID NO: 16). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TGTC AAAGCCGTTAGGATCC-3' (SEQ ID NO: 17). Theo một số phương án, gARN

hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GCCGTTAGGATCCTGGCTTG-3' (SEQ ID NO: 18). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GCGGAGTGGCTAAAGTGCTT-3' (SEQ ID NO: 19). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TCCGCAAGCCAGGATCCTAA-3' (SEQ ID NO: 20). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GTTTCGGCTTTGAGCTTCCTC-3' (SEQ ID NO: 21). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GAGATGGTGATCATGAGACC-3' (SEQ ID NO: 22). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TTGTACTCATATTTGTTTCC-3' (SEQ ID NO: 23). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-AACAAATATGAGTACAAGTT-3' (SEQ ID NO: 24). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GAAGCGTGTCTTCATAGCGCAGG-3' (SEQ ID NO: 45). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TTACTCGTGTCAAAGCCGTTAGG-3' (SEQ ID NO: 46). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TGTCAAAGCCGTTAGGATCCTGG-3' (SEQ ID NO: 47). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GCCGTTAGGATCCTGGCTTGCGG-3' (SEQ ID NO: 48). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GCGGAGTGGCTAAAGTGCTTTGG-3' (SEQ ID NO: 49). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TCCGCAAGCCAGGATCCTAACGG-3' (SEQ ID NO: 50). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GTTTCGGCTTTGAGCTTCCTCAGG-3' (SEQ ID NO: 51). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-GAGATGGTGATCATGAGACCTGG-3' (SEQ ID NO: 52). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-TTGTACTCATATTTGTTTCCAGG-3' (SEQ ID NO: 53). Theo một số phương án,

gARN hướng đích vị trí bên trong gen TXNIP bao gồm trình tự 5'-AACAAATATGAGTACAAGTTCGG-3' (SEQ ID NO: 54). Theo một số phương án, gARN hướng đích vị trí đích bên trong gen TXNIP mà bao gồm trình tự polynucleotit có trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 15-24 hoặc 45-54. Theo một số phương án, gARN hướng đích trình tự polynucleotit có trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, hoặc SEQ ID NO: 24. Phức hợp gARN/CRISPR nucleaza hướng đích và phân tách vị trí đích ở locut gen TXNIP. Việc sửa chữa chỗ đứt sợi kép bằng cách NHEJ có thể dẫn đến sự làm khuyết của ít nhất trên nucleotit và/hoặc sự cài xen của ít nhất một nucleotit, nhờ đó phá vỡ hoặc loại trừ sự biểu hiện của TXNIP. Theo cách khác, sự cài xen của polynucleotit mã hóa gen ngoại sinh vào trong locut gen TXNIP có thể làm đứt gãy hoặc loại bỏ sự biểu hiện của TXNIP.

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

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

Theo một số phương án, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch có thể được cài xen hoặc được tái cài xen vào trong tế bào được cải biến di truyền để tạo ra tế bào cho vạn năng có đặc quyền miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng được bộc lộ ở đây đã được cải biến thêm để biểu hiện một hoặc nhiều yếu tố sinh dung nạp miễn dịch. Các yếu tố sinh dung nạp miễn dịch làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, một hoặc nhiều loại trong số HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, chất ức chế CI, và IL-35. Theo một số phương án, sự cải biến di truyền, ví dụ, sự cài xen, của ít nhất một polynucleotit mã hóa ít nhất một yếu tố sinh dung nạp miễn dịch làm

cho tế bào cho vạ năng ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch với tỉ lệ cao hơn ít nhất 1,05, ít nhất 1,1, ít nhất 1,25, ít nhất 1,5, ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 10, ít nhất 20, hoặc ít nhất 50 lần so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, sự cài xen của polynucleotit mã hóa HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, và/hoặc PD-L1 làm cho tế bào cho vạ năng ức chế hoặc tránh khỏi sự thải bỏ miễn dịch sau khi cấy hoặc ghép vào đối tượng vật chủ.

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

Theo một số phương án, các nhánh tương đồng được sử dụng với B2M dẫn (ví dụ, gARN bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1-3, 35-44). Theo một số phương án, các nhánh tương đồng được thiết kế để được sử dụng với đoạn dẫn B2M bất kỳ mà sẽ loại bỏ vị trí bắt đầu của gen B2M. Theo một số phương án, các nhánh tương đồng B2M có thể bao gồm hoặc chủ yếu gồm có trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 hoặc 13, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 7 hoặc 13. Theo một số phương án,

nhánh tương đồng B2M bên trái có thể bao gồm hoặc chủ yếu gồm có SEQ ID NO: 7, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 7. Theo một số phương án, nhánh tương đồng B2M bên phải có thể bao gồm hoặc chủ yếu gồm có SEQ ID NO: 13, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 13.

Theo một số phương án, các nhánh tương đồng được sử dụng với sự dẫn TXNIP (ví dụ., các gARN bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 15-24). Theo một số phương án, các nhánh tương đồng được thiết kế để sử dụng với sự dẫn TXNIP bất kỳ mà hướng đích exon 1 của TXNIP (ví dụ., các gARN bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 15-20). Theo một số phương án, các nhánh tương đồng TXNIP này có thể bao gồm hoặc về cơ bản gồm trình tự polynucleotit của SEQ ID NO: 25 hoặc 32, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 25 hoặc 32. Theo một số phương án, nhánh tương đồng TXNIP bên trái có thể bao gồm hoặc về cơ bản gồm SEQ ID NO: 25, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, nhánh tương đồng TXNIP bên phải có thể bao gồm hoặc về cơ bản gồm SEQ ID NO: 32, hoặc trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất 85%, 90%, 95%, hoặc 99% với trình tự của SEQ ID NO: 32.

Ít nhất một polynucleotit mã hóa ít nhất một yếu tố sinh dung nạp miễn dịch có thể được liên kết hoạt động với trình tự khởi động ngoại sinh. Trình tự khởi động ngoại sinh có thể là trình tự khởi động cơ định, cảm ứng, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc kiểu tế bào. Theo một số phương án, trình tự khởi động ngoại sinh là trình tự khởi động CMV, EF1a, PGK, CAG, hoặc UBC.

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

Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa PD-L1 được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa PD-L1 được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M đồng thời với, hoặc sau khi làm khuyết tất cả hoặc một phần của gen hoặc trình tự khởi động B2M. Polynucleotit mã hóa PD-L1 được liên kết hoạt động với trình tự khởi động ngoại sinh. Trình tự khởi động ngoại sinh có thể là trình tự khởi động CMV. Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa HLA-E được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M. Theo một số phương án, polynucleotit mã hóa HLA-E được cài xen tại vị trí ở trong hoặc ở gần locut gen B2M đồng thời với, hoặc sau khi làm khuyết tất cả hoặc một phần của gen hoặc trình tự khởi động B2M. Polynucleotit mã hóa HLA-E được liên kết hoạt động với trình tự khởi động ngoại sinh. Trình tự khởi động ngoại sinh có thể là trình tự khởi động CMV. Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, và/hoặc 30. Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 55.

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

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

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

Theo một số phương án, ít nhất một polynucleotit mã hóa ít nhất một yếu tố sinh dung nạp miễn dịch có thể được phân phối đến các tế bào là bộ phận của vector. Ví dụ, vector này có thể là vector plasmit. Theo các phương án khác nhau, lượng vector plasmit được phân phối vào trong tế bào có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,5 μ g đến khoảng

10 μg (trên mỗi khoảng 10^6 tế bào). Theo một số phương án, lượng plasmid này có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 μg đến khoảng 8 μg , từ khoảng 2 μg đến khoảng 6 μg , hoặc từ khoảng 3 μg đến khoảng 5 μg . Theo các phương án cụ thể, lượng plasmid được phân phối đến tế bào có thể là khoảng 4 μg .

Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của một hoặc nhiều yếu tố sống sót. Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự cài xen của một hoặc nhiều trình tự polynucleotit mà mã hóa yếu tố sống sót. Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự làm khuyết của một trong số nhiều các yếu tố sống sót. Theo một số phương án, cải biến di truyền theo sáng chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp chỉnh sửa gen bất kỳ bao gồm nhưng không giới hạn ở các phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của ít nhất một yếu tố sống sót so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là thành viên hoặc con đường quan trọng tham gia vào sự sống sót tế bào, *ví dụ*, sự giảm oxy huyết, các loại oxy phản ứng, sự mất đi chất dinh dưỡng, và/hoặc căng thẳng oxy hóa. Theo một số phương án, cải biến di truyền của ít nhất một yếu tố sống sót làm cho tế bào cho vụn năng sống sót trong khoảng thời gian dài hơn, *ví dụ*, khoảng thời gian dài hơn ít nhất 1,05, ít nhất 1,1, ít nhất 1,25, ít nhất 1,5, ít nhất 2, ít nhất 3, ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 10, ít nhất 20, hoặc ít nhất 50 lần, so với tế bào không được cải biến sau khi ghép. Theo một số phương án, yếu tố sống sót là ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

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

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

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

Theo các phương án nhất định, tế bào không có sự biểu hiện MHC-II và sự biểu hiện vừa phải của MHC-I được cải biến di truyền để không có sự biểu hiện bề mặt của MHC-I hoặc MHC-II. Theo phương án khác, tế bào không có sự biểu hiện bề mặt của MHC-I/II được chỉnh sửa thêm để có sự biểu hiện của PD-L1, *ví dụ*, sự cài xen của polynucleotit mã hóa PD-L1. Theo phương án khác nữa, tế bào không có sự biểu hiện bề mặt của MHC-I/II được chỉnh sửa thêm để có sự biểu hiện của PD-L1, *ví dụ*, sự cài xen của polynucleotit mã hóa PD-L1, và cũng được cải biến di truyền để làm tăng hoặc làm giảm sự biểu hiện của ít nhất một gen mà mã hóa yếu tố sống sót so với tế bào không được cải biến.

Theo một số phương án, tế bào còn chứa sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi, *ví dụ*, bằng cách cải biến di truyền, của một hoặc nhiều gen khác mà không nhất thiết được kéo theo trong sự lẩn tránh miễn dịch hoặc sự sống sót tế bào sau cấy ghép. Theo một số phương án, tế bào còn chứa sự biểu hiện tăng của một hoặc nhiều protein công tắc an toàn so với tế bào không được cải biến. Theo một số phương án, tế bào bao gồm sự biểu hiện tăng của một hoặc nhiều gen khác mà mã hóa protein công tắc an toàn. Theo một số phương án, công tắc an toàn cũng là gen tự sát. Theo một số phương án, công tắc an toàn là tymidin kinaza virut đơn dạng herpes-1 (HSV-tk) hoặc caspaza-9 có thể cảm ứng. Theo một số phương án, polynucleotit mà mã hóa ít nhất một công tắc an toàn được cài xen vào hệ gen, *ví dụ*, vào locut ẩn chứa an toàn. Theo một số phương án khác, một hoặc nhiều gen khác mà được cải biến di truyền mã hóa một hoặc nhiều trong số protein công tắc an toàn; thể thức hướng đích; thụ thể; phân tử truyền tín hiệu; yếu tố phiên mã; protein hoặc peptit có hoạt tính dược; các ứng viên đích thuốc; và protein thúc đẩy sự cấy, sự lưu thông, sự về nhà, khả năng sống, sự tự tái sinh, sự tồn tại lâu dài, và/hoặc sự sống sót của chúng được tích hợp với cấu trúc.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng được thiết kế hệ gen, trong đó tế bào cho vạn năng bao gồm ít nhất một sự cải biến hệ gen được hướng đích tại một hoặc nhiều vị trí được chọn trong hệ gen, phương pháp này bao gồm bước thiết kế di truyền loại tế bào như mô tả ở đây bằng cách đưa vào trong tế bào này một hoặc nhiều cấu trúc để cho phép sự cải biến được hướng đích tại vị trí được chọn; đưa vào trong tế bào này một hoặc nhiều chỗ đứt sợi kép tại vị trí được chọn bằng

cách sử dụng một hoặc nhiều endonucleaza có khả năng nhận diện vị trí được chọn; và nuôi cấy tế bào đã chỉnh sửa để cho phép sửa chữa ADN nội sinh để tạo ra sự cài xen hoặc sự làm khuyết được hướng đích tại vị trí được chọn; nhờ đó thu lấy tế bào cho vượn năng được cải biến hệ gen. Các tế bào cho vượn năng được cải biến bộ gen có thể trải qua các vòng cải biến bộ gen liên tiếp khiến cho nhiều vị trí được hướng đích và được cải biến. Các tế bào được cải biến bộ gen được nuôi cấy, được phân tích đặc điểm, được chọn lọc, và được nhân rộng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Tế bào cho vượn năng được tạo ra bằng phương pháp này bao gồm ít nhất một sự cải biến hệ gen được hướng đích có chức năng, và trong đó tế bào được cải biến hệ gen, nếu chúng là tế bào gốc, thì có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân hoặc tế bào được biệt hóa hoàn toàn.

Theo một số phương án khác, tế bào cho vượn năng được thiết kế hệ gen bao gồm sự biểu hiện được đưa vào hoặc được tăng lên ở ít nhất một trong số HLA-E, HLA-G, CD47, hoặc PD-L1. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng được thiết kế hệ gen thiếu hụt HLA lớp I và/hoặc lớp II. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng được thiết kế hệ gen không có B2M hoặc có B2M thấp. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng được thiết kế hệ gen bao gồm polynucleotit ngoại sinh được tích hợp hoặc không được tích hợp mã hóa một hoặc nhiều protein trong số các protein HLA-E, HLA-G, và PD-L1. Theo một số phương án, sự biểu hiện được đưa vào này là sự biểu hiện tăng từ gen không được biểu hiện hoặc được biểu hiện ở mức độ thấp chứa trong tế bào này. Theo một số phương án, polynucleotit ngoại sinh không được tích hợp được đưa vào bằng cách sử dụng virus Sendai, AAV, episom, hoặc plasmid. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng không chứa B2M, với sự biểu hiện được đưa vào của một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G, PD-L1, và sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của ít nhất một protein công tắc an toàn. Theo phương án khác, tế bào cho vượn năng không chứa HLA-A, HLA-B, và HLA-C, với sự biểu hiện được đưa vào của một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G, PD-L1, và ít nhất một protein công tắc an toàn. Theo một số phương án, tế bào cho vượn năng không chứa B2M, với sự biểu hiện được đưa vào của một hoặc nhiều trong số HLA-E, HLA-G PD-L1, và sự biểu hiện tăng lên hoặc giảm đi của ít nhất một yếu tố sống sót, *ví dụ*, MANF. Phương pháp tạo ra tế bào được cải biến di truyền bất kỳ được mô tả ở đây được dự tính là được thực hiện bằng cách sử dụng ít nhất phương pháp chỉnh sửa gen bất kỳ được mô tả ở đây.

IV. Loại tế bào

Tế bào như mô tả ở đây, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể thuộc về lớp có thể có bất kỳ của loại tế bào. Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào người. Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào gốc. Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào gốc đa năng (PSC). Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào gốc phôi (ESC), tế bào gốc cá thể trưởng thành (ASC), tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC), hoặc tế bào gốc hoặc tế bào tiền thân tạo huyết (HSPC) (còn được gọi là tế bào gốc tạo huyết (HSC)). Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào được biệt hóa. Theo một số phương án, tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng (và tế bào không được cải biến tương ứng) có thể là tế bào soma, *ví dụ*, tế bào hệ miễn dịch hoặc tế bào cơ bắp, *ví dụ*, tế bào cơ xương khớp.

Tế bào, *ví dụ*, tế bào cho vạn năng gốc, được mô tả ở đây có thể được biệt hóa thành loại tế bào liên quan để đánh giá sự biểu hiện HLA, cũng như là sự đánh giá của khả năng gây miễn dịch của dòng tế bào gốc vạn năng. Nhìn chung, sự biệt hóa bao gồm việc duy trì tế bào được quan tâm trong một khoảng thời gian và trong điều kiện đủ để tế bào biệt hóa thành tế bào biệt hóa được quan tâm. Ví dụ, tế bào gốc vạn năng được bộc lộ ở đây có thể được biệt hóa thành tế bào tiền thân trung mô (MPC), tế bào cơ tim giảm sinh miễn dịch, tế bào tiền thân cơ, các nguyên bào, tế bào nội mô (EC), đại thực bào, tế bào gan, tế bào beta (*ví dụ*, tế bào beta tụy), các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh (NPC). Theo một số phương án, tế bào cho vạn năng có thể được biệt hóa thành tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, tế bào nội bì tụy (PEC), tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, hoặc tế bào beta đang trưởng thành.

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

"Tế bào được biệt hóa" là tế bào mà đã tiến triển thêm nữa xuống dưới con đường phát triển hơn là tế bào mà nó được so sánh với. Do đó, tế bào gốc có thể biệt hóa thành tế bào tiền thân giới hạn dòng (như tế bào tiền thân tế bào cơ), mà đến lượt nó có thể biệt hóa thành các dạng khác của tế bào tiền thân xuống dưới hơn nữa trong con đường này (như tiền thân tế bào cơ), và sau đó thành tế bào được biệt hóa giai đoạn cuối, như tế bào cơ, mà có vai trò riêng biệt trong loại mô nhất định, và có thể giữ lại hoặc không giữ lại khả năng để tăng sinh thêm. Theo một số phương án, tế bào được biệt hóa này có thể là tế bào beta tụy.

Tế bào gốc phôi

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

Tế bào gốc cá thể trưởng thành

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

Tế bào gốc đa năng được cảm ứng

Tế bào được mô tả ở đây có thể là tế bào gốc đa năng được cảm ứng (iPSC). iPSC có thể được sinh ra trực tiếp từ tế bào người trưởng thành bằng cách đưa các gen mà mã hóa các yếu tố phiên mã quan trọng có liên quan đến sự đa năng, *ví dụ*, OCT4, SOX2, cMYC, và KLF4. iPSC có thể có nguồn gốc từ cùng một đối tượng mà tế bào tiền thân tiếp theo được dùng cho nó. Tức là, tế bào soma có thể được thu lấy từ đối tượng, được lập trình lại thành tế bào gốc đa năng được cảm ứng, và sau đó được biệt hóa lại thành tế bào tiền thân để được dùng cho đối tượng (*ví dụ*, tế bào tự thân). Tuy nhiên, trong trường hợp của tế bào tự thân, nguy cơ của đáp ứng miễn dịch và khả năng sống kém sau khi cấy vẫn còn.

Tế bào gốc và tổ tiên tạo máu người

Tế bào được mô tả ở đây có thể là tế bào gốc và tổ tiên tạo máu người (hHSPC). Dòng tế bào gốc này mang lại sự tăng lên cho tất cả các loại tế bào máu, bao gồm dạng hồng cầu (hồng cầu hoặc tế bào máu đỏ (RBC)), dạng tủy (bạch cầu đơn nhân và đại thực bào, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu ưa axit, tế bào nhân khổng lồ/tiểu cầu, và tế bào đuôi gai), và dạng bạch huyết (tế bào T, tế bào B, tế bào NK). Tế

bào máu được sản xuất bằng sự tăng sinh và sự biệt hóa của quần thể rất nhỏ của tế bào gốc tạo máu đa năng (HSC) mà cũng có khả năng bổ sung thêm bản thân chúng bằng cách sự tự tái sinh. Trong quá trình biệt hóa, thế hệ con cháu của HSC phát triển qua các giai đoạn trưởng thành trung gian khác nhau, tạo ra đa năng và tế bào tiền thân được ước định bởi dòng trước khi đạt đến sự trưởng thành. Tủy xương (BM) là vị trí chính của sự tạo máu ở người và, trong điều kiện bình thường, chỉ số lượng nhỏ của tế bào gốc và tổ tiên tạo máu (HSPC) có thể được tìm thấy trong máu ngoại vi (PB). Việc điều trị bằng xytokin, một số thuốc kìm hãm tủy xương dùng trong điều trị ung thư, và các hợp chất mà phá vỡ sự tương tác giữa tế bào soma tạo máu và BM có thể huy động nhanh chóng số lượng lớn của tế bào gốc và tổ tiên vào hệ tuần hoàn.

Sự biệt hóa của tế bào thành các loại tế bào khác

Một bước khác của phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm việc biệt hóa tế bào thành tế bào biệt hóa. Bước biệt hóa có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, iPSC người được biệt hóa thành nội bì chính thức bằng cách sử dụng các cách điều trị khác nhau, bao gồm chất bổ sung activin và B27 (Life Technologies). Nội bì chính thức được biệt hóa tiếp thành tế bào gan, việc điều trị bao gồm: FGF4, HGF, BMP2, BMP4, Oncostatin M, Dexametason, v.v. (Duan et al, Stem Cells, 2010;28:674-686; Ma et al, Stem Cells Translational Medicine, 2013;2:409-419). Theo phương án khác, bước biệt hóa có thể được thực hiện theo Sawitza *et al*, Sci Rep. 2015; 5:13320. Tế bào biệt hóa có thể là tế bào soma bất kỳ của động vật có vú, *ví dụ*, người. Theo một số phương án, tế bào soma có thể là tế bào biểu mô tiết ngoại tiết (*ví dụ*, tế bào nhày tuyến nước bọt, tế bào tuyến tiền liệt), tế bào tiết hormon (*ví dụ*, tế bào thùy trước tuyến yên, tế bào đường ruột, đảo tụy), tế bào biểu mô tạo thành keratin (*ví dụ*, tế bào keratin biểu bì), tế bào biểu mô rào chắn phân tầng ướt, tế bào tải nạp giác quan (*ví dụ*, cơ quan thụ cảm), tế bào thần kinh tự trị, tế bào nâng đỡ tế bào ngoại biên và giác quan (*ví dụ*, tế bào Schwann), tế bào thần kinh hệ thần kinh trung ương, tế bào thần kinh đệm (*ví dụ*, tế bào dạng sao, tế bào thần kinh đệm ít gai), tế bào thấu kính, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào chức năng rào chắn (*ví dụ*, tế bào ống), tế bào chất nền ngoại bào, tế bào co bóp (*ví dụ*, tế bào cơ xương khớp, tế bào cơ tim, tế bào cơ trơn), tế bào máu (*ví dụ*, hồng cầu), tế bào hệ miễn dịch (*ví dụ*, tế bào nhân khổng lồ, tế bào vi thần kinh đệm, bạch cầu trung tính, dưỡng bào, tế bào T, tế bào B, tế bào sát thủ tự nhiên), tế bào mầm (*ví dụ*, tiền tinh trùng), tế bào nuôi, hoặc tế bào kẽ.

Nhìn chung, quần thể tế bào cho vận năng được bộc lộ ở đây vẫn duy trì sự biểu hiện một hoặc nhiều trình tự nucleotit được chèn vào theo thời gian. Ví dụ, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc ít nhất khoảng 99% số tế bào cho vận năng biểu hiện một hoặc nhiều yếu tố sinh dung nạp miễn dịch. Hơn nữa, quần thể tế bào được biệt hóa bị giới hạn dòng hoặc đầy đủ thu được từ các tế bào cho vận năng được bộc lộ ở đây vẫn duy trì sự biểu hiện của một hoặc nhiều trình tự nucleotit được chèn vào theo thời gian. Ví dụ, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 55%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 65%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 75%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 85%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc ít nhất khoảng 99% số tế bào được biệt hóa bị giới hạn dòng hoặc đầy đủ biểu hiện một hoặc nhiều yếu tố sinh dung nạp miễn dịch.

V. Chế phẩm phối chế và Cách dùng

Chế phẩm phối chế và phân phối để chỉnh sửa gen

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

ARN dẫn và/hoặc polynucleotit có thể được tạo chế phẩm với tá dược được dụng như chất mang, dung môi, chất làm ổn định, chất bổ trợ, chất pha loãng, v.v., tùy thuộc vào phương thức dùng và dạng liều lượng cụ thể. Hợp phần ARN dẫn và/hoặc polynucleotit có thể được tạo chế phẩm để đạt được độ pH tương thích sinh lý, và nằm trong khoảng từ độ pH bằng khoảng 3 đến độ pH bằng khoảng 11, từ khoảng pH 3 đến khoảng pH 7, tùy thuộc vào chế phẩm và đường dùng. Trong một số trường hợp, độ pH có thể được điều chỉnh đến khoảng từ khoảng độ pH 5,0 đến khoảng độ pH 8. Trong một số trường hợp, chế phẩm có thể bao gồm lượng hữu hiệu để điều trị của ít nhất một hợp chất như được mô tả ở đây, cùng với một hoặc nhiều tá dược được dụng. Một cách tùy ý, chế phẩm có thể bao gồm dạng kết hợp của hợp chất được mô tả ở đây, hoặc có thể bao gồm thành phần hoạt tính thứ hai hữu dụng trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa

sự phát triển của vi khuẩn (ví dụ và nhưng không giới hạn ở, chất kháng khuẩn hoặc chất kháng vi sinh vật), hoặc có thể bao gồm dạng kết hợp của các chất phản ứng theo sáng chế.

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

Polynucleotit ARN dẫn (ARN hoặc ADN) và/hoặc (các) polynucleotit endonucleaza (ARN hoặc ADN) có thể được phân phối bởi các tá được lỏng phân phối bằng virus hoặc không phải virus đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Theo cách khác, (các) polypeptit endonucleaza có thể được phân phối bằng vật mang phân phối virus hoặc không virus đã biết trong lĩnh vực, như xung điện hoặc hạt nano lipid. Theo các khía cạnh khác nữa, ADN endonucleaza có thể được phân phối dưới dạng một hoặc nhiều polypeptit, một mình hoặc được tạo phức hợp từ trước với một hoặc nhiều ARN dẫn, hoặc một hoặc nhiều crARN cùng với tracrARN.

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

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

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

LNP dùng để chỉ hạt bất kỳ có đường kính nhỏ hơn 1000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm, hoặc 25 nm. Theo cách khác, hạt nano có thể có kích thước nằm trong khoảng từ 1-1000 nm, 1-500 nm, 1-250 nm, 25-200 nm, 25-100 nm, 35-75 nm, hoặc 25-60 nm.

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

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

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

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

Vector virus kết hợp adeno (AAV) tái tổ hợp có thể được dùng để phân phối. Kỹ thuật để sản xuất hạt rAAV, trong đó hệ gen AAV cần được đóng gói mà bao gồm polynucleotit để được phân phối, các gen rep và cap, và các chức năng virus trợ giúp được cung cấp cho tế bào là tiêu chuẩn trong lĩnh vực. Sự sản xuất của rAAV thường đòi hỏi các thành phần sau đây có mặt trong tế bào đơn lẻ (được chỉ ra ở đây dưới dạng tế bào đóng gói): hệ gen rAAV, các gen rep và cap AAV riêng rẽ khỏi (*tức là*, không ở trong) hệ gen rAAV, và các chức năng virus trợ giúp. Các gen rep và cap AAV có thể là từ typ huyết thanh AAV bất kỳ đối với virus tái tổ hợp có thể được tạo ra, và có thể là từ typ huyết thanh AAV khác với ITR hệ gen rAAV, bao gồm, nhưng không giới hạn ở,

các typ huyết thanh AAV được mô tả ở đây. Sự sản xuất của rAAV kiểu giả được bộc lộ trong, ví dụ, công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 01/83692.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Theo một số phương án, chế phẩm chứa tế bào có thể được dùng cho đối tượng, ví dụ, đối tượng là người, mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh. Theo một số phương án, chế phẩm có thể được dùng cho đối tượng mà không mắc, không bị nghi ngờ mắc hoặc không có nguy cơ mắc bệnh. Theo một số phương án, đối tượng là người khỏe mạnh. Theo một số phương án, đối tượng ví dụ, đối tượng người, mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh di truyền. Theo một số phương án, đối tượng đang có hoặc có nguy cơ phát triển triệu chứng chỉ thị bệnh. Theo một số phương án, bệnh này là bệnh tiểu đường, ví dụ, bệnh tiểu đường typ I hoặc bệnh tiểu đường typ II.

VI. Chế phẩm và phương pháp cụ thể theo sáng chế

Theo đó, sáng chế đề cập cụ thể đến các chế phẩm và phương pháp không làm giới hạn sáng chế sau đây.

Trong chế phẩm thứ nhất, Chế phẩm 1, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa tế bào cho vận năng bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa yếu tố sống sót, trong đó tế bào cho vận năng này biểu hiện yếu tố sinh dung nạp miễn dịch và có sự biểu hiện bị đứt đoạn của yếu tố sống sót, và tế bào cho vận năng này có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào đối chứng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 2, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 1, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa trình tự nucleotit được chèn vào.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 3, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 1 hoặc 2, trong đó sự biểu hiện bị đứt đoạn của yếu tố sống sót bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 4, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 3, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 5, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 4, trong đó yếu tố sống sót là TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 6, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 5, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là HLA-E và yếu tố sống sót là TXNIP.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 7, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 5 hoặc 6, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 8, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 7, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 9, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 8, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự khởi động,

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 10, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 9, trong đó trình tự khởi động này là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 11, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 10, còn bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, trong đó tế bào cho vận năng biểu hiện yếu tố sinh dung nạp miễn dịch và có sự biểu hiện bị đứt đoạn của kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 12, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 11, trong đó sự biểu hiện bị đứt đoạn của kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 13, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 11 hoặc 12, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai này là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 14, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 11 đến 13, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, hoặc RFXANK

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 15, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 11 đến 14, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là PD-L1 và kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là B2M.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 16, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 15, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 về cơ bản gồm SEQ ID NO: 11.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 17, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 11 đến 16, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 18, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 17, trong đó trình tự khởi động này là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 19, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 11 đến 18, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là HLA-E, yếu tố sống sót là TXNIP, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là PD-L1, và kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc hành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là B2M.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 20, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 19, trong đó tế bào này là tế bào gốc.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 21, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 20, trong đó tế bào gốc này là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 22, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 19, trong đó tế bào này là tế bào được biệt hóa hoặc tế bào soma.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 23, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 19, trong đó tế bào này có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 24, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 23, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, các nguyên bào, tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 25, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 23, trong đó tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào máu, tế bào cơ tim, hoặc tế bào hệ miễn dịch.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 26, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất trong theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 1 đến 25, trong đó chế phẩm này chứa nhiều tế bào cho vạn năng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 27, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 26, trong đó chế phẩm này chứa quần thể các tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn thu được từ nhiều tế bào cho vạn năng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 28, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 27, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, các nguyên bào, tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào máu, tế bào cơ tim, hoặc tế bào hệ miễn dịch.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 29, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 6 hoặc 19, trong đó chế phẩm này chứa nhiều tế bào cho vạn năng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 30, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 29, trong đó chế phẩm này chứa quần thể các tế bào tiền thân được

giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn thu được từ nhiều tế bào cho vụn năng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 31, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 30, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, hoặc tế bào beta đang trưởng thành, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 32, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 26 hoặc 29, trong đó ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai, hoặc yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất và thứ hai.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 33, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm 27, 28, 30, hoặc 31, trong đó ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai, hoặc yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất và thứ hai.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 34, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa nhiều tế bào của Chế phẩm 26 hoặc quần thể tế bào của Chế phẩm 27 hoặc 28.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 35, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 34 để sử dụng trong điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 36, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 35, trong đó đối tượng này bị mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 37, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 36, trong đó bệnh này là bệnh có khả năng di truyền.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 38, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa nhiều tế bào của Chế phẩm 29 hoặc quần thể tế bào của Chế phẩm 30 hoặc 31.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 39, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 38 để điều trị bệnh tiêu đường ở đối tượng cần điều trị.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 40, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 39, trong đó đối tượng này bị bệnh tiểu đường typ I hoặc bệnh tiểu đường typ II.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 41, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm từ 35 đến 40, trong đó đối tượng này là người.

Trong phương pháp thứ nhất, Phương pháp 1, sáng chế đề xuất phương pháp để thu được tế bào để sử dụng cho đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: (a) thu được hoặc đã thu được nhiều tế bào cho vượn năng theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm 26, 29, hoặc 32, và (b) duy trì nhiều tế bào cho vượn năng trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện đủ để tế bào biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 2, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị cho đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: (a) thu được hoặc đã thu được nhiều tế bào cho vượn năng theo chế phẩm bất kỳ trong số các Chế phẩm 26, 29, hoặc 32 sau sự biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn; và (b) sử dụng tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn cho đối tượng này.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 3, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất trong Phương pháp 2, trong đó bước sử dụng bao gồm cấy thiết bị chứa tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn vào trong đối tượng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 4, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 3, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tủy, các tổ tiên nội tiết tủy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, các nguyên bào, tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tủy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào máu, tế bào cơ tim, hoặc tế bào hệ miễn dịch.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 5, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 4, trong đó đối tượng này bị mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 6, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất trong Phương pháp 5, trong đó bệnh này là bệnh có thể di truyền.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 7, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 1 đến 6, trong đó đối tượng này là người.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 8, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh tiểu đường ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: (a) thu được hoặc đã thu được nhiều tế bào cho vận năng của Chế phẩm 29 hoặc 32 sau sự biệt hóa thành tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy; và (b) sử dụng tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy cho đối tượng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 9, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất trong Phương pháp 8, trong đó bước sử dụng bao gồm cấy thiết bị chứa tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy vào trong đối tượng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 10, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất trong Phương pháp 8 hoặc 9, trong đó đối tượng này bị bệnh tiểu đường typ I hoặc bệnh tiểu đường typ II.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 11, sáng chế đề xuất phương pháp như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 8 đến 10, trong đó đối tượng này là người.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 41, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa tế bào cho vận năng bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E) được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa protein tương tác thioredoxin (TXNIP), trong đó tế bào cho vận năng biểu hiện HLA-E và có sự biểu hiện

bị đứt đoạn của TXNIP, và tế bào cho vượn năng có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với đối chứng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 42, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa trình tự nucleotit được chèn vào.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 43, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó sự biểu hiện bị đứt đoạn của TXNIP bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 44, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 45, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 44, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 46, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được liên kết hoạt động với trình tự khởi động,

Trong chế phẩm khác, Hợp phần 47, sáng chế đề xuất chế phẩm, như đề xuất trong Hợp phần 41, trong đó trình tự khởi động ngoại sinh là trình tự khởi động CAG.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 48, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó tế bào này là tế bào gốc.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 49, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 48, trong đó tế bào gốc này là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 50, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó tế bào này là tế bào được biệt hóa hoặc tế bào soma.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 51, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 41, trong đó tế bào này có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 52, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 51, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, hoặc tế bào beta đang trưởng thành, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 53, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa nhiều tế bào cho vạn năng như được đề xuất ở Chế phẩm 41.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 54, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 53, trong đó ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 55, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 53, trong đó ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 56, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 53, trong đó ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 57, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa quần thể tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn thu được từ nhiều tế bào cho vạn năng của Chế phẩm 53.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 58, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 57, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, hoặc tế bào beta đang trưởng thành, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 59, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 58, trong đó ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 60, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 59, trong đó ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 61, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 59, trong đó ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 62, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa tế bào được cải biến di truyền có sự biểu hiện được đưa vào hoặc tăng của kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E) và sự biểu hiện bị đứt đoạn của protein tương tác thioredoxin (TXNIP), trong đó tế bào được cải biến di truyền này có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào chưa được cải biến.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 63, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 62, mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 64, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 62, trong đó sự biểu hiện bị đứt đoạn của TXNIP bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ

Trong phương pháp khác, Phương pháp 12, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh tiểu đường ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: thu được hoặc đã thu được nhiều tế bào cho vạ năng của Chế phẩm 53 sau sự biệt hóa thành tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy; và (b) sử dụng tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy cho đối tượng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 13, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 12, trong đó bước sử dụng bao gồm cấy thiết bị bao gồm tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy vào trong đối tượng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 14, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 12, trong đó đối tượng này bị bệnh tiểu đường typ I hoặc bệnh tiểu đường typ II.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 15, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 12, trong đó đối tượng này là người.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 65, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa tế bào cho vạ năng bao gồm (a) trình tự nucleotit mã hóa phối tử sự chết được lập trình 1 (PD-L1) được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa beta-2 microglobulin (B2M) và (b) trình tự

nucleotit mã hóa kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E) được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa protein tương tác thioredoxin (TXNIP), trong đó tế bào cho vận năng biểu hiện PD-L1 và HLA-E và có sự biểu hiện bị đứt đoạn của B2M và TXNIP, và tế bào cho vận năng có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào đối chứng.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 66, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa trình tự nucleotit được chèn vào.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 67, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó sự biểu hiện bị đứt đoạn của B2M bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của B2M và sự biểu hiện bị đứt đoạn của TXNIP bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của TXNIP.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 68, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 về cơ bản gồm SEQ ID NO: 11.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 69, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 70, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 69, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 71, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 được liên kết hoạt động với trình tự khởi động, và trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong chế phẩm khác, Hợp phần 72, sáng chế đề xuất chế phẩm, như đề xuất trong Hợp phần 71, trong đó trình tự khởi động ngoại sinh là trình tự khởi động CAG.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 73, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó tế bào này là tế bào gốc.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 74, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 73, trong đó tế bào gốc này là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 75, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó tế bào này là tế bào được biệt hóa hoặc tế bào soma.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 76, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 65, trong đó tế bào này có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 77, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 76, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, hoặc tế bào beta đang trưởng thành, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 78, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa nhiều tế bào cho vạ năng như được đề xuất ở Chế phẩm 65.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 79, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 78, trong đó ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện PD-L1 và/hoặc ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 80, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 78, trong đó ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện PD-L1 và/hoặc ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 81, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 78, trong đó ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện PD-L1 và/hoặc ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 82, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa quần thể tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn thu được từ nhiều tế bào cho vạ năng, như được đề xuất ở Chế phẩm 78.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 83, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 82, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, hoặc tế bào beta đang trưởng thành, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta tụy.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 84, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 83, trong đó ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện PD-L1 và/hoặc ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 85, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 83, trong đó ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện PD-L1 và/hoặc ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 86, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 83, trong đó ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện PD-L1 và/hoặc ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện HLA-E.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 87, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa tế bào được cải biến di truyền có sự biểu hiện được đưa vào hoặc được tăng của PD-L1 và HLA-E và sự biểu hiện bị đứt đoạn của B2M và TXNIP, trong đó tế bào được cải biến di truyền có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào chưa được cải biến.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 88, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 87, mà bao gồm trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa B2M, nhờ đó làm đứt đoạn gen B2M, và trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được chèn vào trong hoặc gần gen mã hóa TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 89, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất ở Chế phẩm 87, trong đó sự biểu hiện bị đứt đoạn của B2M và TXNIP bao gồm sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của B2M và TXNIP.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 16, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị bệnh tiểu đường ở đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: (a) thu được hoặc đã thu được nhiều tế bào cho vận năng của Chế phẩm 78 sau sự biệt hóa

thành tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy; và (b) sử dụng tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy cho đối tượng này.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 17, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 16, trong đó bước sử dụng bao gồm cấy thiết bị bao gồm tế bào nội bì tụy, tế bào nội tiết tụy, tế bào beta chưa trưởng thành, tế bào beta đang trưởng thành, hoặc tế bào beta tụy vào trong đối tượng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 18, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 16, trong đó đối tượng này bị bệnh tiểu đường typ I hoặc bệnh tiểu đường typ II.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 19, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 16, trong đó đối tượng này là người.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 20, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào: (a) nucleaza hướng vị trí thứ nhất hướng đích vị trí bên trong hoặc gần gen mà mã hóa yếu tố sống sót; và (b) axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất mà được gắn sườn bởi (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích của (a) và (ii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích của (a), trong đó nucleaza hướng vị trí thứ nhất này phân tách vị trí đích của (a) và axit nucleic thứ nhất của (b) được chèn vào ở vị trí mà chồng lấp một phần, chồng lấp hoàn toàn, hoặc được chứa bên trong, vị trí của (a), nhờ đó sinh ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng này có sự sống sót tế bào tăng so với tế bào trong đó axit nucleic của (b) không được chèn vào.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 21, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 20, trong đó yếu tố sống sót là TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 22, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 20 hoặc 21, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 23, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp từ 20 đến 22, trong đó yếu tố sống sót là TXNIP.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 24, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 23, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là HLA-E.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 25, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 24, trong đó nucleaza hướng vị trí thứ nhất là hệ thống CRISPR bao gồm CRISPR nucleaza và ARN dẫn (gARN).

Trong phương pháp khác, Phương pháp 26, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 25, trong đó CRISPR nucleaza là Cas9 nucleaza loại II hoặc Cpf1 nucleaza loại V, và CRISPR nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 27, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 26, trong đó gARN bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm các SEQ ID NO: 15-24.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 28, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 25 đến 27, trong đó trình tự nucleotit của (b)(i) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 25, và trình tự nucleotit của (b)(ii) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 32.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 29, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 28, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân phối đến tế bào: (c) nucleaza hướng vị trí thứ hai hướng đích vị trí bên trong hoặc gần gen mà mã hóa một hoặc nhiều loại trong số kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (d) axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai mà được gắn sườn bởi (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích của (c) và (iv) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích

của (c), trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai của (d) khác với yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất (b), trong đó nucleaza hướng vị trí thứ hai phân tách vị trí đích của (c) và axit nucleic thứ hai của (d) được chèn vào ở vị trí mà chồng lấp một phần, chồng lấp hoàn toàn, hoặc được chứa bên trong, vị trí của (c), trong đó tế bào cho vượn năng có sự lẫn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào mà axit nucleic thứ hai của (d) không được chèn vào trong đó.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 30, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 29, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, hoặc RFXANK.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 31, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 29 hoặc 30, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 32, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 29 đến 31, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là B2M.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 33, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 32, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là PD-L1.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 34, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 29 đến 33, trong đó nucleaza hướng vị trí thứ hai là hệ thống CRISPR bao gồm CRISPR nucleaza và gARN.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 35, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 34, trong đó CRISPR nucleaza là Cas9 nucleaza loại II hoặc Cpf1 nucleaza loại V, và CRISPR nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 36, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 34 hoặc 35, trong đó gARN bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm các SEQ ID NO: 1-3 hoặc 35-44.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 37, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 34 đến 36, trong đó trình tự nucleotit của (d)(iii) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 7, và trình tự nucleotit của (d)(iv) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 13.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 38, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 25 đến 28 hoặc 34 đến 37, trong đó CRISPR nucleaza và gARN có mặt ở tỉ lệ mol là 1:3.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 39, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 38, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự khởi động, và trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 40, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 39, trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động cơ định, cảm ứng được, đặc hiệu thời gian, mô, hoặc loại tế bào, tùy ý trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 41, sáng chế đề xuất phương pháp A để tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào: (a) nucleaza hướng vị trí thứ nhất hướng đích vị trí bên trong hoặc gần gen mà mã hóa yếu tố sống sót; (b) axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất mà được gắn sườn bởi (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích của (a) và (ii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích của (a), trong đó nucleaza hướng vị trí thứ nhất phân tách vị trí đích của (a) và, qua quy trình trình tự tương đồng, axit nucleic thứ nhất của (b) được sử dụng làm khuôn để chèn trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất vào trong vị trí mà chồng lấp một phần, chồng lấp hoàn toàn, hoặc được chứa bên trong, vị trí của (a), nhờ đó làm đứt đoạn gen của (a); (c) nucleaza hướng vị trí thứ hai hướng đích vị trí bên trong hoặc gần gen mà mã hóa một hoặc nhiều

loại trong số kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II; và (d) axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai mà được gắn sườn bởi (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích của (c) và (iv) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích của (c), trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch của (d) khác với yếu tố sinh dung nạp miễn dịch (b), trong đó nucleaza hướng vị trí thứ hai phân tách vị trí đích của (c) và, qua quy trình tái tổ hợp tương đồng, axit nucleic thứ hai của (d) được sử dụng làm khuôn để chèn trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai vào trong vị trí mà chồng lấp một phần, chồng lấp hoàn toàn, hoặc được chứa bên trong, vị trí của (c), nhờ đó làm đứt đoạn gen của (c), nhờ đó tạo ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng có sự sống sót tế bào tăng so với tế bào mà axit nucleic thứ nhất của (b) và axit nucleic thứ hai của (d) không được chèn vào trong đó.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 42, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 41, trong đó yếu tố sống sót là TXNIP, yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là HLA-E, kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là B2M, và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là PD-L1.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 43, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 42, trong đó tế bào này là thực vật động vật có vú, tùy ý trong đó tế bào này là tế bào người.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 44, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 43, trong đó tế bào này là tế bào gốc.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 45, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 43, trong đó tế bào này là tế bào gốc đa năng, tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 46, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 43, trong đó tế bào này là tế bào được biệt hóa, hoặc tế bào soma.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 47, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất theo phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 43, trong đó tế bào cho vụn năng có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 48, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 47, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tủy, các tổ tiên nội tiết tủy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, các nguyên bào, tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 49, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 47, trong đó tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết như tế bào beta tủy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào hệ miễn dịch.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 49A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 47, trong đó tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào cơ tim, hoặc tế bào hệ miễn dịch.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 90, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa nhiều tế bào cho vụn năng được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các Phương pháp 20 đến 49.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 91, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất bởi Chế phẩm 90, được duy trì trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện đủ để tế bào trải qua sự biệt hóa.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 92, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất bởi Chế phẩm 90 hoặc 91, để sử dụng trong điều trị cho đối tượng cần điều trị.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 93, sáng chế đề xuất chế phẩm, như được đề xuất bởi Chế phẩm 92, trong đó đối tượng này là người mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 50, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước dùng cho đối tượng nhiều tế bào cho vụn năng của Chế phẩm 90 hoặc 91.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 51, sáng chế đề xuất phương pháp để điều trị cho đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: (a) thu được hoặc

đã thu được nhiều tế bào cho vận năng của Chế phẩm 90 sau sự biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn; và (b) sử dụng tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn cho đối tượng này.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 52, sáng chế đề xuất phương pháp thu được tế bào để sử dụng cho đối tượng cần điều trị, phương pháp này bao gồm bước: (a) thu được hoặc đã thu được tế bào cho vận năng theo điểm 31; và (b) duy trì tế bào cho vận năng trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện đủ để tế bào biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 53, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 51 hoặc 52, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là các tổ tiên nội bì tụy, các tổ tiên nội tiết tụy, tế bào tiền thân trung mô, tế bào tiền thân cơ, các nguyên bào, tế bào tiền thân tạo huyết, hoặc các tế bào tiền thân thần kinh.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 54, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 51 hoặc 52, trong đó tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào tiết nội tiết như tế bào beta tụy, tế bào biểu mô, tế bào nội bì, đại thực bào, tế bào gan, tế bào tạo mỡ, tế bào thận, tế bào máu, hoặc tế bào hệ miễn dịch.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 54A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất trong Phương pháp 51 hoặc 52, trong đó tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào cơ tim.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 55, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 50 đến 54, trong đó đối tượng này là người mà mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ bị bệnh.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 56, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 55, trong đó bệnh này là bệnh có khả năng di truyền.

Trong chế phẩm khác, Chế phẩm 93, sáng chế đề xuất ARN dẫn bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm SEQ ID NO: 15-24.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 57, sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* để tạo ra tế bào cho vận năng, phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc: (a) nucleaza được dẫn bởi ARN; (b) ARN dẫn (gARN) hướng đích vị trí đích

trong locut gen protein tương tác thioredoxin (TXNIP); và (c) vector bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm: (i) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch; (ii) trình tự nucleotit về cơ bản gồm SEQ ID NO: 25 và có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị ở bên trái và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích; và (iii) trình tự nucleotit về cơ bản gồm SEQ ID NO: 32 và có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị bên phải và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích, trong đó (i) được gắn sườn bởi (ii) và (iii); trong đó locut gen TXNIP được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic được chèn vào trong locut gen TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP và tạo ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng có sự lẫn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào đối chứng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 57A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó axit nucleic được chèn vào locut gen TXNIP bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 58, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa axit nucleic được chèn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 59, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó gen TXNIP bị đứt đoạn có sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của TXNIP.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 60, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó gARN bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 15-24.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 61, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó gARN bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 20.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 62, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó vector này là vector plasmit.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 63, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E).

Trong phương pháp khác, Phương pháp 64, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 63, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 65, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 63, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 66, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 65, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 67, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 66, trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 68, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN là Cas9 nucleaza.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 69, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 68, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 70, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 69, trong đó Cas9 nucleaza và gARN có mặt ở tỉ lệ là 1:3.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 71, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 72, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 57, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc của người.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 73, sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* để tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế

bào gốc: (a) nucleaza được dẫn bởi ARN; (b) ARN dẫn (gARN) hướng đích vị trí đích ở locut gen protein tương tác thioredoxin (TXNIP), và (c) vector bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm: (i) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch; (ii) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị ở bên trái và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích; và (iii) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị bên phải và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích, trong đó (i) được gắn sườn bởi (ii) và (iii), và vector này bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 34 hoặc 56; trong đó locut gen TXNIP được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic được chèn vào trong locut gen TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP và tạo ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào đối chứng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 73A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó axit nucleic được chèn vào locut gen TXNIP bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 74, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa axit nucleic được chèn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 75, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó gen TXNIP bị đứt đoạn có sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của TXNIP.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 76, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó gARN bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 15-24.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 77, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó gARN bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 20.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 78, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó vector này là vector plasmit.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 79, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch là kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E).

Trong phương pháp khác, Phương pháp 80, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN là Cas9 nucleaza.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 81, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 80, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 82, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 80, trong đó Cas9 nucleaza và gARN có mặt ở tỉ lệ là 1:3.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 83, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 84, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 73, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc của người.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 85, sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* để tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc: (a) phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ nhất bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN và ARN dẫn (gARN) hướng đích vị trí đích ở locut gen beta-2 microglobulin (B2M); (b) vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm: (i) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất; (ii) trình tự nucleotit về cơ bản gồm SEQ ID NO: 7 và có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị ở bên trái và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen B2M; và (iii) trình tự nucleotit về cơ bản gồm SEQ ID NO: 13 và có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị bên phải và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen B2M, trong đó (i) được gắn sườn bởi (ii) và (iii); trong đó locut gen B2M này được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được chèn vào trong locut gen B2M, nhờ đó làm đứt đoạn gen B2M; (c) phức hợp RNP thứ hai bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN và gARN hướng đích vị

trí đích ở locut gen protein tương tác thioredoxin (TXNIP); và (d) vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm: (i) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai; (ii) trình tự nucleotit về cơ bản gồm SEQ ID NO: 25 và có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị ở bên trái và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen TXNIP; và (iii) trình tự nucleotit về cơ bản gồm SEQ ID NO: 32 và có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị bên phải và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen TXNIP, trong đó (i) được gắn sườn bởi (ii) và (iii); trong đó locut gen TXNIP được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được chèn vào trong locut gen TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP và tạo ra tế bào cho vạn năng, trong đó tế bào cho vạn năng có sự lẫn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào đối chứng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 85A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó axit nucleic ở (b) được chèn vào trong locut gen B2M bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích và/hoặc trong đó axit nucleic ở (d) được chèn vào trong locut gen TXNIP bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 86, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa axit nucleic được chèn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 87, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, gen B2M bị đứt đoạn có sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của B2M, và gen TXNIP bị đứt đoạn có sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của TXNIP.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 88, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó gARN của phức hợp RNP thứ nhất bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 1-3 hoặc 35-44, và gARN của phức hợp RNP thứ hai bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 15-24.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 89, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó gARN của phức hợp RNP thứ nhất bao gồm

trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 2, và gARN của phức hợp RNP thứ hai bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 20.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 90, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó vectơ thứ nhất là vectơ plasmit, và vectơ thứ hai là vectơ plasmit.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 91, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là phối tử sự chết được lập trình 1 (PD-L1), và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E).

Trong phương pháp khác, Phương pháp 92, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 91, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 về cơ bản gồm SEQ ID NO: 11.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 93, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 91, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó, và trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 94, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự khởi động, và trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 95, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 94, trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 96, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó mỗi loại trong số phức hợp RNP thứ nhất và phức hợp RNP thứ hai bao gồm tỉ lệ mol của nucleaza được dẫn bởi ARN với gARN là 1:3.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 97, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN của mỗi loại trong số phức hợp RNP thứ nhất và phức hợp RNP thứ hai là Cas9 nucleaza.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 98, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 97, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 99, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 100, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 85, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc của người.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 101, sáng chế đề xuất phương pháp *in vitro* để tạo ra tế bào cho vạn năng, phương pháp này bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc: (a) phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ nhất bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN và ARN dẫn (gARN) hướng đích vị trí đích ở locut gen beta-2 microglobulin (B2M); (b) vector thứ nhất bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm: (i) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai; (ii) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị ở bên trái và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen B2M; và (iii) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị bên phải và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen B2M, trong đó (i) được gắn sườn bởi (ii) và (iii) và vector thứ nhất bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 33; trong đó locut gen B2M được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được chèn vào trong locut gen B2M bên trong, nhờ đó làm đứt đoạn gen B2M; (c) phức hợp RNP thứ hai bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN và gARN hướng đích vị trí đích ở locut gen protein tương tác thioredoxin (TXNIP); và (d) vector thứ hai bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm: (i) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai; (ii) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị ở bên trái và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen TXNIP; và (iii) trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự với vùng hệ gen được định vị bên phải và bên trong 50 nucleobazơ của vị trí đích ở locut gen TXNIP, trong đó (i) được gắn sườn

bởi (ii) và (iii) và vector thứ hai này bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 34 hoặc 56 trong đó locut gen TXNIP được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được chèn vào trong locut gen TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP và tạo ra tế bào cho vạ năng, trong đó tế bào cho vạ năng có sự lẩn tránh miễn dịch và/hoặc sự sống sót tế bào tăng so với tế bào đối chứng.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 101A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó axit nucleic ở (b) được chèn vào trong locut gen B2M bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích và/hoặc trong đó axit nucleic ở (d) được chèn vào trong locut gen TXNIP bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 102, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó tế bào đối chứng là tế bào kiểu đại hoặc tế bào không chứa axit nucleic được chèn.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 103, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 10, trong đó gen B2M bị đứt đoạn có sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của B2M, và gen TXNIP bị đứt đoạn có sự biểu hiện giảm hoặc bị loại bỏ của TXNIP.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 104, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó gARN của phức hợp RNP thứ nhất bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 1-3 hoặc 35-44, và gARN của phức hợp RNP thứ hai bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 15-24.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 105, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó gARN của phức hợp RNP thứ nhất bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 2, và gARN của phức hợp RNP thứ hai bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự gồm SEQ ID NO: 20.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 106, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó vector thứ nhất là vector plasmit, và vector thứ hai là vector plasmit.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 107, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là phối tử sự chết được lập trình 1 (PD-L1), và yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E).

Trong phương pháp khác, Phương pháp 108, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó mỗi loại trong số phức hợp RNP thứ nhất và phức hợp RNP thứ hai bao gồm tỉ lệ mol của nucleaza được dẫn bởi ARN với gARN là 1:3.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 109, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN của mỗi loại trong số phức hợp RNP thứ nhất và phức hợp RNP thứ hai là Cas9 nucleaza.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 110, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 109, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 111, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc phôi, tế bào gốc cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.

Trong phương pháp khác, Phương pháp 112, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Phương pháp 101, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc của người.

Theo quy trình thứ nhất, Quy trình 1, sáng chế đề xuất quy trình để tạo ra tế bào cho vạ năng, quy trình này bao gồm bước: (a) cải biến tế bào gốc bằng việc chèn trình tự nucleotit mã hóa phối tử sự chết được lập trình 1 (PD-L1) vào bên trong hoặc gần gen mã hóa beta-2 microglobulin (B2M), nhờ đó tạo ra các tế bào dương tính PD-L1; (b) làm giàu cho các tế bào dương tính PD-L1; (c) cải biến các tế bào dương tính PD-L1 từ (b) bằng cách chèn trình tự nucleotit mã hóa kháng nguyên tương thích mô HLA lớp I, chuỗi alpha E (HLA-E) bên trong hoặc gần gen mã hóa protein tương tác thioredoxin (TXNIP), nhờ đó tạo ra tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E; (d) làm giàu cho tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E; (e) phân loại tế bào đơn để chọn lọc đối với tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E; (f) phân tích đặc điểm tế bào từ (e) là tế bào cho vạ năng; và (g) làm đông lạnh tế bào cho vạ năng cho sự bảo quản dài hạn.

Trong quy trình khác, Quy trình 2, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó việc cải biến ở (a) bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc (1) phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ nhất bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN và ARN dẫn (gARN) hướng đích vị trí đích ở locut gen B2M và (2) vector thứ nhất bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích ở locut gen B2M, (ii) trình tự nucleotit mã hóa PD-L1, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích ở locut gen B2M, trong đó locut gen B2M này được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 được chèn vào trong locut gen B2M, nhờ đó làm đứt đoạn gen B2M.

Trong quy trình khác, Quy trình 2A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Quy trình 2, trong đó axit nucleic được chèn vào trong locut gen B2M bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong quy trình khác, Quy trình 3, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN của phức hợp RNP thứ nhất là Cas9 nucleaza và gARN của phức hợp RNP thứ nhất bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm SEQ ID NO: 2.

Trong quy trình khác, Quy trình 4, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 3, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong quy trình khác, Quy trình 5, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó RNP thứ nhất bao gồm tỉ lệ mol của gARN:nucleaza được dẫn bởi ARN là 3:1.

Trong quy trình khác, Quy trình 6, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó trình tự nucleotit của (a)(2)(i) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 7, và trình tự nucleotit của (a)(2)(iii) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 13.

Trong quy trình khác, Quy trình 7, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 về cơ bản gồm SEQ ID NO: 11.

Trong quy trình khác, Quy trình 8, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 được liên kết hoạt động với trình tự khởi động CAG.

Trong quy trình khác, Quy trình 9, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó vectơ thứ nhất là vectơ plasmid và bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 33.

Trong quy trình khác, Quy trình 10, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 2, trong đó việc phân phối của (a)(1) và (a)(2) bao gồm sự xung điện.

Trong quy trình khác, Quy trình 11, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó việc làm giàu đối với tế bào dương tính PD-L1 ở (b) bao gồm phân loại tế bào được hỗ trợ bởi từ tính (MACS), tách dòng tế bào đơn, nhân rộng tế bào dương tính PD-L1 này, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 12, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó việc cải biến ở (c) bao gồm bước phân phối đến tế bào dương tính PD-L1 (1) phức hợp RNP thứ hai bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN và gARN hướng đích vị trí đích ở locus gen TXNIP và (2) vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic, axit nucleic này bao gồm (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích ở locus gen TXNIP, (ii) trình tự nucleotit mã hóa HLA-E, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích ở locus gen TXNIP, trong đó locus gen TXNIP được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được chèn vào trong locus gen TXNIP, nhờ đó làm đứt đoạn gen TXNIP.

Trong quy trình khác, Quy trình 12A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Quy trình 12, trong đó axit nucleic được chèn vào trong locus gen TXNIP bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong quy trình khác, Quy trình 13, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN của phức hợp RNP thứ hai là Cas9 nucleaza và gARN của phức hợp RNP thứ hai bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm SEQ ID NO: 20.

Trong quy trình khác, Quy trình 14, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 13, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong quy trình khác, Quy trình 15, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó RNP thứ hai bao gồm tỉ lệ mol của gARN:nucleaza được dẫn bởi ARN là 3:1.

Trong quy trình khác, Quy trình 16, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó trình tự nucleotit của (c)(2)(i) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 25, và trình tự nucleotit của (c)(2)(iii) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 32.

Trong quy trình khác, Quy trình 17, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.

Trong quy trình khác, Quy trình 18, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 17, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong quy trình khác, Quy trình 19, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được liên kết hoạt động với trình tự khởi động CAG.

Trong quy trình khác, Quy trình 20, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó vector thứ hai là vector plasmit và bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 34 hoặc 56.

Trong quy trình khác, Quy trình 21, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 12, trong đó việc phân phối của (c)(1) và (c)(2) bao gồm sự xung điện.

Trong quy trình khác, Quy trình 22, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình điểm 1, trong đó việc làm giàu đối với tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E ở (d) bao gồm phân loại tế bào được hỗ trợ bởi từ tính, tách dòng tế bào đơn, nhân rộng tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E đã nêu, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 23, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó phân loại tế bào đơn ở (e) bao gồm phân loại tế bào được kích hoạt bởi huỳnh quang (FACS), tách dòng tế bào đơn, nhân rộng tế bào đã được phân loại tế bào đơn này, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 24, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó việc phân tích đặc điểm ở (f) bao gồm phân tích ADN đối với sự tiếp hợp giao tử và/hoặc đặc tính indel.

Trong quy trình khác, Quy trình 25, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó việc phân tích đặc điểm ở (f) bao gồm phân tích tế bào đối với hình thái học, khả năng sống sót, tạo kiểu nhân, mức độ nội độc tố, các mức mycoplasma, phân tích trứng đích/ngoài đích, sự cài xen vectơ ngẫu nhiên, Cas9 dư, vectơ dư, tình trạng đa năng, khả năng biệt hóa, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 26, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước làm đông lạnh trước khi phân tích đặc điểm ở (f).

Trong quy trình khác, Quy trình 27, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 1, còn bao gồm ở (a) nhân rộng tế bào dương tính PD-L1 được tạo ra, ở (c) nhân rộng tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E được tạo ra, ở (e) nhân rộng tế bào dương tính kép PD-L1, HLA-E được chọn lọc, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 28, sáng chế đề xuất quy trình để tạo ra tế bào cho vượn năng, quy trình này bao gồm bước: (a) cải biến tế bào gốc bằng cách chèn trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất vào bên trong hoặc gần gen mã hóa kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, nhờ đó tạo ra tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất; (b) làm giàu đối với tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất; (c) cải biến tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất từ (b) bằng cách chèn trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai vào bên trong hoặc gần gen mã hóa yếu tố sống sót, nhờ đó tạo ra tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai; (d) làm giàu đối với tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai; (e) phân loại tế

bào đơn để chọn lọc đối với tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai; (f) phân tích đặc điểm tế bào từ (e) là tế bào cho vận năng; và (g) làm đông lạnh tế bào cho vận năng cho sự bảo quản dài hạn.

Trong quy trình khác, Quy trình 29, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 28, trong đó việc làm giàu cho tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất ở (b) bao gồm phân loại tế bào được hỗ trợ bởi từ tính (MACS), tách dòng tế bào đơn, nhân rộng tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 30, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 28 hoặc 29, trong đó việc làm giàu cho tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai ở (d) bao gồm phân loại tế bào được hỗ trợ bởi từ tính, tách dòng tế bào đơn, nhân rộng tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 31, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 30, còn bao gồm ở (a) nhân rộng tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được tạo ra, ở (c) nhân rộng tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được tạo ra, ở (e) nhân rộng tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất/dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được chọn lọc, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 32, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 31, trong đó việc cải biến ở (a) bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc (1) nucleaza được dẫn bởi ARN thứ nhất và ARN dẫn (gARN) thứ nhất hướng đích vị trí đích ở kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locus gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II và (2) vectơ thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất, axit nucleic thứ nhất bao gồm (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích ở kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locus gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-

II, (ii) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích ở kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được chèn vào trong kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, nhờ đó làm đứt đoạn kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II.

Trong quy trình khác, Quy trình 32A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Quy trình 32, trong đó axit nucleic được chèn vào trong kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong quy trình khác, Quy trình 33, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 32, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN thứ nhất và gARN thứ nhất tạo thành phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ nhất.

Trong quy trình khác, Quy trình 34, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 33, trong đó việc cải biến ở (a) bao gồm bước phân phối đến tế bào gốc (1) phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ nhất bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN thứ nhất và ARN dẫn (gARN) thứ nhất hướng đích vị trí đích ở kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II và (2) vector thứ nhất bao gồm axit nucleic thứ nhất, axit nucleic thứ nhất bao gồm (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích ở kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, (ii) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích ở kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II

hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic thứ nhất bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được chèn vào trong kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II, nhờ đó làm đứt đoạn kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II.

Trong quy trình khác, Quy trình 34A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Quy trình 34, trong đó axit nucleic được chèn vào trong kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của locut gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong quy trình khác, Quy trình 35, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 34, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP, hoặc RFXANK.

Trong quy trình khác, Quy trình 36, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 35, trong đó kháng nguyên tế bào bạch cầu người MHC-I hoặc MHC-II hoặc thành phần hoặc yếu tố điều hòa phiên mã của gen phức hợp MHC-I hoặc MHC-II là B2M.

Trong quy trình khác, Quy trình 37, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 36, trong đó trình tự nucleotit của (a)(2)(i) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 7, và trình tự nucleotit của (a)(2)(iii) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 13.

Trong quy trình khác, Quy trình 38, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 36 hoặc 37, trong đó gARN thứ nhất bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm SEQ ID NO: 2.

Trong quy trình khác, Quy trình 39, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 32 đến 38, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN thứ nhất là Cas9 nucleaza.

Trong quy trình khác, Quy trình 40 sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 39, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong quy trình khác, Quy trình 41, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 32 đến 40, trong đó RNP thứ nhất bao gồm tỉ lệ mol của gARN thứ nhất:nucleaza được dẫn bởi ARN thứ nhất là 3:1.

Trong quy trình khác, Quy trình 42, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 41, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

Trong quy trình khác, Quy trình 43, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 42, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong quy trình khác, Quy trình 44, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 43, trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong quy trình khác, Quy trình 45, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 44, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất là PD-L1.

Trong quy trình khác, Quy trình 46, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 45, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 về cơ bản gồm SEQ ID NO: 11.

Trong quy trình khác, Quy trình 47, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 46, trong đó trình tự nucleotit mã hóa PD-L1 được liên kết hoạt động với trình tự khởi động CAG.

Trong quy trình khác, Quy trình 48, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 45 đến 47, trong đó vector thứ nhất bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 33.

Trong quy trình khác, Quy trình 49, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 48, trong đó việc cải biến ở (c) bao

gồm bước phân phối đến tế bào gốc (1) nucleaza được dẫn bởi ARN thứ hai và ARN dẫn (gARN) thứ hai hướng đích vị trí đích ở locut gen yếu tố sống sót và (2) vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai, axit nucleic thứ hai bao gồm (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích ở locut gen yếu tố sống sót, (ii) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích ở locut gen yếu tố sống sót, trong đó locut gen yếu tố sống sót được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được chèn vào trong locut gen yếu tố sống sót, nhờ đó làm đứt đoạn gen yếu tố sống sót.

Trong quy trình khác, Quy trình 49A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Quy trình 49, trong đó axit nucleic được chèn vào trong locut gen yếu tố sống sót bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong quy trình khác, Quy trình 50, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 49, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN thứ hai và gARN thứ hai tạo thành phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ hai.

Trong quy trình khác, Quy trình 51, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 48, trong đó việc cải biến ở (c) bao gồm bước phân phối đến tế bào dương tính yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ nhất (1) phức hợp ribonucleoprotein (RNP) thứ hai bao gồm nucleaza được dẫn bởi ARN thứ hai và ARN dẫn (gARN) thứ hai hướng đích vị trí đích ở locut gen yếu tố sống sót và (2) vectơ thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai, axit nucleic thứ hai bao gồm (i) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên trái của vị trí đích ở locut gen yếu tố sống sót, (ii) trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai, và (iii) trình tự nucleotit tương đồng với vùng được định vị ở bên phải của vị trí đích ở locut gen yếu tố sống sót thứ hai, trong đó locut gen yếu tố sống sót được phân tách ở vị trí đích và axit nucleic thứ hai bao gồm trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được chèn vào trong locut gen yếu tố sống sót, nhờ đó làm đứt đoạn gen yếu tố sống sót.

Trong quy trình khác, Quy trình 51A, sáng chế đề xuất phương pháp, như được đề xuất bởi Quy trình 51, trong đó axit nucleic được chèn vào trong locut gen yếu tố sống sót bên trong 50 cặp bazơ của vị trí đích.

Trong quy trình khác, Quy trình 52, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 51, trong đó gen sống sót là TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK, hoặc MANF.

Trong quy trình khác, Quy trình 53, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 52, trong đó gen sống sót là TXNIP.

Trong quy trình khác, Quy trình 54, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 53, trong đó gARN thứ hai bao gồm trình tự vùng đệm tương ứng với trình tự đích gồm SEQ ID NO: 20.

Trong quy trình khác, Quy trình 55, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 52 hoặc 53, trong đó trình tự nucleotit của (c)(2)(i) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 25, và trình tự nucleotit của (c)(2)(iii) về cơ bản gồm SEQ ID NO: 32.

Trong quy trình khác, Quy trình 56, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 49 đến 55, trong đó nucleaza được dẫn bởi ARN thứ hai là Cas9 nucleaza.

Trong quy trình khác, Quy trình 57, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 56, trong đó Cas9 nucleaza được liên kết với ít nhất một tín hiệu định vị nhân.

Trong quy trình khác, Quy trình 58, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 49 đến 57, trong đó RNP thứ hai bao gồm tỉ lệ mol của gARN thứ hai:nucleaza được dẫn bởi ARN thứ hai là 3:1.

Trong quy trình khác, Quy trình 59, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 49 đến 58, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, hoặc CD47.

Trong quy trình khác, Quy trình 60, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 59, trong đó trình tự nucleotit mã hóa yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai được liên kết hoạt động với trình tự khởi động.

Trong quy trình khác, Quy trình 61, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 60, trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động CMV, EF1 α , PGK, CAG, hoặc UBC.

Trong quy trình khác, Quy trình 62, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 61, trong đó yếu tố sinh dung nạp miễn dịch thứ hai là HLA-E.

Trong quy trình khác, Quy trình 63, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 62, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E bao gồm trình tự mã hóa trime HLA-E bao gồm peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.

Trong quy trình khác, Quy trình 64, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 63, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.

Trong quy trình khác, Quy trình 65, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất trong Quy trình 63 hoặc 64, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được liên kết hoạt động với trình tự khởi động CAG.

Trong quy trình khác, Quy trình 66, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 62 đến 65, trong đó vector thứ hai bao gồm trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 34 hoặc 56.

Trong quy trình khác, Quy trình 67, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 66, trong đó phân loại tế bào đơn ở (e) bao gồm phân loại tế bào được kích hoạt bởi huỳnh quang (FACS), tách dòng tế bào đơn, nhân rộng tế bào được phân loại tế bào đơn này, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 68, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 67, trong đó việc phân tích đặc điểm ở (f) bao gồm sự phân tích ADN đối với tình trạng tiếp hợp giao tử và/hoặc đặc tính indel.

Trong quy trình khác, Quy trình 69, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 68, trong đó việc phân tích đặc điểm ở (f) bao gồm sự phân tích tế bào đối với hình thái học, khả năng sống được, tạo kiểu nhân, mức độ nội độc tố, các mức mycoplasma, phân tích trùng đích/ngoài đích, sự cài

xen vector ngẫu nhiên, Cas9 dư, vector dư, tình trạng đa năng, khả năng biệt hóa, hoặc sự kết hợp của chúng.

Trong quy trình khác, Quy trình 70, sáng chế đề xuất quy trình, như được đề xuất theo quy trình bất kỳ trong số các Quy trình 28 đến 69, trong đó quy trình này còn bao gồm bước làm đông lạnh trước khi phân tích đặc điểm ở (f).

VII. Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây mô tả việc tạo ra và phân tích đặc điểm của tế bào cho vận năng cụ thể theo sáng chế.

Ví dụ 1: Duy trì và nhân rộng tế bào

Duy trì hESC/hiPSC. Tế bào của dòng tế bào gốc phôi người CyT49 (dòng tế bào hES có sở hữu, ViaCyte, Inc., San Diego, CA) được duy trì, nuôi cấy, cấy chuyển, tăng sinh, và cấy giống như được mô tả trong Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004. Tế bào CyT49 được phân ly bằng cách sử dụng ACCUTASE® (Stemcell Technologies 07920 hoặc tương đương).

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

Tách dòng tế bào đơn lẻ của hPSC. Đối với việc tách dòng tế bào đơn, hPSC (hESC hoặc hiPSC) được cấy StemFlex Complete với Revitacell (nồng độ cuối là 1X Revitacell) 3-4 giờ trước khi phân ly bằng ACCUTASE®. Sau khi phân ly, tế bào được sắp xếp dưới dạng các tế bào đơn lẻ trong mỗi giếng của đĩa nuôi cấy mô 96 giếng được phủ BIOLAMININ. Máy phân loại WOLF FACS (Nanocollect) được sử dụng để sắp

xếp các tế bào đơn lẻ vào các giếng. Các đĩa này được nạp trước bằng 100-200 μ l StemFlex Complete với Revitacell. Ba ngày sau khi cấy tế bào, tế bào được cấp StemFlex mới và tiếp tục được cấp hai ngày một lần bằng 100-200 μ l môi trường. Sau khi sinh trưởng 10 ngày, tế bào được cho ăn hàng ngày bằng StemFlex đến ngày 12-14. Vào lúc này, các đĩa này được phân ly bằng ACCUTASE® và huyền phù tế bào đã được thu gom được chia ra 1:2 với một nửa cho vào đĩa 96 giếng mới để duy trì và một nửa cho vào dung dịch chiết ADN QuickExtract™ ADN Extraction Solution (Lucigen). Sau khi chiết ADN, PCR được thực hiện để đánh giá sự có mặt hoặc không có mặt của sự chỉnh sửa gen mong muốn tại locut ADN được hướng đích. Việc giải trình tự Sanger được sử dụng để xác nhận các chỉnh sửa mong muốn.

Sự mở rộng của các dòng hPSC có nguồn gốc từ tế bào đơn lẻ. Đối với CyT49 (ViaCyte), các dòng vô tính được hướng đích thành công được cấy chuyển lên trên các đĩa 24 giếng bằng môi trường 10% XF KSR A10H10 tinh khiết nhưng trên các đĩa được phủ BIOLAMININ. Sau giai đoạn 24 giếng, các dòng vô tính CyT49 được cấy chuyển như được mô tả trong Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

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

Ví dụ 2: Tạo ra tế bào gốc đa năng người bị bất hoạt (KO) B2M (hPSC)

Sự chọn lọc ARN dẫn (gARN) đối với B2M trong hPSC. Ba gARN hướng đích B2M được thiết kế để hướng đích exon 1 của trình tự mã hóa B2M. Các gARN này đã dự đoán các điểm ngoài đích thấp dựa vào sự dự đoán độ tương đồng trình tự sử dụng phần mềm thiết kế gARN. Trình tự đích của các gARN được trình bày trong Bảng 1. gARN bao gồm trình tự ARN tương ứng với trình tự ADN đích.

Bảng 1. Trình tự đích B2M gARN

Tên	Trình tự đích (5'-3')	SEQ ID NO:	PAM
-----	-----------------------	------------	-----

B2M-1 gARN (Exon 1_T12)	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC	1	TGG
B2M-2 gARN (Exon 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TGG
B2M-3 gARN (Exon 1_T8)	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CGG
Exon 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TGG
Exon 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AGG
Exon 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GGG
Exon 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CGG
Exon 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CGG
Exon 1_T7	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	40	AGG
Exon 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	41	TGG
Exon 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATTC	42	GGG
Exon 1_T11	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CGG
Exon 1_T13	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG	44	AGG

Để đánh giá hiệu quả cắt của chúng ở các hPSC, tế bào CyT49 (dòng tế bào hES có sở hữu của ViaCyte) được tạo xung điện sử dụng máy xung điện Neon (Hệ chuyển nạp Neon ThermoFisher Cat# MPK5000) với hỗn hợp ribonucleoprotein (RNP) của protein Cas9 (Biomay) và ARN dẫn (Synthego) (Xem Bảng 3 đối với các trình tự gARN) ở tỉ lệ mol là 3:1 (gARN:Cas9) với các giá trị tuyệt đối là 125 pmol Cas9 và 375 pmol gARN. Để tạo thành phức hợp RNP, gARN và Cas9 được kết hợp trong một lọ với đệm R (Kit hệ chuyển nạp Neon 100 μ L ThermoFisher Cat# MPK10096) đến tổng thể tích

25 μ L và được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào được phân ly bằng cách sử dụng ACCUTASE®, sau đó được tái tạo huyền phù trong môi trường DMEM/F12 (Gibco, cat#11320033), được đếm bằng cách sử dụng NC-200 (Chemometec) và được ly tâm. Tổng cộng 1×10^6 tế bào được tái tạo huyền phù với phức hợp RNP và chất đệm R được bổ sung đến tổng thể tích bằng 125 μ L. Sau đó, hỗn hợp này được tạo xung điện với 2 xung trong 30 mili giây ở 1100 V. Sau khi xung điện, các tế bào được hút bằng pipet ra vào trong ống Eppendorf được nạp môi trường StemFlex với RevitaCell. Sau đó huyền phù tế bào này được cấy vào trong đĩa nuôi cấy mô đã được phủ trước bằng BIOLAMININ 521 CTG ở độ pha loãng 1:20. Các tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) trong 48 giờ. Sau 48 giờ, ADN hệ gen được thu hoạch từ tế bào bằng cách sử dụng QuickExtract (Lucigen, Middleton, WI; Cat#QE09050).

PCR đối với trình tự B2M đích được thực hiện và ADN đã khuếch đại thu được được đánh giá về hiệu quả cắt bằng cách phân tích TIDE. PCR đối với các vùng liên quan được thực hiện bằng cách sử dụng Platinum Taq Supermix (Invitrogen, cat#125320176 và Cat# 11495017). Trình tự của các mồi PCR được trình bày trong Bảng 2; và các điều kiện lập chu kỳ được đưa ra trong Bảng 3.

Bảng 2. Các đoạn mồi B2M TIDE

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

Bảng 3. Các thông số lập chu kỳ B2M PCR

Bước	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
Sự biến tính	94°C	2 phút	1
Sự biến tính	94°C	15 giây	38

Gắn mồi	55°C	30 giây	
Duỗi	68°C	45 giây	
Kéo dài	68°C	5 phút	1
Giữ	4	giữ	

Các sản phẩm khuếch đại thu được được đưa đi làm sạch PCR và giải trình tự Sanger. Kết quả giải trình tự Sanger được nhập vào phần mềm Tsunami cùng với trình tự dẫn. Tỷ lệ phần trăm và sự xác định indel được tính bằng phần mềm. Sau đó gARN cụ thể được chọn dựa trên tần suất indel của chúng trong hPSC. Hình 1 thể hiện hiệu quả cắt của các gARN của B2M-1, B2M-2, và B2M-3.

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

Sự tạo ra và sự xác định đặc điểm dòng B2M KO hPSC. Sử dụng B2M-2 gARN, CyT49 hESC (ViaCyte) được tạo xung điện và được phân loại tế bào đơn 3 ngày sau khi xung điện sử dụng máy phân loại WOLF FACS (Nanocollect) vào trong các đĩa 96 giếng được phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex và Revitacell. Các tế bào đơn được cấy vào đĩa được nuôi trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) với sự thay đổi môi trường cách ngày tới khi khuẩn lạc đủ lớn để tái cấy giống là các tế bào đơn. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen.

Tình trạng B2M KO của dòng được xác định thông qua PCR và việc giải trình tự Sanger. Các trình tự ADN thu được của vùng B2M đích được căn trình tự trong phần mềm Snapgene để xác định độ tương đồng và tình trạng tiếp hợp giao tử. Dòng vô tính có sự chỉnh sửa mong muốn được mở rộng và được xác nhận thêm thông qua việc đánh giá đếm tế bào theo dòng đối với sự biểu hiện B2M (Xem Bảng 4 về danh sách của kháng thể được sử dụng). Các dòng vô tính được đánh giá có và không có sự điều trị bằng Interferon-gamma (25 ng/mL, R & D Systems, 285-IF). Hình 2A thể hiện sự biểu

hiện B2M ở tế bào kiểu đại và Hình 2B thể hiện sự biểu hiện B2M ở tế bào B2M KO. Tình trạng kiểu nhân của dòng được đánh giá thông qua dịch vụ Cell Line Genetics (Madison, WI) và kiểu nhân bình thường được báo cáo.

Bảng 4. Kháng thể để đếm tế bào theo dòng đa năng

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

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

Ví dụ 3: Sự tạo ra tế bào gốc đa năng B2M KO/đỉnh vào (KI) PD-L1 ở người (hPSC)

Thiết kế chiến lược B2M KO/PD-L1 KI. Thiết kế plasmit để chèn PD-L1 (CD274) vào locus B2M được tạo ra nhờ đó codon bắt đầu của B2M được loại bỏ sau khi trải qua sự sửa chữa định hướng tương đồng (HDR) để chèn PD-L1, thủ tiêu bất kỳ

cơ hội nào của sự biểu hiện B2M một phần. Hình 3 thể hiện sơ đồ của plasmit và Bảng 5 xác định các thành phần và vị trí ở trong đó. Plasmit cho chứa trình tự khởi động CAGGS điều khiển cADN của PD-L1 được gắn sườn bằng các nhánh tương đồng có 800 cặp bazơ với trình tự giống hệt với locut B2M xung quanh exon 1. Trình tự hoàn chỉnh của plasmit bao gồm SEQ ID NO: 33.

Bảng 5. Các thành phần của Plasmit cho B2M-CAGGS-PD-L1

Thành phần	Vị trí (kích thước theo bp)	SEQ ID NO:
ITR bên trái	1-130 (130)	6
LHA-B2M	145-944 (800)	7
trình tự tăng cường CMV	973-1352 (380)	8
trình tự khởi động β -actin gà	1355-1630 (276)	9
intron khảm	1631-2639 (1009)	10
PD-L1	2684-3556 (873)	11
tín hiệu bGH poly(A)	3574-3798 (225)	12
RHA-B2M	3805-4604 (800)	13
ITR bên phải	4646-4786 (141)	14
Plasmit nguyên vẹn	7133 bp	33

B2M-2 gARN được sử dụng để làm thuận lợi cho sự cài xen của gen chuyển PD-L1 tại locut B2M đích. Plasmit cho PD-L1 được đưa vào cùng với phức hợp RNP được tạo thành bởi gARN hướng đích B2M và protein Cas9. Mỗi 1 triệu tế bào CyT49 (ViaCyte), 4 μ g ADN plasmit được phân phối cùng với RNP. Sự xung điện được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2. Bảy ngày sau khi xung điện, tế bào được sắp xếp đối với sự biểu hiện PD-L1 bề mặt bằng cách sử dụng thiết bị sắp xếp WOLF FACS

(Nanocollect) vào đĩa 96 giếng được phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex với RevitaCell. Để sắp xếp bằng FACS, tế bào chưa được chỉnh sửa đóng vai trò làm đối chứng âm. Tế bào dương tính PD-L1 được chọn để sắp xếp và tách dòng tế bào đơn lẻ.

Để phát hiện sự biểu hiện PD-L1 bề mặt, kháng thể huỳnh quang kháng-PD-L1 được sử dụng (xem Bảng 4). Các tế bào đơn được cấy vào đĩa được nuôi trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) với sự thay đổi môi trường cách ngày tới khi khuẩn lạc đủ lớn để tái cấy giống là các tế bào đơn. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen.

Các dòng được hướng đích đúng được xác định thông qua PCR đối với sự cài xen đích vào (KI) PD-L1 bằng cách sử dụng các đoạn mồi mà khuếch đại vùng từ bên ngoài các nhánh tương đồng plasmit đến chỗ cài xen PD-L1 cADN giúp cho chỉ có thể khuếch đại ADN được tích hợp KI. Sự cài xen trúng đích được thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử bằng PCR để đánh giá KI đã xảy ra theo phương thức dị hợp tử hay đồng hợp tử. Nếu dòng vô tính dị hợp tử được xác định, alen âm KI được gửi để giải trình tự Sanger để xác định rằng nó chứa indel làm đứt đoạn B2M ở alen không KI. Các dòng KI đúng với sự đứt đoạn B2M hoàn toàn (thông qua sự cài xen KI hoặc sự tạo thành indel) được mở rộng trong định dạng nuôi cấy mô tăng dần đến khi đạt đến kích thước quần thể là 30 triệu tế bào. Xấp xỉ 10 dòng được mở rộng theo phương thức này và được xác nhận là đa năng bằng cách thử nghiệm đối với OCT4 và SOX2 thông qua việc đếm tế bào theo dòng nội bào (Hình 4). Sau đó các dòng mà đã vượt qua các thử nghiệm nêu trên, được thử nghiệm thêm để phân tích kiểu nhân (Cell Line Genetics), như được mô tả dưới đây. Ngoài ra, sau đó các dòng được thử nghiệm về thẩm quyền của chúng để biệt hóa thành tiền thân nội bì tụy (PEC) thông qua quy trình đã được thiết lập (Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004), như được mô tả dưới đây. Sự mất đi của B2M được xác nhận tiếp bởi việc thiếu sự biểu hiện của B2M có hoặc không có sự xử lý Interferon-gamma (25 ng/ml, R & D Systems, 285-IF) thông qua việc đếm tế bào theo dòng. Hình 5A và 5B thể hiện sự biểu hiện PD-L1 lần lượt trong tế bào kiểu đại và tế bào KO B2M/KI PD-L1.

Ví dụ 4: Phân tích kiểu nhân của dòng đã được chỉnh sửa

Phân tích xác định kiểu nhân bằng G của tế bào gốc phôi (ES) được chỉnh sửa. 1 triệu tế bào ES đã được biên tập được cấy chuyển vào bình thót cổ nuôi cấy T-25 với môi trường nuôi cấy (DMEM/F12+10% KSR không chứa Xeno với 10 ng/mL Activin và 10 ng/mL Heregulin). Sau khi nuôi cấy qua đêm, ba bình thót cổ nuôi cấy T25 được chuyển sang Cytogenetics Laboratory (Cell Line Genetics, Inc.) để phân tích xác định kiểu nhân; phân tích FISH đối với nhiễm sắc thể 1, 12, 17, 20; và phân tích lai hóa hệ gen so sánh mảng (aCGH) với mảng 8x60K tiêu chuẩn. Các kết quả lập băng G của các tế bào được chọn được tạo xung điện với các trình tự dẫn không cắt (“NCG”), các dòng vô tính B2M KO, và các dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI (“V1-A”) được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả xác định kiểu nhân bằng G

Dòng tế bào	Loại	Cấy chuyển	Phân tích kiểu nhân	Phân tích FISH	Phân tích mảng aCGH
NCG#1	đoạn dẫn không cắt	P36	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
NCG#2	đoạn dẫn không cắt	P36	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
B2M KO#1	B2M KO	P38	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
B2M KO#2	B2M KO	P36	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
B2M KO#3	B2M KO	P36	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
V1-A003	B2M KO/PD-L1 KI	P37	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA

V1-A004	B2M KO/PD-L1 KI	P38	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
V1-A007	B2M KO/PD-L1 KI	P37	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
V1-A008	B2M KO/PD-L1 KI	P38	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA

Ví dụ 5: Sự biệt hóa của tế bào gốc phôi người được chỉnh sửa thành tế bào nội bì tụy (PEC)

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

Sự kết tụ của tế bào gốc phôi người đã được chỉnh sửa để biệt hóa PEC. ES đã được biên tập được phân ly thành các tế bào đơn lẻ với ACCUTASE® và sau đó được ly tâm và được tái tạo huyền phù trong 2% StemPro (Cat#A1000701, Invitrogen, CA) trong môi trường DMEM/F12 ở 1 triệu tế bào trong mỗi ml, và tổng cộng 350-400 triệu tế bào được cấy trong một chai dạng con lăn 850 cm² (Cat#431198, Corning, NY) với tốc độ quay là 8 vòng/phút ±0,5 vòng/phút trong 18-20 giờ trước khi biệt hóa. Khối tụ ES từ các tế bào gốc phôi người được chỉnh sửa được biệt hóa thành các dòng tụy sử dụng các chai dạng con lăn được mô tả trong Schulz et al. (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

Ví dụ 6: Xác định đặc điểm của tế bào nội bì tụy đã biệt hóa (PEC)

Đếm tế bào theo dòng đối với FOXA2 và SOX17 ở Giai đoạn 1 (DE) và CHGA, PDX1 và NKX6.1 ở giai đoạn PEC. Khối tụ giai đoạn 1 thu được từ hESC, hoặc khối tụ tụy thu được hESC, được rửa bằng PBS và sau đó được phân hủy bằng enzym thành huyền phù tế bào đơn ở 37°C sử dụng ACCUMAX™ (Catalog# A7089,

Sigma, MO). Chất đệm tách MACS (Cat#130-091-221, Miltenyi Biotec, North Rhine-Westphalia, Đức) được bổ sung và huyền phù được cho đi qua bộ lọc 40 μ M và được tạo viên. Để nhuộm nội bào, tế bào được cố định trong 30 phút trong 4% (khối lượng/thể tích) paraformaldehyt, được rửa trong đệm FACS (PBS, 0,1% (khối lượng/thể tích) BSA, 0,1% (khối lượng/thể tích) NaN_3) và sau đó tế bào được thấm bằng đệm Perm (PBS, 0,2% (thể tích/thể tích) Triton X-100 (Cat#A16046, Alfa Aesar, MA), 5% (thể tích/thể tích) huyết thanh lừa bình thường, 0,1% (khối lượng/thể tích) NaN_3) trong 30 phút trên đá và sau đó được rửa bằng đệm rửa (PBS, 1% (khối lượng/thể tích) BSA, 0,1% (khối lượng/thể tích) NaN_3). Tế bào được ủ với kháng thể sơ cấp (Bảng 7) được pha loãng với Chất Đệm Phong Bể (PBS, Triton X-100 0,1% (thể tích/thể tích), huyết thanh lừa bình thường 5% (thể tích/thể tích), NaN_3 0,1% (khối lượng/thể tích)) qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Tế bào được rửa trong chất đệm IC và sau đó được ủ với kháng thể thứ cấp thích hợp trong thời gian 60 phút ở nhiệt độ 4°C. Tế bào được rửa trong chất đệm IC và sau đó trong chất đệm FACS. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được thu lấy bằng Máy Đếm Tế Bào Theo Dòng NovoCyte (ACEA Biosciences, Brussels). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo (Tree Star, Inc.). Tế bào nguyên vẹn được xác định dựa trên thiết bị tán sắc ánh sáng tiến (góc thấp) và bên (góc vuông, 90°). Mức nền được ước tính bằng cách sử dụng đối chứng kháng thể và tế bào chưa biệt hóa. Trên các hình vẽ, đồ thị đếm tế bào theo dòng đại diện được thể hiện đối với một trong số các quần thể con. Các số được báo cáo trong các hình vẽ thể hiện tỉ lệ phần trăm của tổng số tế bào từ cổng tế bào nguyên vẹn.

Bảng 7. Kháng thể để đếm tế bào theo dòng để xác định đặc điểm của PEC đã biệt hóa

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

NKX6,1	AF647	BD Bioscience (Cat#563338)	1:2,5
CHGA	AF405	Novus (Cat#NBP2-33198AF405)	1:1000

Ở giai đoạn DE, quần thể của tế bào dương tính kép FOXA2 và SOX17 lớn hơn 90% tổng số tế bào từ tế bào biệt hóa kiểu đại CyT49. Các tế bào PD-L1 KI/B2M KO và B2M KO thể hiện tỉ lệ phần trăm DE có thể so sánh được so với các tế bào kiểu đại (Hình 6 và Hình 7).

Ở giai đoạn PEC, sự đếm tế bào theo dòng đối với chromogranin (CHGA), PDX1 và NKX6.1 được thực hiện. Quần thể khác loại ở giai đoạn PEC bao gồm các tổ tiên tụy và tế bào nội tiết sớm (Hình 8). Từ biểu đồ hình tròn của quần thể khác loại (Hình 9), sự phân bố của quần thể tế bào từ các tế bào được chỉnh sửa được biệt hóa (PD-L1 KI/B2M KO hoặc B2M KO) là tương tự với các tế bào kiểu đại.

ARNseq được hướng đích. ARNseq được hướng đích đối với phân tích biểu hiện gen được thực hiện bằng cách sử dụng Illumina TruSeq và bảng tùy chỉnh của các oligo hướng đích 111 gen. Bảng này chủ yếu chứa các gen mà là chỉ thị của các giai đoạn phát triển trong quá trình biệt hóa tụy. Khi kết thúc mỗi giai đoạn biệt hóa, 10 μ l APV (thể tích viên được kết tụ) được thu gom và được chiết bằng cách sử dụng quy trình cột quay Qiagen RNeasy hoặc RNeasy 96, bao gồm sự xử lý ADNaza trên cột. Sự định lượng và sự kiểm soát chất lượng được thực hiện bằng cách sử dụng TapeStation kết hợp với Qubit, hoặc bằng cách bằng cách sử dụng Qiagen QIAxcel. 50-200 ng ARN được xử lý theo quy trình điều chế thư viện Illumina TruSeq, mà gồm có sự tổng hợp cADN, sự lai hóa của tập hợp oligo tùy chỉnh, rửa, mở rộng, nối của oligo đã liên kết, sự khuếch đại PCR của thư viện, và sự làm sạch thư viện, trước khi định lượng và kiểm soát chất lượng của các thư viện dsADN thu được bằng cách sử dụng TapeStation kết hợp với Qubit, hoặc bằng cách bằng cách sử dụng Qiagen QIAxcel. Các thư viện được pha loãng tiếp đến nồng độ 4 nM và được gom lại, sau đó là làm biến tính, làm tăng vọt đối chứng PhiX, và pha loãng thêm đến 10-12 pM trước khi tải lên thiết bị xác định trình tự Illumina MiSeq. Sau khi chạy giải trình tự, phân tích dữ liệu ban đầu được thực hiện tự động thông qua BaseSpace, tạo ra số đếm đọc được thô đối với mỗi đoạn dò tùy chỉnh. Đối với mỗi gen, sau đó các số đếm đọc được này được tính tổng đối với tất cả các đoạn

dò tương ứng với gen đó, với sự bổ sung 1 số đếm đọc được (để ngăn chặn phép chia xuôi cho 0). Sự chuẩn hóa được thực hiện đối với gen SF3B2, và kết quả đọc được trực quan hóa theo cách thông thường dưới dạng số lần thay đổi so với Giai đoạn 0. Khi dữ liệu được xử lý để phân tích thành phần chính, sự chuẩn hóa được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp DEseq.

Sự biểu hiện gen được chọn được thể hiện trên Hình 10. Kiểu biểu hiện động lực của *FOXA2*, *CHGA*, *PDX1* và *NKX6.1* từ các tế bào PD-L1 KI/B2M KO, hoặc B2M KO là tương tự với tế bào kiểu đại.

Xác nhận sự biểu hiện B2M và PD-L1 ở giai đoạn PEC. Ở giai đoạn PEC, các khối tủy được biệt hóa được xử lý bằng hoặc không được xử lý bằng interferon-gamma (50 ng/ml) trong 48 giờ. Khối tủy được rửa bằng PBS và sau đó được phân hủy bằng enzym thành huyền phù tế bào đơn lẻ ở nhiệt độ 37°C bằng cách sử dụng ACCUMAX™ (Catalog# A7089, Sigma, MO). Chất đệm tách MACS (Cat#130-091-221, Miltenyi Biotec, North Rhine-Westphalia, Đức) được bổ sung và huyền phù được cho đi qua bộ lọc 40 µM và được tạo viên. Để nhuộm màu chỉ thị bề mặt, tế bào đã phân hủy được ủ với kháng thể liên hợp huỳnh quang đã pha loãng trong Chất Đệm Tách MACS trong thời gian 20 phút và sau đó được rửa trong Chất Đệm Tách MACS. Tế bào được tái tạo huyền phù trong Chất Đệm FACS để thu dòng. Dữ liệu đếm tế bào theo dòng được thu lấy bằng Máy Đếm Tế Bào Theo Dòng NovoCyte. Như được thể hiện trên các Hình 11A-11F, sự biểu hiện B2M là dưới giới hạn phát hiện ở các PEC được biệt hóa từ B2M KO (Hình 11B) hoặc PD-L1 KI/B2M KO (Hình 11C), và PD-L1 được biểu hiện ở các PEC được biệt hóa từ PD-L1 KI/B2M KO (Hình 11F). Nhìn chung, lớn hơn khoảng 90% số PEC biểu hiện PD-L1 chỉ ra quần thể tế bào tương đồng. Thường xuyên là, có sự mất biểu hiện gen chuyển theo thời gian sau sự biệt hóa của tế bào gốc được chỉnh sửa gen (Hong et al., Mol. Ther., 2017, 25(1):44-53).

Kiểu hình miễn dịch của tế bào PEC. Ở giai đoạn PEC, các khối tủy được biệt hóa được xử lý bằng hoặc không được xử lý bằng interferon-gamma (50 ng/ml) trong 48 giờ. Khối tủy được thu hoạch để nhuộm màu MHC lớp I và II. Không có sự biểu hiện MHC lớp II ở giai đoạn PEC từ tế bào kiểu đại hoặc tế bào được chỉnh sửa (PD-L1 KI/B2M KO và B2M KO) (Hình 12D-12F). Sự biểu hiện của HLA-ABC (MHC lớp I) là thấp (1,3% từ tế bào kiểu đại) và nó được điều hòa tăng khi kích thích bằng IFN-γ.

Tuy nhiên, HLA-ABC không được biểu hiện thậm chí dưới sự kích thích của IFN- γ ở tế bào được chỉnh sửa (PD-L1 KI/B2M KO và B2M KO) (Hình 12A-12C).

Ví dụ 7: Tạo ra tế bào gốc đa năng người (hPSC) TXNIP KO

Sự chọn lọc ARN dẫn (gARN) đối với TXNIP. Mười gARN định hướng TXNIP được thiết kế để hướng đích exon 1 và exon 2 của trình tự mã hóa TXNIP (Bảng 8). Trình tự PAM được thể hiện ở phong chữ in đậm ở các trình tự đích được trình bày trong Bảng 8, và trình tự ADN tương ứng với các trình tự dẫn được trình bày trong Bảng 8. Các gARN này đã dự đoán các điểm ngoài đích thấp dựa vào sự dự đoán độ tương đồng trình tự sử dụng phần mềm thiết kế gARN.

Bảng 8. Trình tự đích TXNIP và trình tự gARN được chọn

Tên	Trình tự đích (5'-3') (trình tự PAM được in đậm)	SEQ ID NO:	Phiên bản ADN của trình tự dẫn (5'-3')	SEQ ID NO:
TXNIP_Exon 1_T1	GAAGCGTGTCTTCAT AGCGC AGG	45	GAAGCGTGTCTTCAT AGCGC	15
TXNIP_Exon 1_T21	TTACTCGTGTCAAAG CCGTT AGG	46	TTACTCGTGTCAAAG CCGTT	16
TXNIP_Exon 1_T22	TGTCAAAGCCGTTAG GATCCT TGG	47	TGTCAAAGCCGTTAG GATCC	17
TXNIP_Exon 1_T23	GCCGTTAGGATCCTG GCTTG CGG	48	GCCGTTAGGATCCTG GCTTG	18
TXNIP_Exon 1_T25	GCGGAGTGGCTAAAG TGCTT TGG	49	GCGGAGTGGCTAAAG TGCTT	19

TXNIP_Exon 1_T5	TCCGCAAGCCAGGAT CCTAACGG	50	TCCGCAAGCCAGGAT CCTAA	20
TXNIP_Exon 2_T4	GTTCGGCTTTGAGCT TCCTCAGG	51	GTTCGGCTTTGAGCT TCCTC	21
TXNIP_Exon 2_T2	GAGATGGTGATCATG AGACCTGG	52	GAGATGGTGATCATG AGACC	22
TXNIP_Exon 2_T1	TTGTACTCATATTTGT TTCCAGG	53	TTGTACTCATATTTGT TTCC	23
TXNIP_Exon 2_T3	AACAAATATGAGTAC AAGTTCGG	54	AACAAATATGAGTAC AAGTT	24

Sự tạo ra và phân tích đặc điểm dòng vô tính TXNIP KO hiPSC. Để đánh giá hiệu quả cắt của các gARN này ở hiPSC, các tế bào TC1133 hiPSC được tạo xung điện sử dụng Máy tạo xung điện Neon (Hệ chuyển nạp Neon ThermoFisher ThermoFisher Cat# MPK5000) với hỗn hợp RNP của protein Cas9 (Biomay) và ARN dẫn (Synthego) ở tỉ lệ mol là 3:1 (gARN:Cas9) với các giá trị tuyệt đối là 125 pmol của Cas9 và 375 pmol của gARN. Để tạo thành phức hợp RNP, gARN và Cas9 được kết hợp trong một lọ với đệm R đến tổng thể tích là 5 μ L và được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào được phân ly bằng cách sử dụng ACCUTASE®, sau đó được tái tạo huyền phù trong môi trường DMEM/F12 (Gibco, cat#11320033), được đếm bằng cách sử dụng NC-200 (Chemometec) và được ly tâm. Tổng cộng 1×10^6 tế bào được tái tạo huyền phù với phức hợp RNP và chất đệm R được bổ sung đến tổng thể tích bằng 125 μ L. Sau đó hỗn hợp này được tạo xung điện sử dụng các thông số: 2 xung, 30 mili giây, 1100 V. Sau khi xung điện, các tế bào được hút bằng pipet ra vào trong ống Eppendorf được nạp môi trường StemFlex với RevitaCell. Sau đó huyền phù tế bào này được cấy vào trong đĩa nuôi cấy mô đã được phủ trước bằng BIOLAMININ 521 CTG. Các tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) trong 48 giờ. Sau 48 giờ, ADN hệ gen được thu hoạch từ tế bào bằng cách sử dụng QuickExtract

PCR đối với trình tự TXNIP đích được thực hiện và ADN được khuếch đại thu được được giải trình tự Sanger. Phân tích TIDE được sử dụng để phân tích số liệu giải trình tự đầu ra cho tỉ lệ phần trăm indel sử dụng phần mềm Tsunami. Hình 13 thể hiện hiệu quả cắt đối với TXNIP gARN. Sau đó, gARN được chọn dựa vào tần suất indel của chúng trong các hPSC.

Sự lệch đích của gARN hiệu quả cắt nhiều nhất được đánh giá ở ADN thu được từ tế bào gốc sử dụng phân tích bắt giữ thể lai của các vị trí được dự đoán bằng độ tương tự trình tự. Các thí nghiệm khác với TXNIP gARN T5 được thực hiện vì nó không thể hiện các hiệu quả lệch đích có thể phát hiện được và chứng tỏ hoạt tính trúng đích cao.

Sự tạo ra và phân tích đặc điểm của dòng vô tính TXNIP KO hPSC. Sử dụng TXNIP gARN T5, CyT49 hESC (Viacyte) được tạo xung điện và phân loại tế bào đơn ở 3 ngày sau khi xung điện sử dụng máy phân loại WOLF FACS (Nanocollect) vào trong đĩa 96 giếng BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex và Revitacell. Các tế bào đơn được cấy vào đĩa được nuôi trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) với sự thay đổi môi trường cách ngày tới khi khuẩn lạc đủ lớn để tái cấy giống là các tế bào đơn. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen.

Tình trạng TXNIP KO của các dòng vô tính được xác định qua PCR và giải trình tự Sanger. Các trình tự ADN thu được của vùng TXNIP đích được căn trình tự trong phần mềm Snapgene để xác định độ tương đồng và tình trạng tiếp hợp giao tử. Các dòng vô tính với sự chỉnh sửa mong muốn được nhân rộng và được xác nhận thêm qua sự đánh giá đếm tế bào theo dòng đối với sự biểu hiện TXNIP. Tình trạng kiểu nhân của các dòng vô tính được đánh giá qua dịch vụ Di truyền dòng tế bào và kiểu nhân bình thường được báo cáo (Bảng 9).

Bảng 9. Phân tích kiểu nhân

Dòng tế bào	Cấy chuyển	Phân tích kiểu nhân	Phân tích FISH	Phân tích mảng aCGH
TXNIPKO#2	P31	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
TXNIPKO#13	P31	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA

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

ARNseq được hướng đích đối với sự phân tích biểu hiện gen được thực hiện bằng cách sử dụng Illumina TruSeq và bảng tùy chỉnh của các oligo, như được mô tả trên đây. Sự biểu hiện gen được chọn được thể hiện trên Hình 20. Kiểu biểu hiện động lực của *FOXA2*, *CHGA*, *PDX1* và *NKX6.1* từ tế bào TXNIP KO là tương tự với tế bào kiểu đại. Ở giai đoạn PEC, sự đếm tế bào theo dòng đối với chromogranin (*CHGA*), *PDX1* và *NKX6.1* cũng được thực hiện. Quần thể khác loại ở giai đoạn PEC bao gồm 30,6% tế bào tiền thân tụy (*tức là*, *CHGA*⁺/*NKX6.1*⁺/*PDX1*⁺) (Hình 21).

Ví dụ 8: Sự tạo thành tế bào gốc đa năng người (hPSC) B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI

Thiết kế chiến lược B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI. Các tế bào được tạo ra trong đó trình tự mã hóa PD-L1 được chèn trong locus B2M (nhờ đó bất hoạt gen B2M) và trình tự mã hóa HLA-E được chèn trong locus TXNIP (nhờ đó bất hoạt gen TXNIP).

Thiết kế plasmit để chèn PD-L1 (CD274) vào trong locus B2M được mô tả trong Ví dụ 3. Plasmit cho chứa trình tự khởi động CAGGS điều khiển cADN của PD-L1 được gắn sườn bằng các nhánh tương đồng có 800 cặp bazơ với trình tự giống hệt với locus B2M xung quanh exon 1. B2M-2 gARN được sử dụng để làm thuận lợi cho sự cài xen của gen chuyển PD-L1 tại locus B2M đích. Plasmit cho PD-L1 được đưa vào cùng với phức hợp RNP được tạo thành bởi gARN hướng đích B2M và protein Cas9. Mỗi 1 triệu tế bào CyT49 (ViaCyte), 4 µg ADN plasmit được phân phối cùng với RNP. Sự xung điện được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2. Bảy ngày sau khi xung điện, các tế bào được làm giàu đối với tế bào dương tính PD-L1 qua sự phân loại tế bào được hỗ trợ bởi từ tính (MACS) sử dụng chất phản ứng Miltenyi (Vi hạt IgG kháng chuột Cat#130-048-401, cột LS Cat#130-042-401, và Máy tách MidiMACS Cat#130-042-302) hoặc chất phản ứng Thermofisher (Từ tính DynaMag™-15 Cat#12301D, Kit

IgG chuột nhắt CELlection™ Pan Cat#11531D, IgG chuột nhắt Dynabeads™ Pan Cat#11042).

Sau khi quần thể dương tính PD-L1 được làm giàu được nhân rộng, gen chuyển IgG trime HLA-E được chèn vào trong locut bộ gen TXNIP qua HDR được cảm ứng bởi CRISPR sử dụng plasmid cho bao gồm trình tự HLA-E. cADN trime HLA-E được tạo thành bởi peptit tín hiệu B2M dung hợp với peptit trình diện HLA-G dung hợp với protein màng B2M dung hợp với protein HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó. Thiết kế trime này đã được công bố trước đây (Gornalusse et al. (2017) Nat. Biotechnol. 35(8): 765-772). Trình tự mã hóa trime HLA-E (bao gồm các cầu nối) là SEQ ID NO: 55 (*tức là*, các SEQ ID NO: 26-31). Plasmid cho để phân phối HLA-E chứa trình tự khởi động CAGGS điều khiển sự biểu hiện của trime HLA-E được gắn sườn bởi các nhánh tương đồng 800 cặp bazơ với trình tự giống với locut TXNIP xung quanh exon 1 (Hình 14, Bảng 10 và Bảng 11). Theo một số phương án, plasmid cho bao gồm SEQ ID NO: 34 hoặc 56.

Bảng 10. Các thành phần của plasmid cho TXNIP-CAGGS-HLA-E

1

Thành phần	Vị trí (kích thước theo bp)	SEQ ID NO:
ITR bên trái	1-130 (130)	6
LHA-TXNIP	145-944 (800)	25
trình tự tăng cường CMV	973-1352 (380)	8
trình tự khởi động β -actin gà	1355-1630 (276)	9
intron khảm	1631-2639 (1009)	10
trình tự tín hiệu B2M	2684-2743 (60)	26
peptit HLA-G	2744-2770 (27)	27
cầu nối GS	2771-2815 (45)	28

protein màng B2M	2816-3112 (297)	29
cầu nối GS	3113-3172 (60)	30
HLA-E	3173-4183 (1011)	31
tín hiệu bGH poly(A)	4204-4428 (225)	12
RHA-TXNIP	4435-5234 (800)	32
ITR bên phải	5276-5416 (141)	14
Plasmit nguyên vẹn	7763 bp	34

Bảng 11. Các thành phần của plasmit cho TXNIP-CAGGS-HLA-E

2

Thành phần	Vị trí (kích thước theo bp)	SEQ ID NO:
ITR bên trái	1-130 (130)	6
LHA-TXNIP	145-944 (800)	25
trình tự tăng cường CMV	973-1352 (380)	8
trình tự khởi động β -actin gà	1355-1630 (276)	9
intron khảm (bị cắt cụt)	1631-2336 (706)	57
trình tự tín hiệu B2M	2381-2440 (60)	26
peptit HLA-G	2441-2467 (27)	27
cầu nối GS	2468-2512 (45)	28
protein màng B2M	2513-2809 (297)	29

cầu nối GS	2810-2869 (60)	30
HLA-E	2870-3880 (1011)	31
tín hiệu bGH poly(A)	3901-4125 (225)	12
RHA-TXNIP	4132-4931 (800)	32
ITR bên phải	4973-5113 (141)	14
Plasmit nguyên vẹn	7460 bp	56

TXNIP-T5 gARN được sử dụng để thúc đẩy sự cài xen của gen chuyển HLA-E ở locut TXNIP được hướng đích. Plasmit cho HLA-E được đưa vào cùng với phức hợp RNP tạo thành TXNIP-T5 gARN và protein Cas9. Trên mỗi 1 triệu tế bào PD-L1+, 4 µg ADN của plasmit cho HLA-E (SEQ ID NO: 56) được phân phối cùng với RNP. Theo cách khác, ADN phương án cho HLA-E (SEQ ID NO: 34) có thể được sử dụng. Sự xung điện được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2. Bảy ngày sau khi xung điện, tế bào được làm giàu đối với tế bào dương tính HLA-E qua MACS sử dụng chất phản ứng Miltenyi hoặc chất phản ứng Thermofisher. Sau khi làm giàu HLA-E, các tế bào được phân loại tế bào đơn sử dụng thiết bị phân loại WOLF FACS (Nanocollect) vào trong tế bào 96 giếng phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex và Revitacell. Các tế bào đơn được cấy vào đĩa được nuôi trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) với sự thay đổi môi trường cách ngày tới khi khuẩn lạc đủ lớn để tái cấy giống là các tế bào đơn. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen. Kháng thể kháng PD-L1 và kháng HLA-E (Bảng 4) được sử dụng cho sự làm giàu MACS và phân loại FACS vào trong đĩa 96 giếng với sự thiết lập tạo cổng đối với tế bào dương tính kép HLA-E và PD-L1. Để sắp xếp bằng FACS, tế bào chưa được chỉnh sửa đóng vai trò làm đối chứng âm.

Các dòng được hướng đích đúng được xác định thông qua PCR đối với sự cài xen PD-L1 KI và sự cài xen HLA-E KI sử dụng các môi mà khuếch đại vùng từ bên ngoài các nhánh tương đồng plasmit đối với sự cài xen PD-L1 cADN hoặc sự cài xen

HLA-E cADN, tương ứng, cho phép sự khuếch đại của chỉ ADN được tích hợp KI. Sự cài xen trúng đích được thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử bằng PCR để đánh giá KI đã xảy ra theo phương thức dị hợp tử hay đồng hợp tử. Nếu dòng vô tính dị hợp tử được xác định, alen âm KI được gửi để giải trình tự Sanger để xác định rằng nó chứa indel làm đứt đoạn B2M hoặc indel làm đứt đoạn TXNIP, tương ứng. Các dòng KI đúng với sự đứt đoạn B2M và TXNIP hoàn toàn (thông qua sự cài xen KI hoặc sự tạo thành indel) được mở rộng trong định dạng nuôi cấy mô tăng dần đến khi đạt đến kích thước quần thể là 30 triệu tế bào. Xấp xỉ 10 dòng được mở rộng theo phương thức này và được xác nhận là đa năng bằng cách thử nghiệm đối với OCT4 và SOX2 thông qua việc đếm tế bào theo dòng nội bào (Hình 15).

Sau đó các dòng mà đã vượt qua các thử nghiệm nêu trên, được thử nghiệm thêm để phân tích kiểu nhân (Cell Line Genetics), như được mô tả trên đây. Các kết quả lập băng G của các dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI (“V1-B”) được chọn lọc được trình bày trong Bảng 12. Ngoài ra, các dòng vô tính V1-B sau đó được thử nghiệm đối với sự cạnh tranh để biệt hóa thành tổ tiên nội bì tự (PEC).

Bảng 12. Các kết quả lập băng G

Dòng tế bào	Cấy chuyển	Phân tích kiểu nhân	Phân tích FISH	Phân tích mảng aCGH
V1-B003	P37	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
V1-B007	P37	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA
V1-B008	P36	Bình thường	Bình thường	VƯỢT QUA

PD-L1 và HLA-E tiếp tục được biểu hiện sau khi biệt hóa thành các tế bào Giai đoạn 6 trên mỗi quy trình nội tiết tự được báo cáo trước đó (Rezania et al. (2014) Nat. Biotechnol. 32(11): 1121-1133) (Hình 16). Quần thể tế bào được biệt hóa là đồng nhất đối với sự biểu hiện của gen chuyển, ví dụ, 94,4% số tế bào biểu hiện PD-L1 và 97,0% số tế bào biểu hiện HLA-E. Hình 22A thể hiện hình thái học tương tự của các tế bào dòng vô tính khác nhau (“S6-V1B-H9,” “S6-V1B-3B11,” “S6-V1B-1G7,” và “S6-V1B-

3C2”) được biệt hóa thành Giai đoạn 6 so với tế bào kiểu đại và tế bào đối chứng dẫn không cắt. Sự biểu hiện gen được chọn của các dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI được thể hiện trên các Hình 23A-Hình 23F. Kiểu biểu hiện động lực của *INS*, *NKX6.1*, *GCK*, *GCG*, và *SST* từ tế bào dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI tương tự với tế bào kiểu đại (Hình 23A). Mức độ biểu hiện của các chỉ thị Giai đoạn 6 *INS* (Hình 23B), *NKX6.1* (Hình 23C), *GCG* (Hình 23D), *SST* (Hình 23E), và *GCK* (Hình 23F) từ các dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI được biệt hóa khác nhau (“S6-V1B-H9,” “S6-V1B-3B11,” “S6-V1B-1G7,” và “S6-V1B-3C2”) là tương tự với các mức ở thí nghiệm kiểu đại và đảo kiểu đại Giai đoạn 6. Dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI được biệt hóa (“ES-V1B-H9”) được sử dụng làm đối chứng âm.

Hình 24A-24B thể hiện sự đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện *INS* và *GCG* (Hình 24A) và sự biểu hiện *INS* và *NKX6.1* (Hình 24B) ở tế bào Giai đoạn 6 được biệt hóa từ dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI. Hình 25A-25B thể hiện tỉ lệ phần trăm của sự biểu hiện của *INS* (Hình 25A) và sự biểu hiện *NKX6.1* (Hình 25B) ở tế bào Giai đoạn 6 được biệt hóa từ hai dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI và TXNIP KO/HLA-E KI (“S6-V1B003” và “V1B-H9”). Sự biểu hiện ở cả hai loại là tương tự với của tế bào kiểu đại và tế bào đối chứng dẫn không cắt.

Ở giai đoạn PEC, sự đếm tế bào theo dòng đối với chromogranin (*CHGA*), *PDX1* và *NKX6.1* được thực hiện. Quần thể khác loại ở giai đoạn PEC bao gồm tế bào tiền thân tụy, nội tiết sớm (Hình 17). ARNseq được hướng đích cho sự phân tích biểu hiện gen được thực hiện, như được mô tả trên đây. Sự biểu hiện gen được chọn đối với dòng vô tính TXNIP KO được thể hiện trên Hình 18A và sự biểu hiện gen được chọn đối với dòng vô tính V1-B được thể hiện trên Hình 18B. Kiểu biểu hiện động lực của *FOXA2*, *CHGA*, *PDX1* và *NKX6.1* từ tế bào dòng vô tính V1-B hoặc TXNIP KO là tương tự với tế bào kiểu đại.

Tế bào được tạo ra trong đó trình tự mã hóa HLA-E được chèn vào trong locus TXNIP (nhờ đó bất hoạt gen TXNIP) sử dụng vector cho HLA-E bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 56. ARNseq được hướng đích cho sự phân tích biểu hiện gen được thực hiện, như được mô tả trên đây. Sự biểu hiện gen được chọn đối với dòng vô tính TXNIP KO/HLA-E KI được thể hiện trên Hình 28. Kiểu biểu hiện động lực của

FOXA2, *CHGA*, *PDX1* và *NKX6.1* từ tế bào TXNIP KO/HLA-E KI là tương tự với tế bào kiểu đại.

Theo cách khác, tế bào được tạo ra trong đó trình tự mã hóa HLA-E được chèn vào trong locut TXNIP sử dụng vectơ cho HLA-E bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 34. Tế bào được chỉnh sửa khối được biệt hóa thành giai đoạn PEC và được biểu hiện HLA-E ở ít nhất 75% quần thể tế bào (số liệu không được thể hiện). Đánh giá đếm tế bào theo dòng của sự biểu hiện *PDX1* và *NKX6.1* ở tế bào PEC được biệt hóa từ tế bào TXNIP KO là tương tự với tế bào PEC được biệt hóa từ tế bào kiểu đại (số liệu không được thể hiện).

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

Tế bào đã biệt hóa PEC được thử nghiệm về khả năng của chúng để kích hoạt đáp ứng miễn dịch thông qua thử nghiệm hoạt hóa/tăng sinh tế bào T người *in vitro*. PBMC thể cho mới được mua từ Hemacare và tế bào T CD3+ được tinh chế bằng cách sử dụng bộ Kit Phân Lập Tế Bào T Pan, người (Miltenyi Cat#130-096-535). Tế bào T đã phân lập được gắn nhãn bằng Quy Trình Kit Tăng Sinh Tế Bào CFSE CellTrace™ (Thermofisher Cat#C34554) theo hướng dẫn sử dụng của người sản xuất và được đồng ủ với PEC đã biệt hóa trong thời gian 5 ngày. Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 Để Mở Rộng Và Hoạt Hóa Tế Bào T (Thermofisher Cat# 11161D) được sử dụng làm đối chứng dương để hoạt hóa tế bào T. Một mình tế bào T được gắn nhãn bằng CFSE và dùng làm đối chứng âm. Tỷ lệ phần trăm của tế bào CD3+ CFSE+ được đo để đánh giá phần trăm sự tăng sinh tế bào T (Hình 19A-19B). Sự tăng sinh tế bào T được kích hoạt bằng WT PEC ở trên đối chứng có một mình tế bào T. PEC thu được từ B2M KO, B2M KO/PD-L1 KI, và B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI CyT49 không kích hoạt sự tăng sinh tế bào T trên tế bào T chỉ điều khiển sự thể hiện bản chất sinh miễn dịch giảm của tế bào được chỉnh sửa.

Ví dụ 10: Nghiên cứu hiệu quả in vivo của dòng vô tính được hướng đích gen

Tế bào nội bì tụy được tạo ra từ dòng tế bào hES vô tính thu được từ CyT49 với sự cải biến di truyền sau đây: 1) sự làm khuyết được hướng đích của sự biểu hiện B2M

và sự biểu hiện bị cường bức của PD-L1, 2) sự làm khuyết được hướng đích của sự biểu hiện B2M và sự biểu hiện bị cường bức của HLA-E, hoặc 3) sự làm khuyết được hướng đích TXNIP. Ngoài ra, dòng tế bào không được cải biến vô tính thu được từ sự chuyển nạp với ARN dẫn không cắt (NCG).

Sau các quy trình chuẩn, các khối tụ nội bì tụy thu được từ dòng vô tính được chỉ định được nạp vào trong thiết bị được đục lỗ (PD) để tạo ra các vật thể thử nghiệm hoặc đối chứng. PD cho phép sự phân bố mạch trực tiếp sau khi cấy ghép dưới da và các tế bào tiền thân tụy được bao vi nang trưởng thành *in vivo* thành tế bào nội tiết tụy hoạt động bao gồm tế bào đáp ứng glucoza, sản sinh insulin.

Như được tổng hợp trong Bảng 13, năm nhóm chuột trụi lông thiếu tuyến ức được cấy dưới da hai vật phẩm, mỗi vật phẩm chứa khoảng 7×10^6 tế bào nội bì tụy thu được từ sự biệt hóa của bốn dòng vô tính được mô tả trên đây, hoặc tế bào CyT49 hES (ViaCyte) kiểu đại.

Bảng 13. Thiết kế nghiên cứu

Số nhóm	ID nhóm	Nguồn gốc hESC	Sự cải biến di truyền		Số lượng con vật	Điểm cuối
			Bất hoạt (Mất chức)	Gắn vào (Lợi ích)		
1	Đối	CyT49	Không	Không	6 con mỗi nhóm	20 tuần
2	NCG	Dòng vô tính	Không	Không		
3	TXNIP	Dòng vô tính	TXNIP	Không		
4	B2M	Dòng vô tính	B2M	PD-L1		
5	B2M	Dòng vô tính	B2M	HLA-E		

Bắt đầu ở 12 tuần tất cả các con vật sống sót được cho tiến hành đánh giá hiệu quả qua thử nghiệm tiết insulin được kích thích bằng glucoza (GSIS). Mẫu máu được thu từ các con vật không bị bỏ đói trước và sau khi sử dụng 3g/kg glucoza trong màng bụng. Nồng độ huyết thanh của C-peptit người được xác định qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Thử nghiệm GSIS được thực hiện ở 12, 16, và 20 tuần. Các kết quả chỉ ra là không có những khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm thí nghiệm, đặc biệt là vượt qua thời điểm 12 tuần. So sánh với các mức C-peptit được phát hiện ở nhóm đối chứng (Nhóm 1, <40 pM đến 2,0 nM, trung bình 1,1 nM) các mức C-peptit tăng ở 2 trong số 6 con vật từ Nhóm 3 (TXNIP KO, trung bình 1,5 nM). Các nhóm khác, Nhóm 2 (NCG, trung bình 0,5 nM), Nhóm 4 (B2MKO/PD-L1 KI, trung bình 0,5 nM), và Nhóm 5 (B2M KO/HLA-E KI, trung bình 0,4 nM), thể hiện phạm vi mức C-peptit tương tự so với nhóm đối chứng, nhưng với nhiều con vật gần đầu thấp hơn của phạm vi này. Tuy nhiên, những khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Các kết quả này chỉ ra rằng không có sự cải biến di truyền được đưa vào hay thao tác nào cần để tạo ra dòng vô tính ảnh hưởng đến khả năng đối với dòng tế bào quan tâm để biệt hóa thành tế bào nội bì tụy *in vitro* và sau đó tạo ra tế bào beta chức năng *in vivo*.

Ở 20 tuần, sau thử nghiệm GSIS, các con vật được cho chết êm ái và vật phẩm thử nghiệm được tách ra từ mô cấy được cố định protein formalin được đệm trung hòa, được xử lý cho các lam kính, và được nhuộm bằng H&E và bằng mô hóa học miễn dịch đối với insulin và glucagon.

Các đánh giá hiệu quả *in vivo* qua thử nghiệm GSIS thể hiện là không có sự khác biệt đáng kể nào giữa các vật phẩm đối chứng không được chỉnh sửa và các vật phẩm thử nghiệm được chỉnh sửa được phối chế với tế bào nội bì tụy thu được từ dòng tế bào vô tính, mỗi tế bào mang tập con của sự cải biến di truyền. Các kết quả gợi ý rằng sự cải biến di truyền riêng lẻ và quy trình mà chúng được đưa vào có thể được dung nạp *in vivo*.

Ví dụ 11. Nghiên cứu hiệu quả *in vivo* của các dòng tế bào B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI

Bốn dòng vô tính được tạo ra về cơ bản như được mô tả trên đây trong Ví dụ 8 và được nạp vào trong các thiết bị được khoan để tạo thành các vật phẩm thử nghiệm. Các vật phẩm đối chứng chứa tế bào CyT49 không được cải biến (ViaCyte). Các vật phẩm bao gồm khoảng 7×10^6 tế bào nội bì tụy được cấy dưới da vào trong chuột cống trụi lông thiếu tuyến ức (2 vật phẩm/con chuột cống, 8 con chuột cống/nhóm).

Ở 12, 16, 20, và 24 tuần, tất cả các con vật sống sót được cho qua thử nghiệm tiết insulin được kích thích bằng glucoza (GSIS). Mẫu máu được thu từ các con vật bị bỏ đói trước và sau khi sử dụng 3g/kg glucoza trong màng bụng. Nồng độ huyết thanh của C-peptit người được xác định qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym. C-peptit huyết thanh được phát hiện ở hầu hết các con vật ở 12 tuần sau khi cấy. Các mức C-peptit huyết thanh ở 16, 20, và 24 tuần sau khi cấy được trình bày trong Bảng 14. Không quan sát thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nào giữa các nhóm động vật được cấy bằng tế bào được chỉnh sửa gen so với tế bào đối chứng.

Bảng 14. Các mức C-peptit huyết thanh *in vivo*.

Nhóm	C-peptit huyết thanh (pmol)		
	Trung bình	Thấp hơn 95%	Cao hơn 95%
Các tế bào được chỉnh sửa gen - 16 tuần	729	40	1418
Các tế bào được chỉnh sửa gen - 20 tuần	1080	391	1769
Các tế bào được chỉnh sửa gen - 24 tuần	1676	987	2365
Tế bào đối chứng - 16 tuần	1075	386	1764
Tế bào đối chứng - 20 tuần	1883	1193	2572
Tế bào đối chứng - 24 tuần	2466	1777	3155

Ở 25 tuần, các con vật sống sót sẽ được cho qua thử thách insulin (thử nghiệm dung nạp insulin, ITT) để đánh giá sự thay đổi C-peptit huyết thanh người trong sự đáp ứng với việc làm giảm glucoza máu khi không có mặt sự nạp thức ăn. Các mẫu máu sẽ thu được từ các con vật bị đói trước và ở nhiều thời điểm (15, 30, 60 phút) sau khi dùng

1 đơn vị insulin trong màng bụng trên mỗi kg khối lượng cơ thể. Nồng độ huyết thanh của C-peptit người sẽ được xác định qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Ở 26 tuần, các con vật sống sót sẽ được cho chết êm ái và các vật phẩm thử nghiệm được tách ra từ cây sẽ được xử lý cho các lam kính và được nhuộm bằng H&E và bằng mô hóa học miễn dịch (IHC) cho insulin và glucagon để xác định tế bào nội tiết tụy người. IHC bổ sung cho chỉ thị nhân đặc hiệu người NuMA1 sẽ được thực hiện để xác định sự định vị tiềm năng của các tế bào thu được từ cây ghép ở ngoài khoang của mảnh cây tách từ mô chứa vật phẩm thử nghiệm.

Ví dụ 12. Nghiên cứu hiệu quả in vivo của các dòng tế bào B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI

Các khối tụy của tế bào nội bì tụy B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI (bao gồm khoảng 7×10^6 tế bào) sẽ được bào chế thành vật phẩm thử nghiệm. Bốn mươi sáu con chuột trụi lông thiếu tuyến ức sẽ được cấy dưới da bằng hai vật phẩm thử nghiệm mỗi con. Các con vật trong nghiên cứu sẽ được đánh giá đối với GSIS, ITT, và glucoza máu lúc không đói (NFBG). Mười con vật cho mỗi nhóm sẽ được cho ăn thịt vào các thời điểm chấm dứt theo lịch trình là 13, 17, 26 và 39 tuần, trong khi 6 con khác sẽ được nghiên cứu để giải quyết các trường hợp có thể bị chấm dứt sớm không theo lịch trình. Từ mỗi con vật, hai vật phẩm thử nghiệm được tách ra mảnh cây sẽ được chỉ định ngẫu nhiên để đánh giá mô học hoặc đánh giá tổng hàm lượng C-peptit. Bảng 15 thể hiện thiết kế thí nghiệm.

Bảng 15. Thiết kế nghiên cứu

Số nhóm	Số lượng các vật phẩm thử nghiệm	Số lượng con vật	Các thời điểm (Tuần)	Các thời điểm GSIS ITT (Tuần)	Các thời điểm (Tuần)	Các phân tích cuối cùng
1	20	10 con đực	12	NA	13	mảnh cấy tách từ mô

2	20	10 con đực	12, 16	NA	17	Đối với mỗi
3	20	10 con đực	12, 16, 20, 24	25	26	nhóm: Mô học 5 con vật
4	Lên đến 32	Lên đến 16 con đực	12, 16, 20, 24, 30, 36	25, 33	39	Hàm lượng C-peptit 5 con vật
Tổng cộng	92	46 con đực				

Ở 12, 16, 20, 24, 30, và 36 tuần, tất cả các con vật sống sót sẽ được cho qua các đánh giá hiệu quả qua thử nghiệm tiết insulin được kích thích bằng glucoza (GSIS). Mẫu máu sẽ được thu từ các con vật bị bỏ đói trước và sau khi sử dụng 3g/kg glucoza trong màng bụng. Nồng độ huyết thanh của C-peptit người sẽ được xác định qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Ở 25 và 33 tuần, các con vật sống sót sẽ được cho qua thử thách insulin (thử nghiệm dung nạp insulin, ITT) để đánh giá sự thay đổi C-peptit huyết thanh người trong sự đáp ứng với việc làm giảm glucoza máu khi không có mặt sự nạp thức ăn. Các mẫu máu sẽ thu được từ các con vật bị đói trước và nhiều thời điểm (15, 30, 60 phút) sau khi dùng 1 đơn vị insulin trong màng bụng trên mỗi kg khối lượng cơ thể. Nồng độ huyết thanh của C-peptit người sẽ được xác định qua thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym.

Glucoza máu khi không đói (NFBG) sẽ được đo trước khi bắt đầu bỏ đói cho thử nghiệm GSIS và ITT, ở khoảng 12, 16, 20, 24, 25, 30, 33, và 36 tuần.

Ở các điểm cuối được lên lịch được xác định ở Bảng 13, các con vật sẽ được cho chết êm ái. Sự chết êm ái sẽ được thực hiện bằng việc hít CO₂ sau đó là mở phanh ngực. Mổ tử thi gộp sẽ được thực hiện trên tất cả các điểm kết thúc được lập lịch và không được lập lịch và các bất thường vĩ mô sẽ được ghi nhận.

Các mảnh cấy tách từ mô được chỉ định sẽ được làm đông khô sau đó là đồng nhất hóa hàm lượng khoảng. Tổng hàm lượng C-peptit của chất đồng nhất sẽ được xác định qua các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym. Tổng hàm lượng C-peptit trong mảnh cấy tách từ mô sẽ được sử dụng để tính liều lâm sàng.

Các vật phẩm thử nghiệm được tách lấy từ mô cấy được chỉ định sẽ được cố định trong formalin đệm trung tính, được xử lý thành các phiến kính, và nhuộm bằng H&E và bằng hóa mô miễn dịch (IHC) cho insulin và glucagon để xác định các tế bào nội tiết tuyến tụy của con người. IHC bổ sung cho chỉ thị nhân đặc hiệu người NuMA1 sẽ được thực hiện để xác định sự định vị tiềm năng của các tế bào thu được từ cấy ghép ở ngoài khoang của mảnh cấy tách từ mô chứa vật phẩm thử nghiệm.

Ví dụ 13: Sự tạo thành B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI ở iPSC người

iPSC người (iPSC 0025) được tạo ra trong đó trình tự mã hóa PD-L1 được chèn trong locut B2M. Phức hợp RNP được tạo thành bằng cách kết hợp B2M-2 gARN (SEQ ID NO: 2) và protein Cas9 ở tỉ lệ mol là 3:1 (gARN:Cas9). Để tạo thành phức hợp RNP, gARN và Cas9 được kết hợp trong một lọ với đệm R đến tổng thể tích là 5 μ L và được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào được phân ly bằng cách sử dụng ACCUTASE®, sau đó được tái tạo huyền phù trong môi trường DMEM/F12 (Gibco, cat#11320033), được đếm bằng cách sử dụng NC-200 (Chemometec) và được ly tâm. Tổng cộng 1×10^6 tế bào được tái huyền phù bằng phức hợp RNP. Bốn μ g của plasmit cho B2M-CAGGS-PD-L1 (SEQ ID NO: 33) và chất đệm R được bổ sung cho tổng thể tích 125 μ L. Sau đó hỗn hợp này được tạo xung điện sử dụng các thông số: 2 xung, 30 mili giây, 1100 V. Bảy ngày sau khi xung điện, các tế bào được làm giàu đối với tế bào dương tính PD-L1 qua MACS sử dụng chất phản ứng Miltenyi hoặc chất phản ứng Thermofisher về cơ bản như được mô tả trên đây trong Ví dụ 8.

Sau khi quần thể dương tính PD-L1 được làm giàu được nhân rộng, các tế bào được tạo xung điện với phức hợp RNP bao gồm TXNIP-T5 gARN (SEQ ID NO: 20) và protein Cas9 theo tỉ lệ mol là 3:1 (gARN:Cas9) và 4 μ g của plasmit cho TXNIP-CAGGS-HLA-E 2 (SEQ ID NO: 56) về cơ bản như được mô tả trên đây. Bảy ngày sau khi xung điện, tế bào được làm giàu đối với tế bào dương tính HLA-E qua MACS sử dụng chất phản ứng Miltenyi hoặc chất phản ứng Thermofisher. Sau khi làm giàu HLA-

E, các tế bào được phân loại tế bào đơn sử dụng thiết bị phân loại WOLF FACS (Nanocollect) vào trong tế bào 96 giếng phủ BIOLAMININ 521 CTG với StemFlex và Revitacell. Các tế bào đơn được cấy vào đĩa được nuôi trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂) với sự thay đổi môi trường cách ngày tới khi khuẩn lạc đủ lớn để tái cấy giống là các tế bào đơn. Khi hợp lưu, các mẫu được chia ra để duy trì và chiết ADN hệ gen. Kháng thể kháng PD-L1 và kháng HLA-E (Bảng 4) được sử dụng cho sự làm giàu MACS và phân loại FACS vào trong đĩa 96 giếng với sự thiết lập tạo cổng đối với tế bào dương tính kép HLA-E và PD-L1. Để sắp xếp bằng FACS, tế bào chưa được chỉnh sửa đóng vai trò làm đối chứng âm.

Các dòng được hướng đích đúng được xác định thông qua PCR đối với sự cài xen PD-L1 KI và sự cài xen HLA-E KI sử dụng các môi mà khuếch đại vùng từ bên ngoài các nhánh tương đồng plasmit đối với sự cài xen PD-L1 cADN hoặc sự cài xen HLA-E cADN, tương ứng, cho phép sự khuếch đại của chỉ ADN được tích hợp KI. Sự cài xen trúng đích được thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử bằng PCR để đánh giá KI đã xảy ra theo phương thức dị hợp tử hay đồng hợp tử. Nếu dòng vô tính dị hợp tử được xác định, alen âm KI được gửi để giải trình tự Sanger để xác định rằng nó chứa indel làm đứt đoạn B2M hoặc indel làm đứt đoạn TXNIP, tương ứng. Các dòng KI đúng với sự đứt đoạn B2M và TXNIP hoàn toàn (thông qua sự cài xen KI hoặc sự tạo thành indel) được mở rộng trong định dạng nuôi cấy mô tăng dần đến khi đạt đến kích thước quần thể là 30 triệu tế bào. Các dòng vô tính được chọn được mở rộng theo phương thức này và được xác nhận là đa năng bằng cách thử nghiệm đối với OCT4 và SOX2 thông qua việc đếm tế bào theo dòng nội bào.

Bốn dòng vô tính hiPSC được chỉnh sửa (VI-B) được biệt hóa sử dụng quy trình nội tiết tụy của Rezania et al. (Nat Biotechnol. 2014 Nov; 32(11):1121-33). Ở Giai đoạn 4, phân tích đếm tế bào theo dòng cho chromogranin (CHGA), PDX1 và NKX6.1 được thực hiện. Các kết quả đối với PDX1 và NKX6.1 của dòng vô tính (dòng vô tính 1) được cấy ở các mật độ đại diện khác nhau được thể hiện trên Hình **26A**. CHGA là âm tính đối với bốn dòng vô tính. Đếm tế bào theo dòng đối với PD-L1 và HLA-E cũng được thực hiện. Các kết quả đối với PD-L1 và HLA-E của dòng vô tính (dòng vô tính 1) được thể hiện trên Hình **26B**.

Ví dụ 14: Quy trình để sản xuất ngân hàng tế bào Cryo tế bào gốc đa năng người (hPSC) B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI

CyT49 hESC (ViaCyte) được tạo xung điện với phức hợp RNP bao gồm B2M-2 gARN (SEQ ID NO: 2) và protein Cas9 ở tỉ lệ mol là 3:1 (gARN:Cas9) và 4 µg plasmit cho B2M-CAGGS-PD-L1 (SEQ ID NO: 33) đối với 2 xung của 30 mili giây ở 1100 V. Sau khi xung điện, các tế bào được hút bằng pipet ra vào trong ống Eppendorf được nạp môi trường StemFlex với RevitaCell. Sau đó huyền phù tế bào này được cấy vào trong đĩa nuôi cấy mô đã được phủ trước bằng BIOLAMININ 521 CTG ở độ pha loãng 1:20. Các tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂).

Bảy ngày sau khi xung điện, tế bào được làm giàu đối với tế bào dương tính PD-L1 qua MACS sử dụng kháng thể kháng PD-L1 được đánh dấu bằng Alexa-488 và các hạt từ tính (DYNABEADS® Pan Mouse IgG; Thermo Fisher). Tế bào dương tính PD-L1 được nhân rộng bằng cách cấy ở môi trường nhân rộng XF-KSR (Gibco) trong 7 ngày.

Sau đó, tế bào dương tính PD-L1 được tạo xung điện bằng phức hợp RNP bao gồm TXNIP-T5 gARN (SEQ ID NO: 20) và protein Cas9 theo tỉ lệ mol là 3:1 (gARN:Cas9) và 4 µg của plasmit cho TXNIP-CAGGS-HLA-E 2 (SEQ ID NO: 56) đối với 2 xung của 30 mili giây ở 1100 V. Sau khi xung điện, các tế bào được hút bằng pipet ra vào trong ống Eppendorf được nạp môi trường StemFlex với RevitaCell. Sau đó huyền phù tế bào này được cấy vào trong đĩa nuôi cấy mô đã được phủ trước bằng BIOLAMININ 521 CTG ở độ pha loãng 1:20. Các tế bào được nuôi cấy trong tủ ủ có mức oxy bình thường (37°C, 8% CO₂).

Bảy ngày sau khi xung điện, các tế bào được làm giàu đối với các tế bào dương tính HLA-E qua MACS sử dụng kháng thể kháng HLA-E được đánh dấu PE và các hạt từ tính (DYNABEADS® Pan Mouse IgG; Thermo Fisher). Các tế bào dương tính kép PD-L1 và HLA-E được nhân rộng bằng cách nuôi cấy trong môi trường nhân rộng XF-KSR (Gibco) trong khoảng 5 ngày.

Các tế bào dương tính kép PD-L1 và HLA-E được phân loại tế bào đơn. Đối với điều này, các tế bào được cấy StemFlex Complete với Revitacell (nồng độ cuối là 1X Revitacell) 3-4 giờ trước khi phân ly bằng ACCUTASE®. Sau khi phân ly, tế bào đơn được sắp xếp vào các giếng đơn của đĩa nuôi cấy mô 96 giếng được phủ BIOLAMININ.

Máy phân loại WOLF FACS (Nanocollect) được sử dụng để sắp xếp các tế bào đơn vào trong các giếng bằng cách sử dụng các kháng thể kháng PD-L1 và kháng thể kháng HLA-E được mô tả trên đây. Các đĩa này được nạp trước bằng 100-200 μ l StemFlex Complete với Revitacell. Ba ngày sau khi cấy tế bào, tế bào được cấp StemFlex mới và tiếp tục được cấp hai ngày một lần bằng 100-200 μ l môi trường. Sau khi sinh trưởng 10 ngày, tế bào được cho ăn hàng ngày bằng StemFlex đến ngày 12-14. Ở thời gian này, các đĩa được phân ly bằng ACCUTASE® và các huyền phù tế bào được thu gom được chia 1:2 vào hai đĩa 96 giếng, mà được nuôi cấy trong khoảng 4 ngày.

Một phần các tế bào được thu hoạch để phân tích bằng mắt thường (hình thái học) và phân tích ADN (PCR và giải trình tự ADN cho phân tích sự tiếp hợp giao tử và đặc điểm indel), và phần còn lại của tế bào được nuôi cấy và được nhân rộng để nuôi cấy trong các bình T175. Sau khoảng hai tuần nuôi cấy, các dòng vô tính được chọn lọc cho việc làm đông lạnh. Các tế bào được phân tích đặc điểm trước và sau khi đông lạnh đối với hình thái học, khả năng sống, nội độc tố, mycoplasma, kiểu nhân, tính đa năng, khả năng biệt hóa, phân tích trứng đích/ngoài đích, sự tích hợp plasmit ngẫu nhiên, Cas9/plasmit dư sử dụng các quy trình chuẩn. Các tế bào được đông khô trong môi trường cryo và được phân loại trong các lọ cryo ở -80 °C hoặc nitơ lỏng.

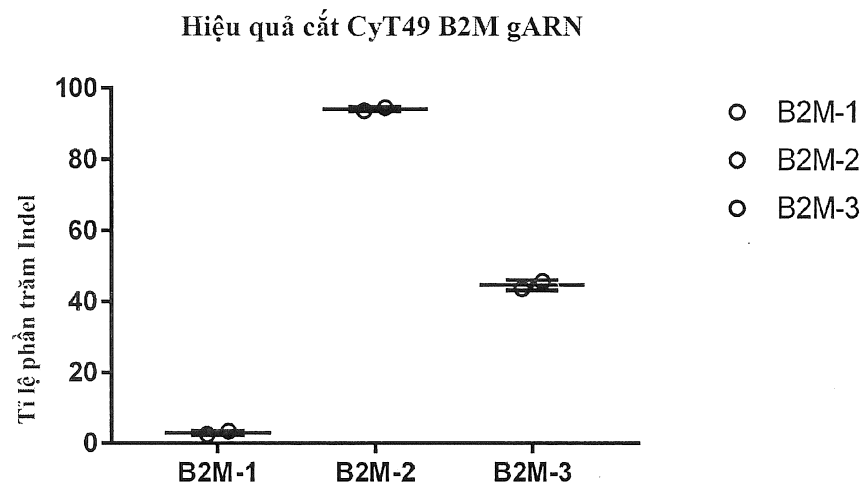
Dòng vô tính B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI cụ thể (“dòng vô tính giống”) được sản xuất và được phân lập bằng quy trình đã nêu. Các dòng vô tính giống được biệt hóa đến giai đoạn PEC và được phân tích đặc điểm. Hình **27A** thể hiện hình thái học của dòng vô tính giống ở giai đoạn PEC là tương tự với tế bào kiểu đại. Hình **27B** thể hiện kiểu biểu hiện động lực của *FOXA2*, *CHGA*, *PDX1* và *NKX6.1* trong khoảng thời gian biệt hóa ở tế bào được biệt hóa từ dòng vô tính giống là tương tự với tế bào kiểu đại. Hình **27C** thể hiện tỉ lệ phần trăm của các tế bào *CHGA*⁻/*NKX6.1*⁺/*PDX1*⁺ ở quần thể được biệt hóa.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào biến đổi gen chứa trình tự nucleotit mã hóa mạch E alpha của kháng nguyên tương hợp mô thuộc HLA nhóm 1 (HLA-E) được chèn vào trong gen mã hóa protein tương tác thioredoxin (TXNIP), trong đó tế bào biến đổi gen này biểu hiện HLA-E và không biểu hiện TXNIP.
2. Tế bào biến đổi gen theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E chứa trình tự mã hóa trime HLA-E chứa peptit tín hiệu B2M được dung hợp với peptit trình diện HLA-G được dung hợp với protein màng B2M được dung hợp với HLA-E mà không có peptit tín hiệu của nó.
3. Tế bào biến đổi gen theo điểm 2, trong đó trình tự mã hóa trime HLA-E về cơ bản gồm SEQ ID NO: 55.
4. Tế bào biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó trình tự nucleotit mã hóa HLA-E được liên kết hoạt động với gen khởi đầu ngoại sinh.
5. Tế bào biến đổi gen theo điểm 4, trong đó gen khởi đầu ngoại sinh là gen khởi đầu CAG.
6. Tế bào biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó tế bào này là tế bào gốc.
7. Tế bào biến đổi gen theo điểm 6, trong đó tế bào gốc là tế bào gốc phôi, tế bào gốc của cá thể trưởng thành, tế bào gốc đa năng được cảm ứng, hoặc tế bào gốc tạo huyết.
8. Tế bào biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó tế bào này là tế bào được biệt hóa hoặc tế bào soma.
9. Tế bào biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó tế bào này có khả năng được biệt hóa thành tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn.
10. Tế bào biến đổi gen theo điểm 9, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, tiền thân nội bì tuyến tụy, hoặc tiền thân nội tiết tuyến tụy, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta chưa trưởng thành hoặc tế bào beta trưởng thành.

11. Cụm tế bào biến đổi gen như được xác định theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.
12. Cụm tế bào biến đổi gen theo điểm 11, trong đó khoảng 50% tế bào biểu hiện HLA-E.
13. Cụm tế bào biến đổi gen theo điểm 11, trong đó khoảng 70% tế bào biểu hiện HLA-E.
14. Cụm tế bào biến đổi gen theo điểm 11, trong đó khoảng 90% tế bào biểu hiện HLA-E.
15. Quần thể tế bào tiền thân được giới hạn dòng hoặc tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn thu được từ cụm tế bào biến đổi gen theo điểm 11.
16. Quần thể tế bào theo điểm 15, trong đó tế bào tiền thân được giới hạn dòng là tế bào nội bì xác định, tế bào ống ruột nguyên thủy, tế bào ruột trước sau, tiền thân nội bì tuyến tụy, tiền thân nội tiết tuyến tụy, và tế bào soma được biệt hóa hoàn toàn là tế bào beta chưa trưởng thành hoặc tế bào beta đã trưởng thành.
17. Quần thể tế bào theo điểm 15 hoặc điểm 16, trong đó ít nhất khoảng 50% số tế bào biểu hiện HLA-E.
18. Quần thể tế bào theo điểm 15 hoặc điểm 16, trong đó ít nhất khoảng 70% số tế bào biểu hiện HLA-E.
19. Quần thể tế bào theo điểm 15 hoặc điểm 16, trong đó ít nhất khoảng 90% số tế bào biểu hiện HLA-E.

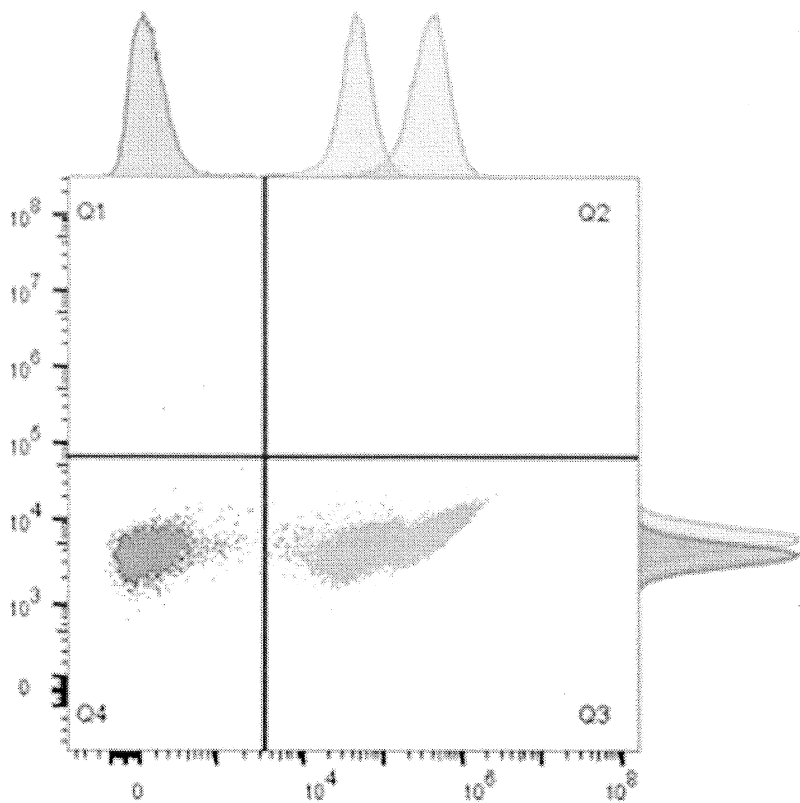
1/42



HÌNH 1

2/42

CYT49 WT BIO-1



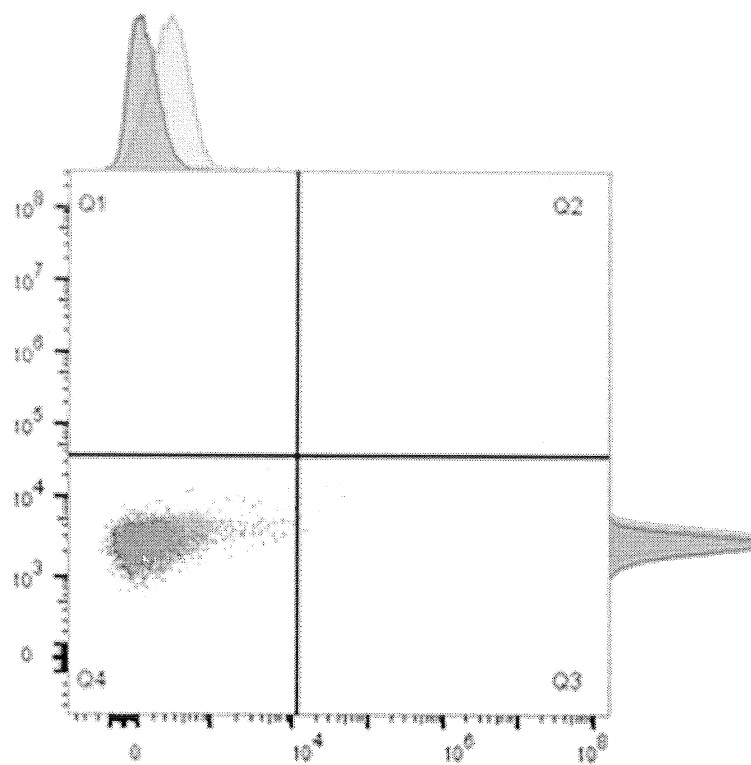
Sự biểu hiện B2M

	Chú thích vùng làm việc
	Đối chứng IGG
	50ng INTG-1
	NT-1

HÌNH 2A

3/42

B2M-KO-1 BIO-1

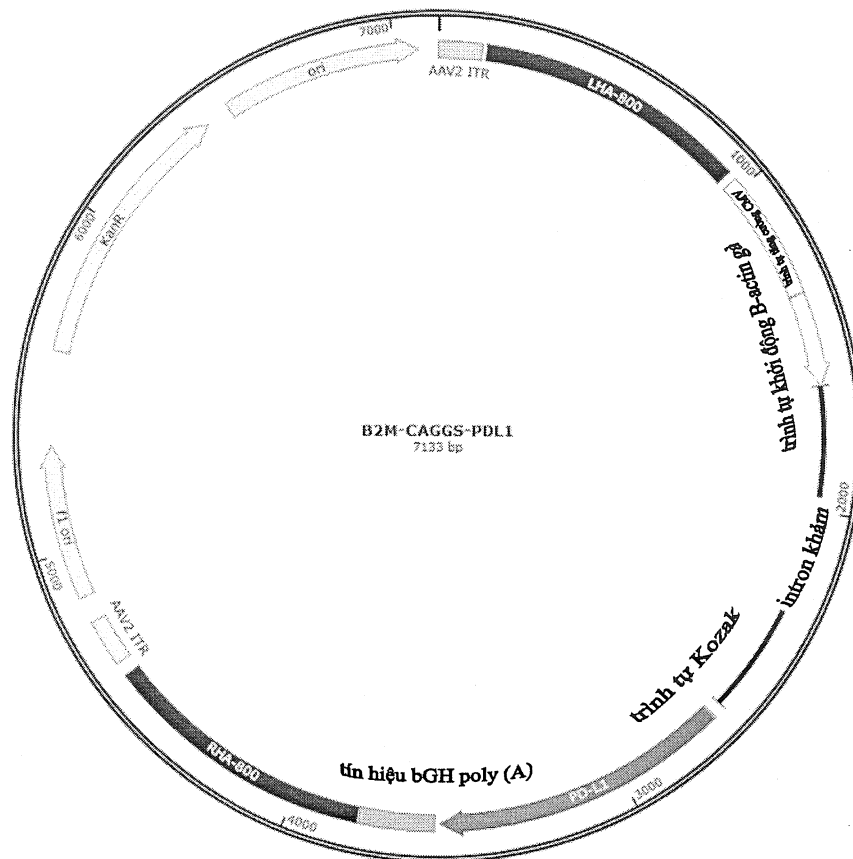


Sự biểu hiện B2M

	Chủ thích vùng làm việc
	Đối chứng IGG
	50ng INTG-1
	NT-1

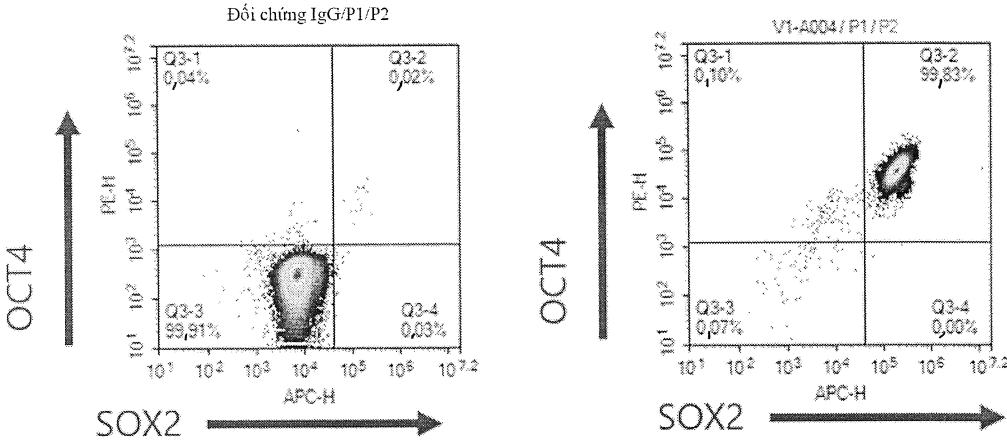
HÌNH 2B

4/42



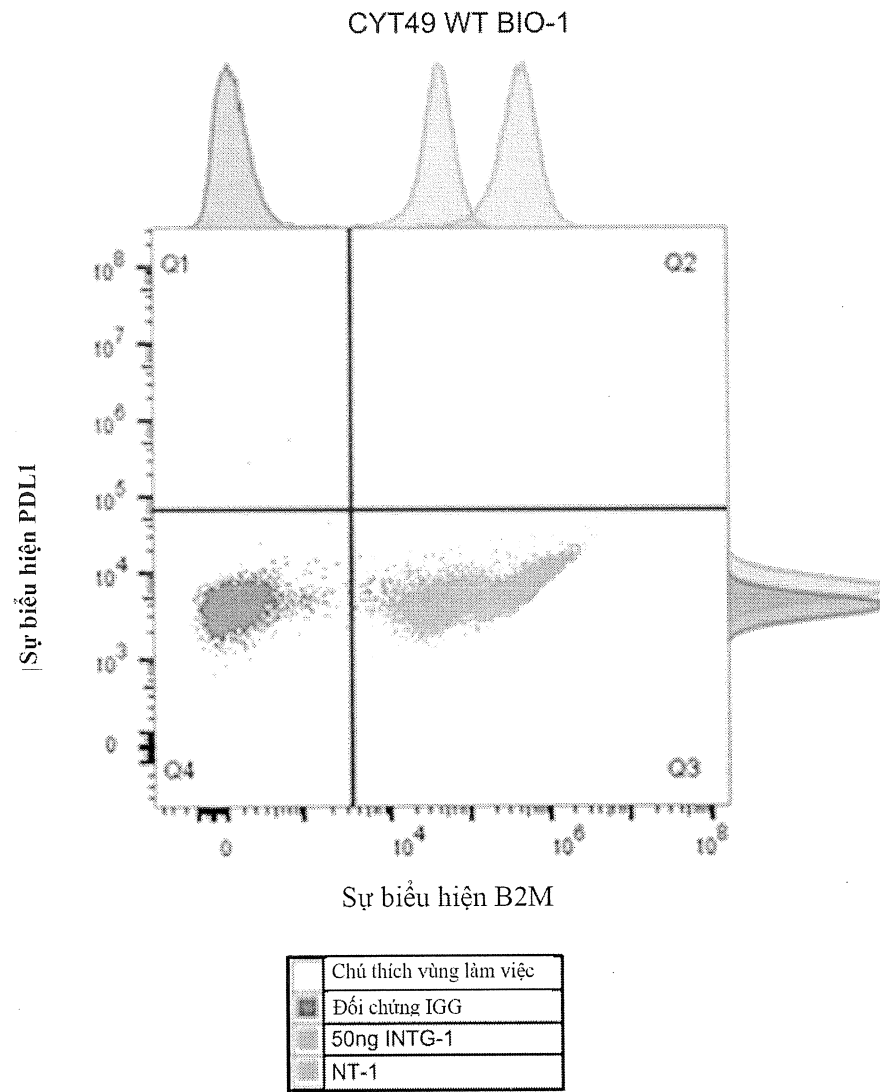
HÌNH 3

5/42



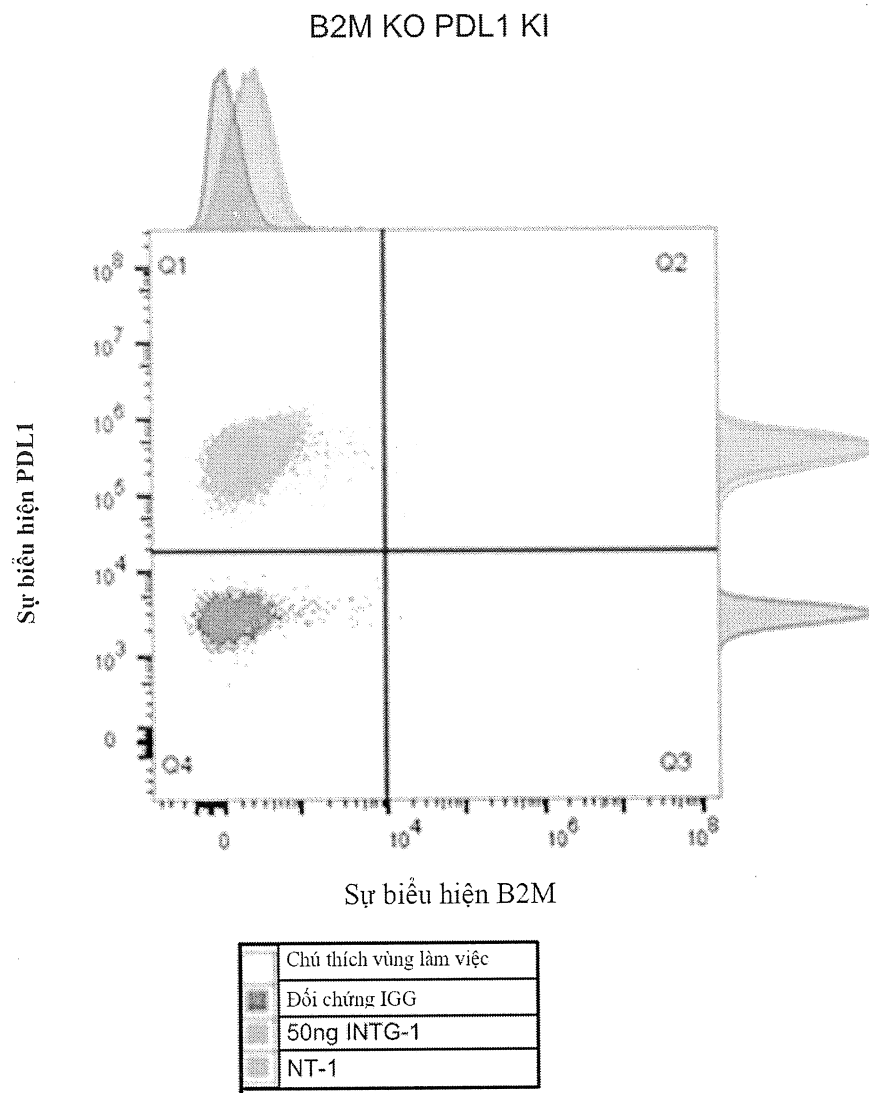
HÌNH 4

6/42



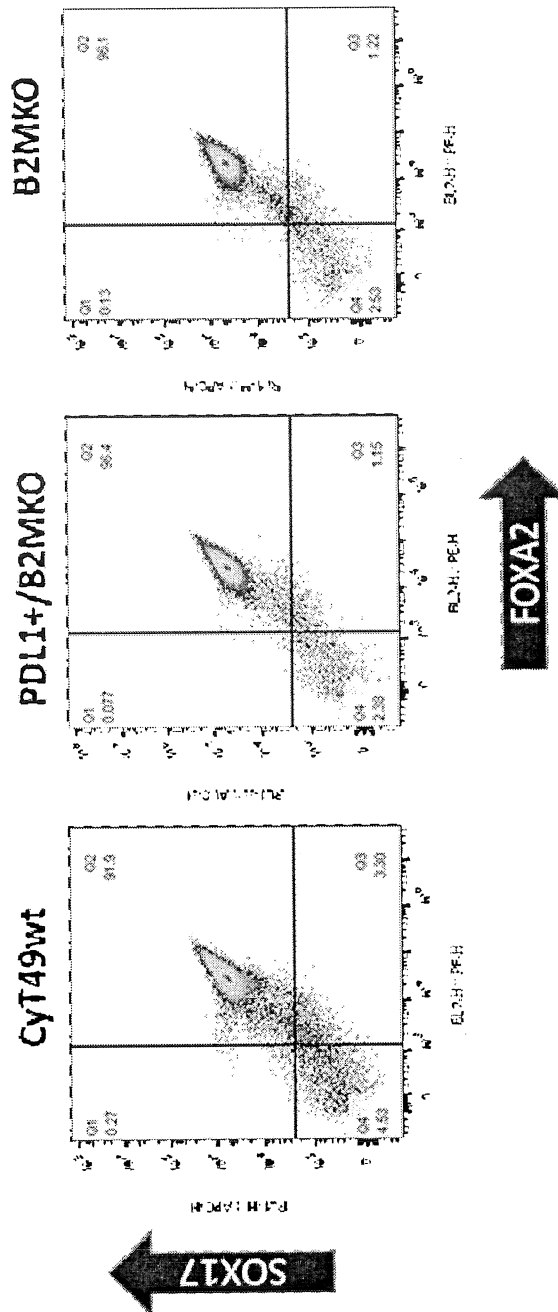
HÌNH 5A

7/42



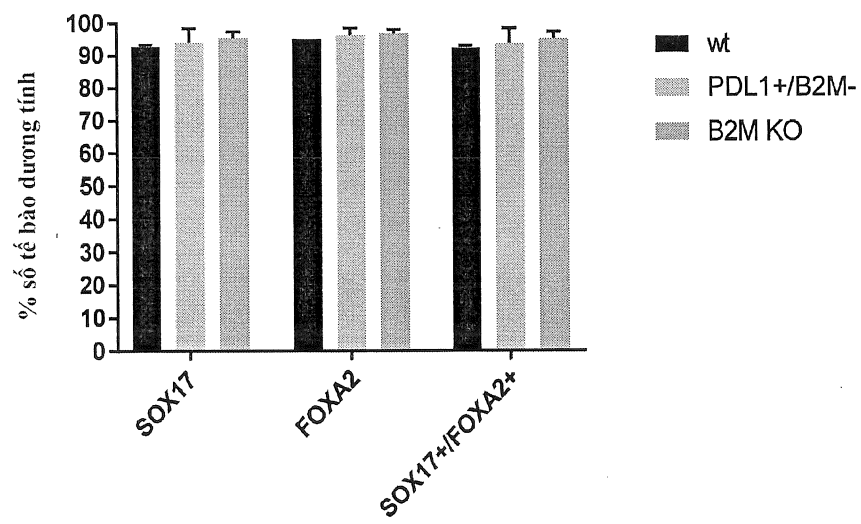
HÌNH 5B

8/42

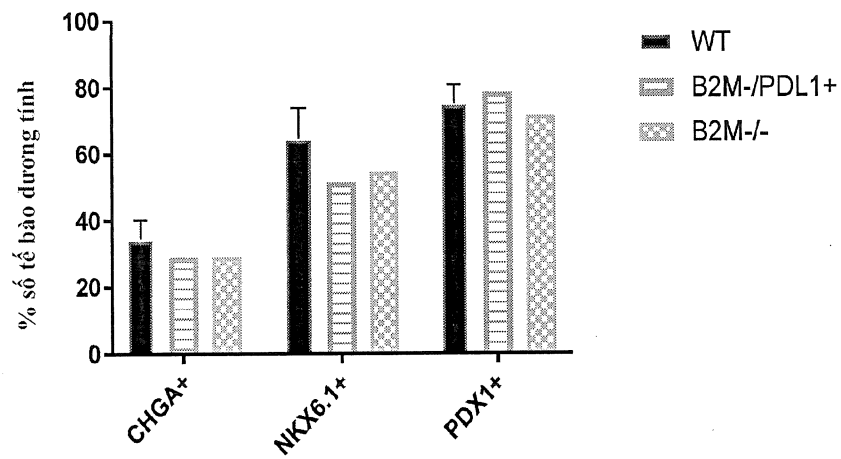


HÌNH 6

9/42

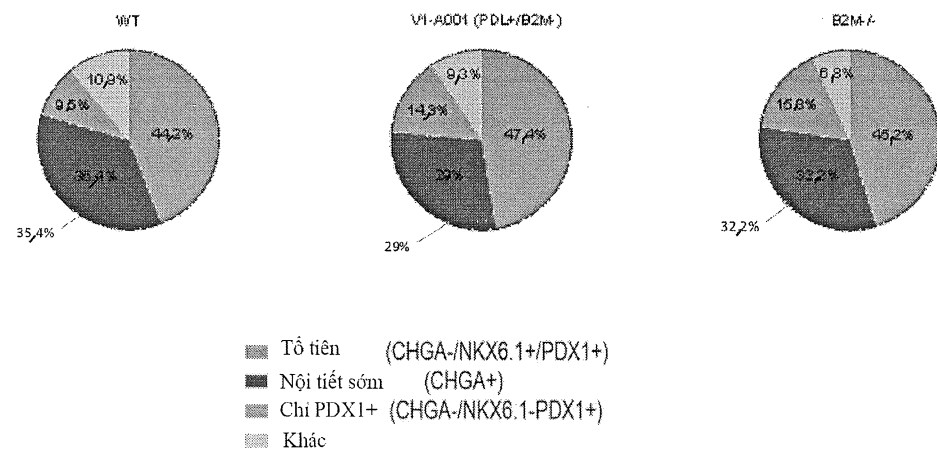


HÌNH 7



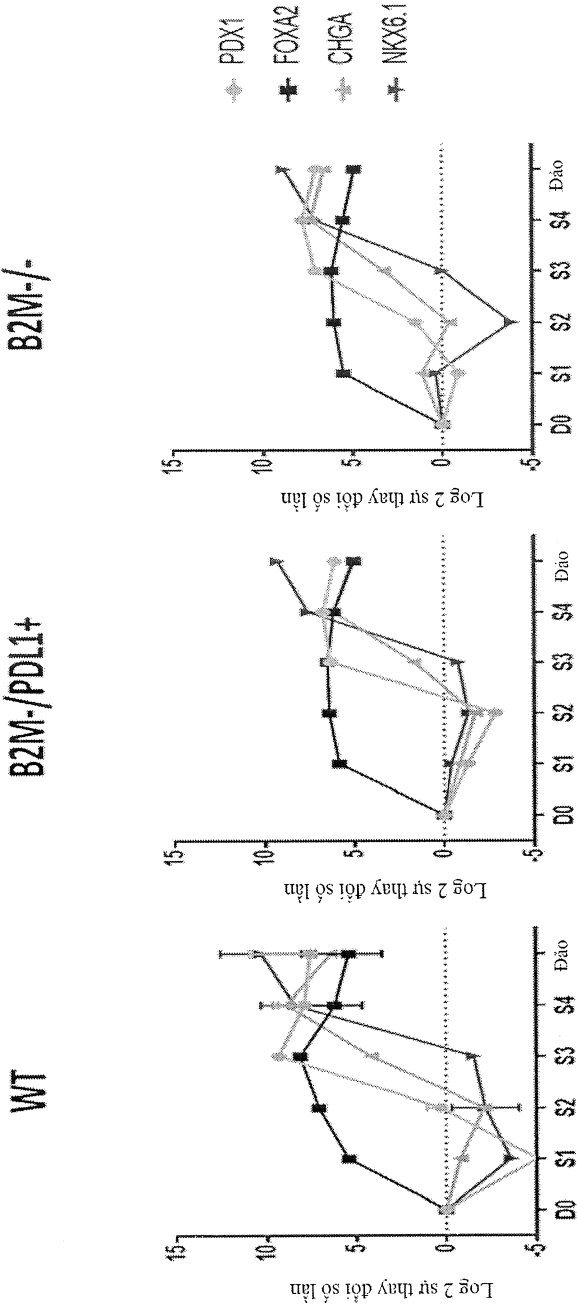
HÌNH 8

10/42



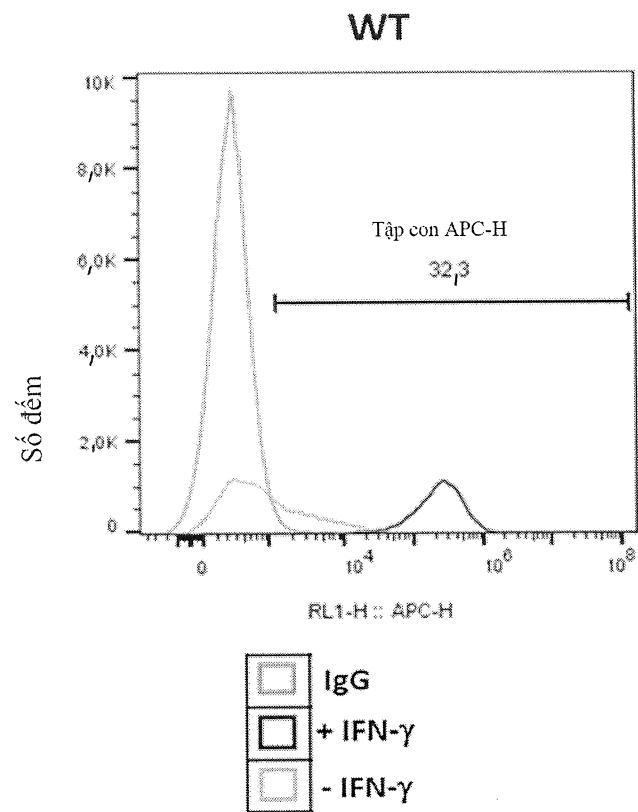
HÌNH 9

11/42



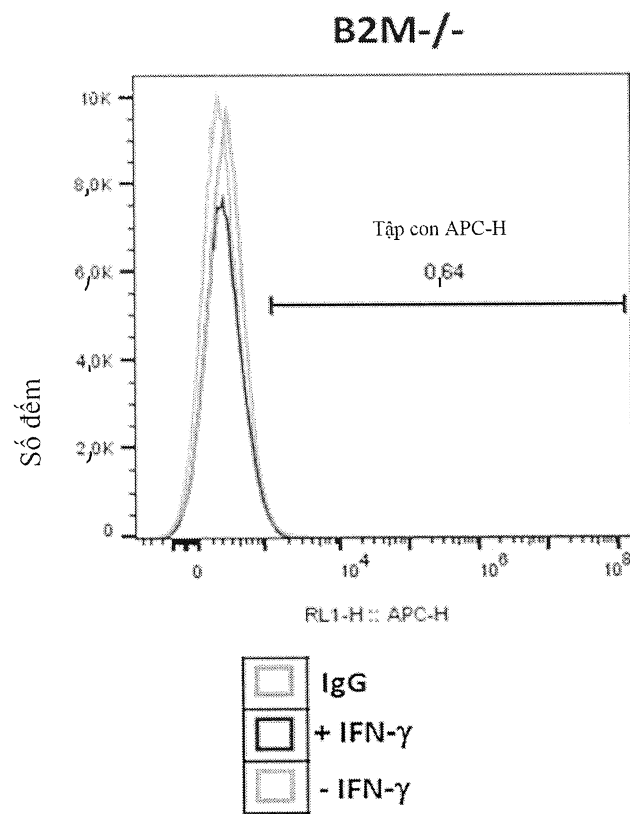
HÌNH 10

12/42



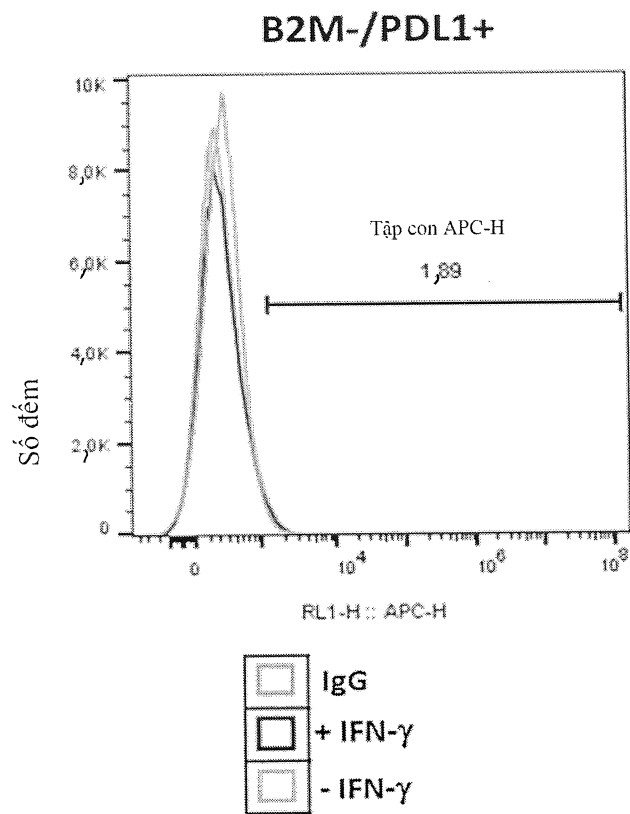
HÌNH 11A

13/42



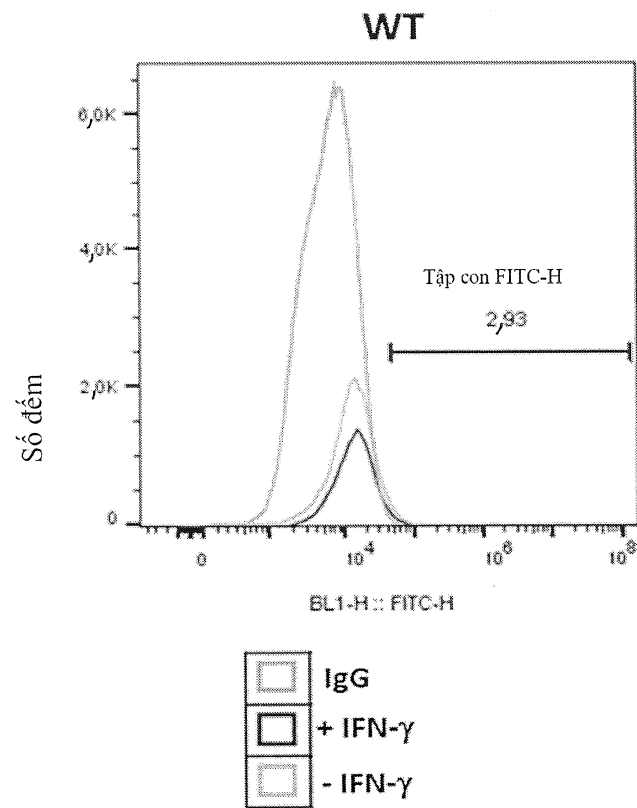
HÌNH 11B

14/42



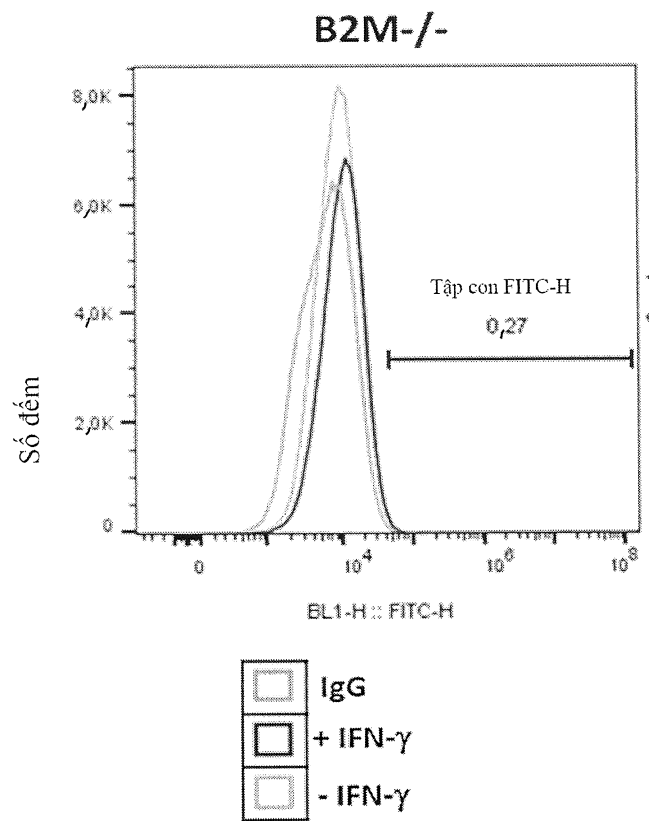
HÌNH 11C

15/42



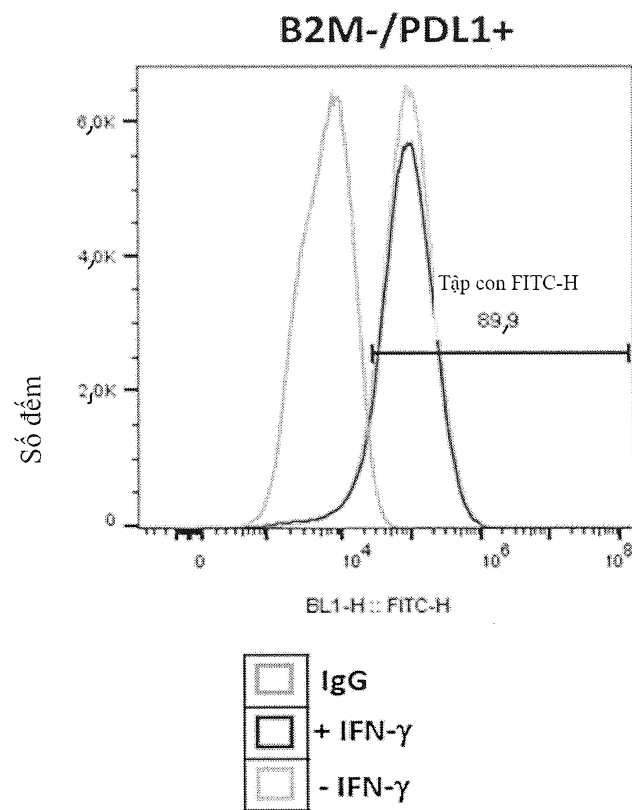
HÌNH 11D

16/42



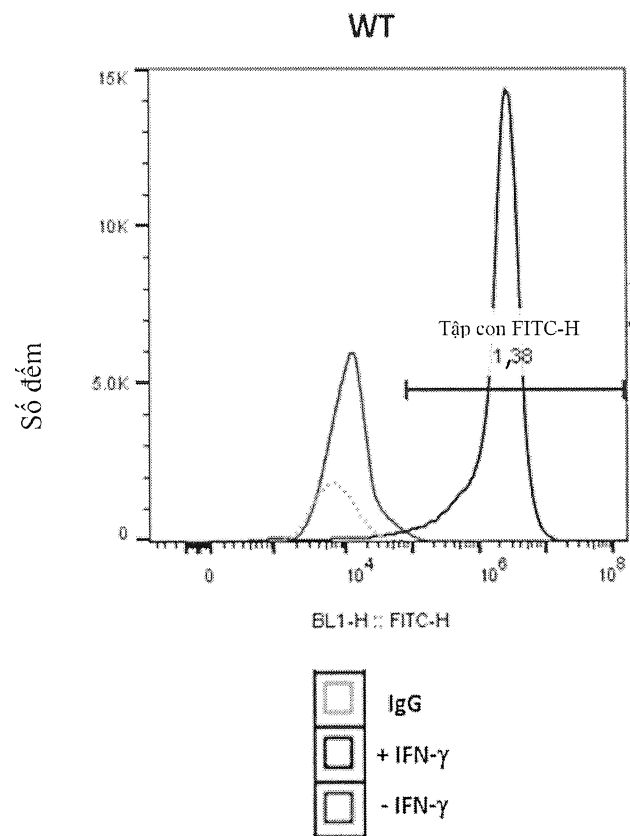
HÌNH 11E

17/42



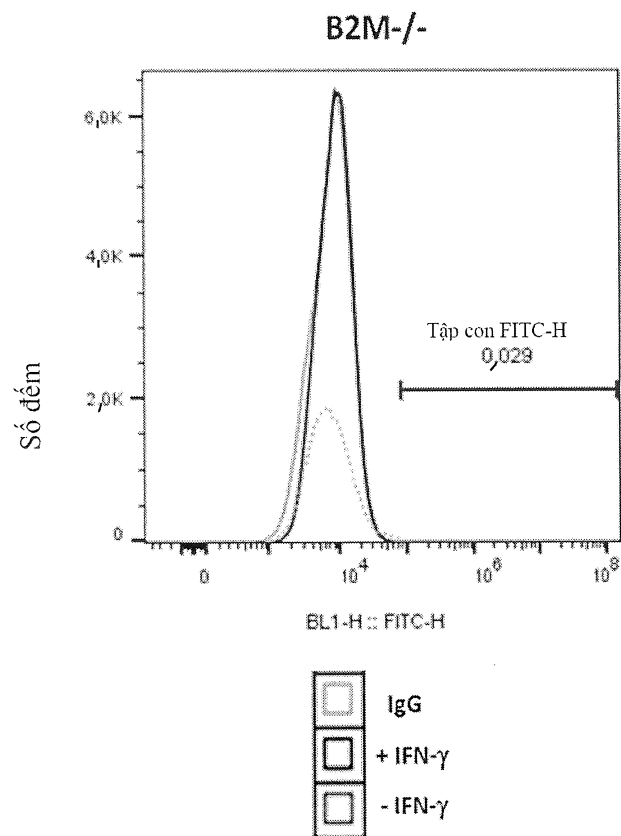
HÌNH 11F

18/42



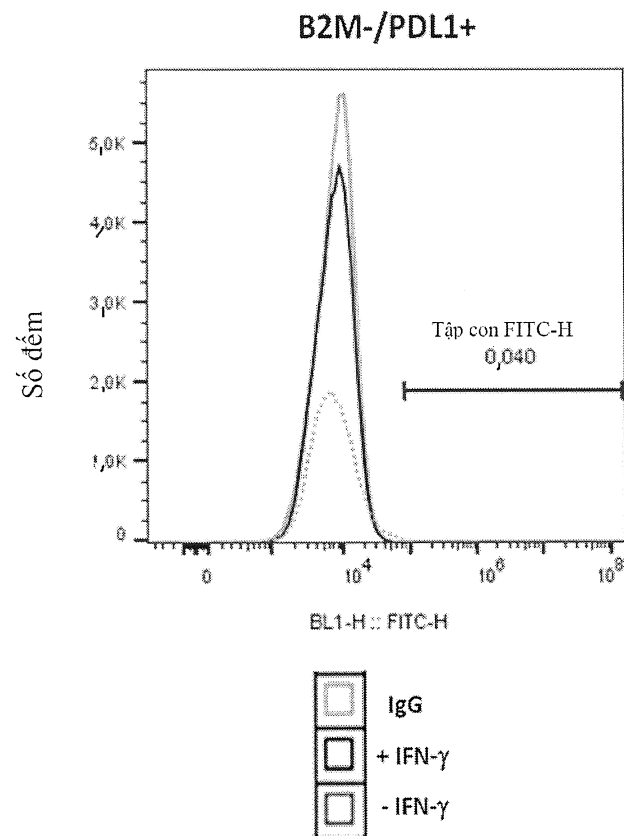
HÌNH 12A

19/42



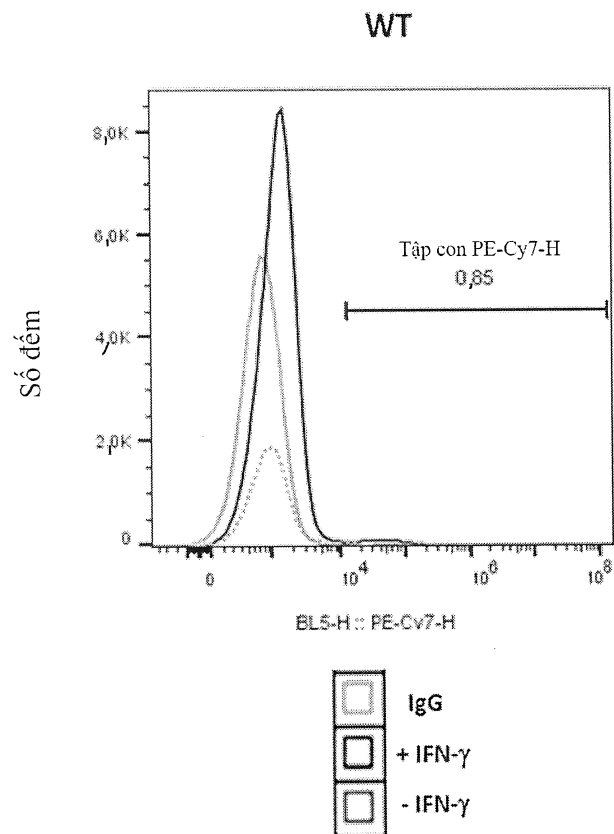
HÌNH 12B

20/42



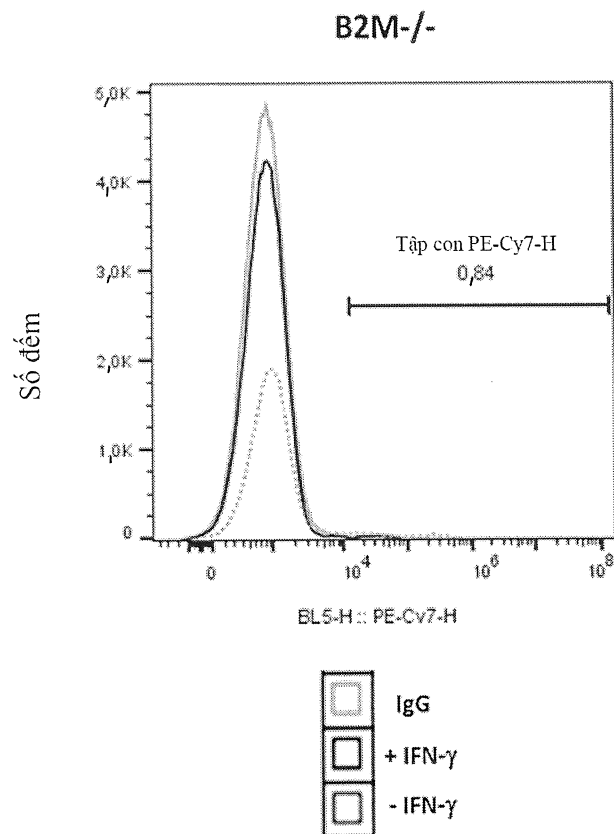
HÌNH 12C

21/42



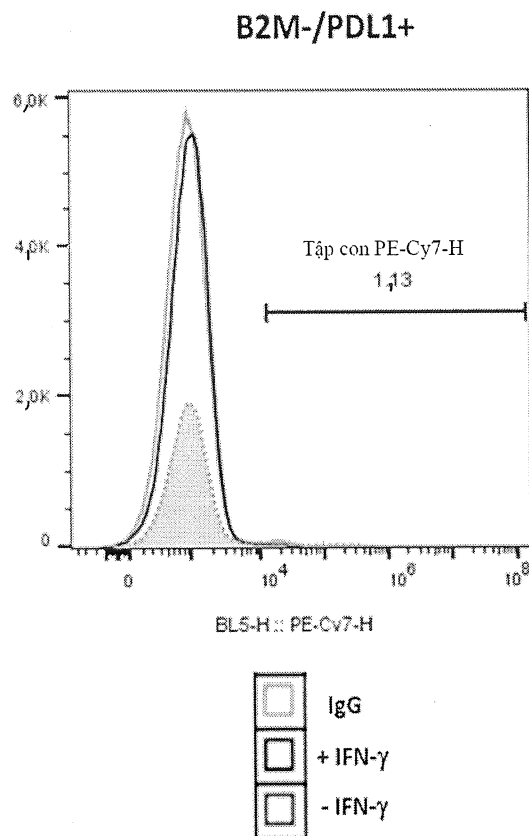
HÌNH 12D

22/42



HÌNH 12E

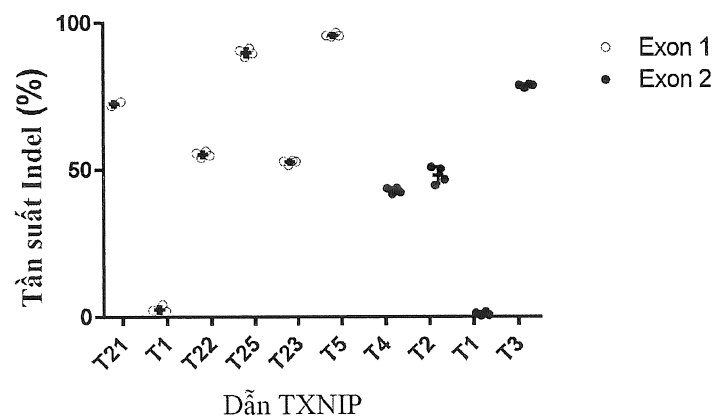
23/42



HÌNH 12F

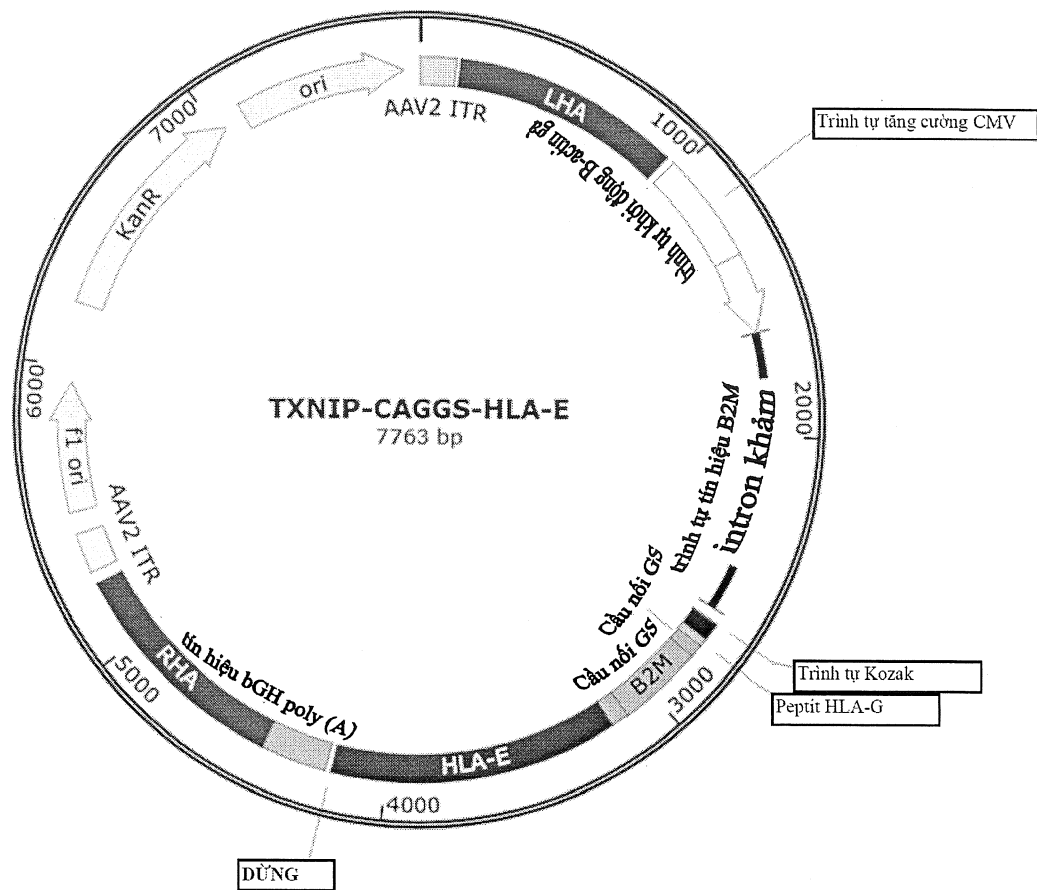
24/42

Sàng lọc trình tự dẫn tổng hợp TXNIP đối với Exon 1 và 2



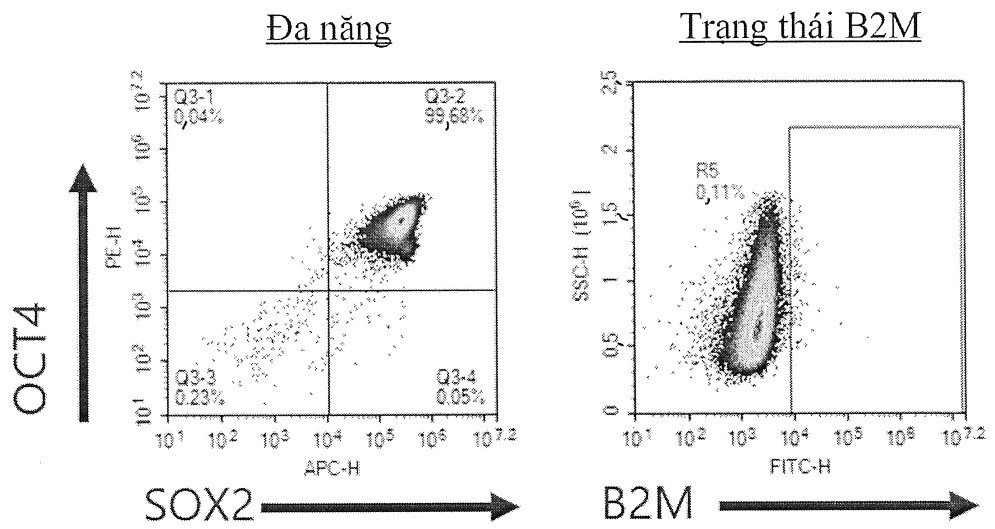
HÌNH 13

25/42



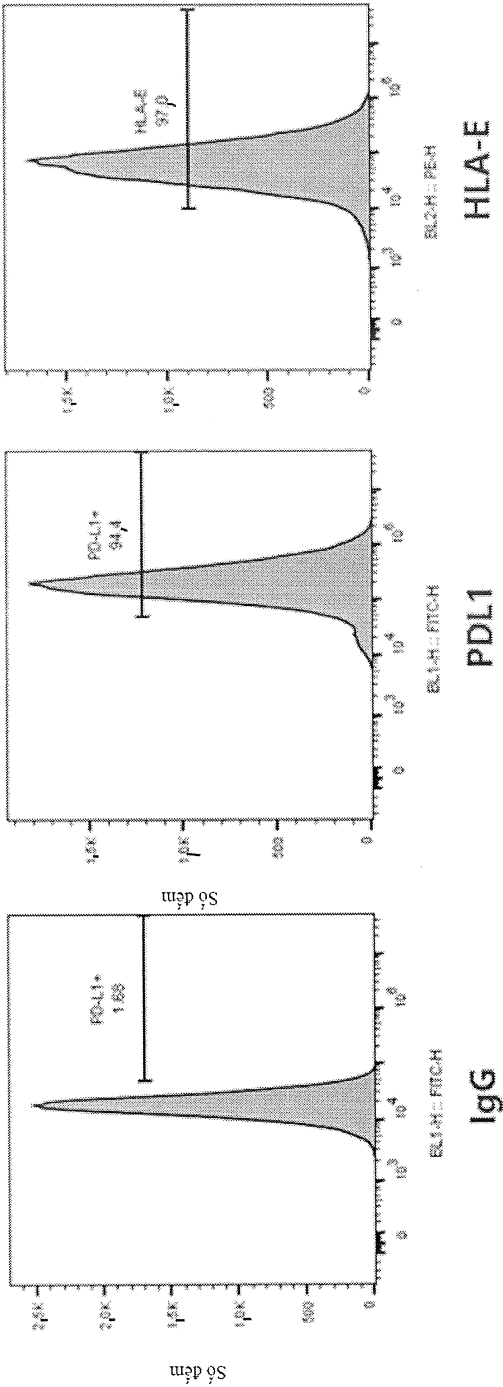
HÌNH 14

26/42



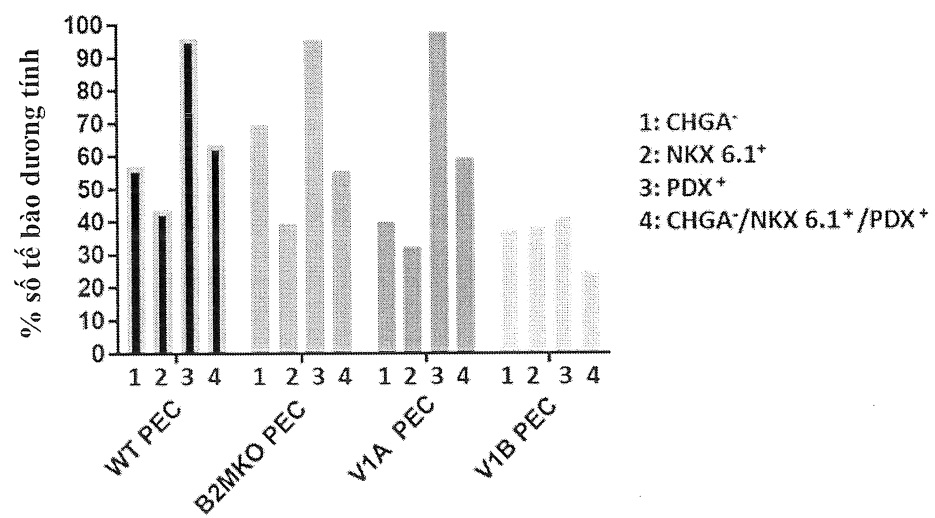
HÌNH 15

27/42



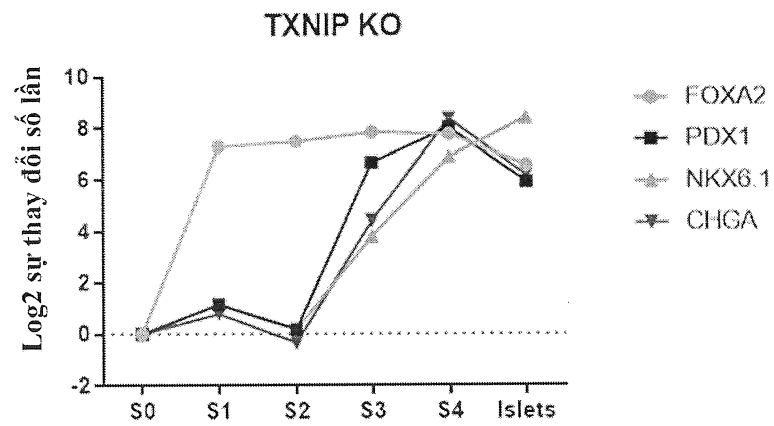
HÌNH 16

28/42

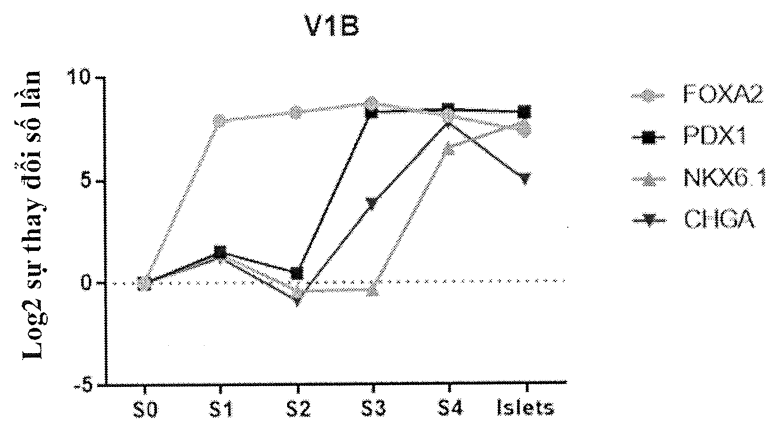


HÌNH 17

29/42

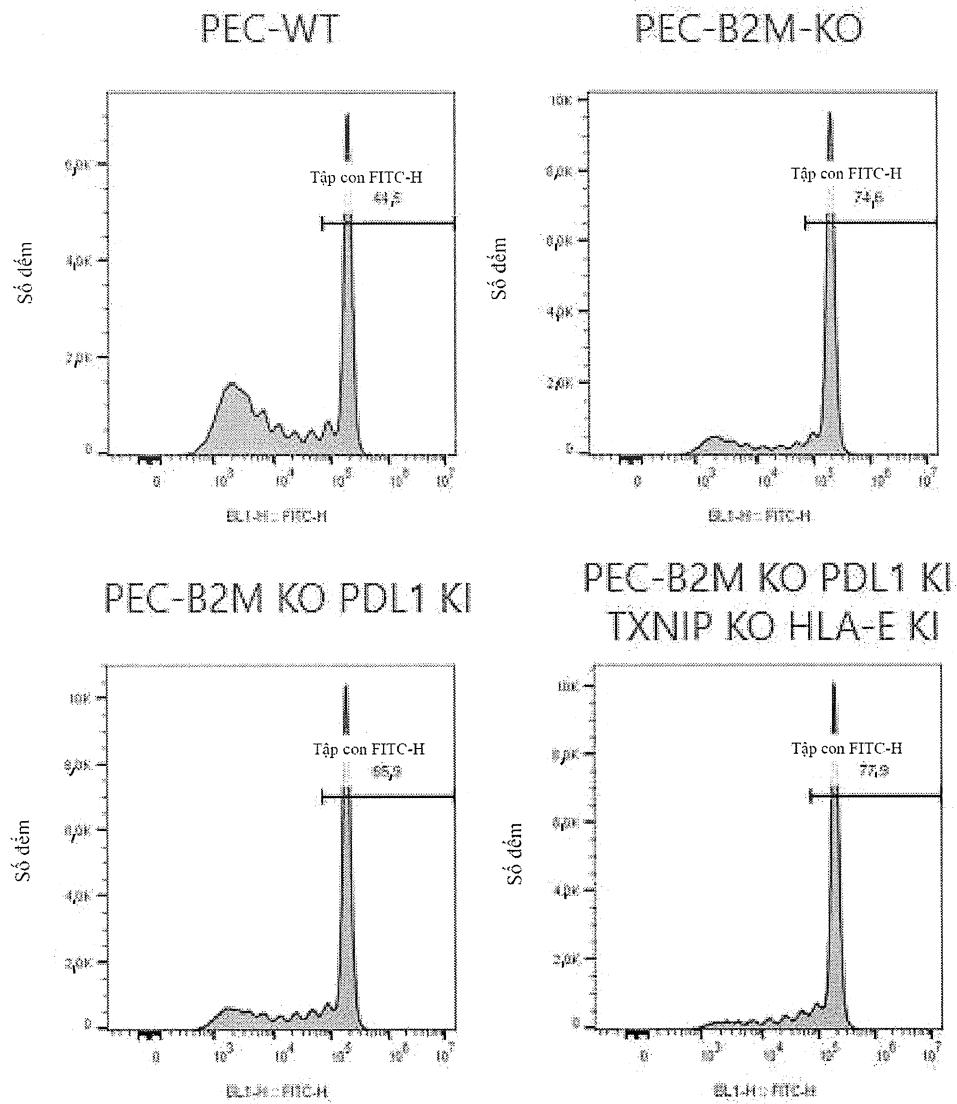


HÌNH 18A



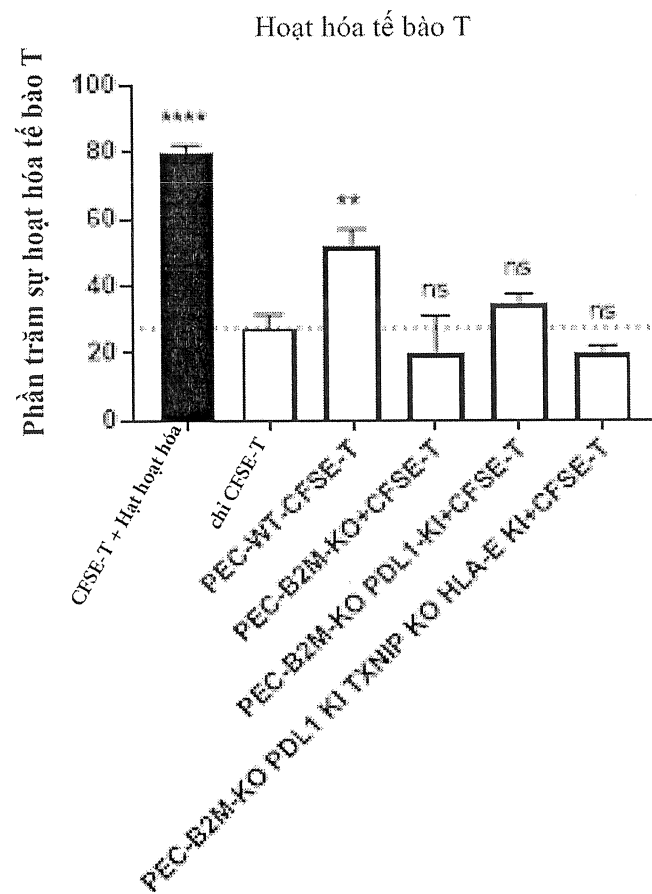
HÌNH 18B

30/42



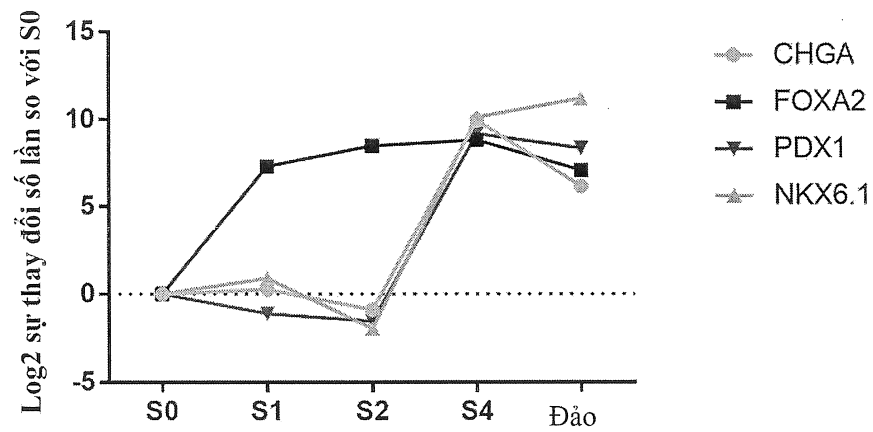
HÌNH 19A

31/42

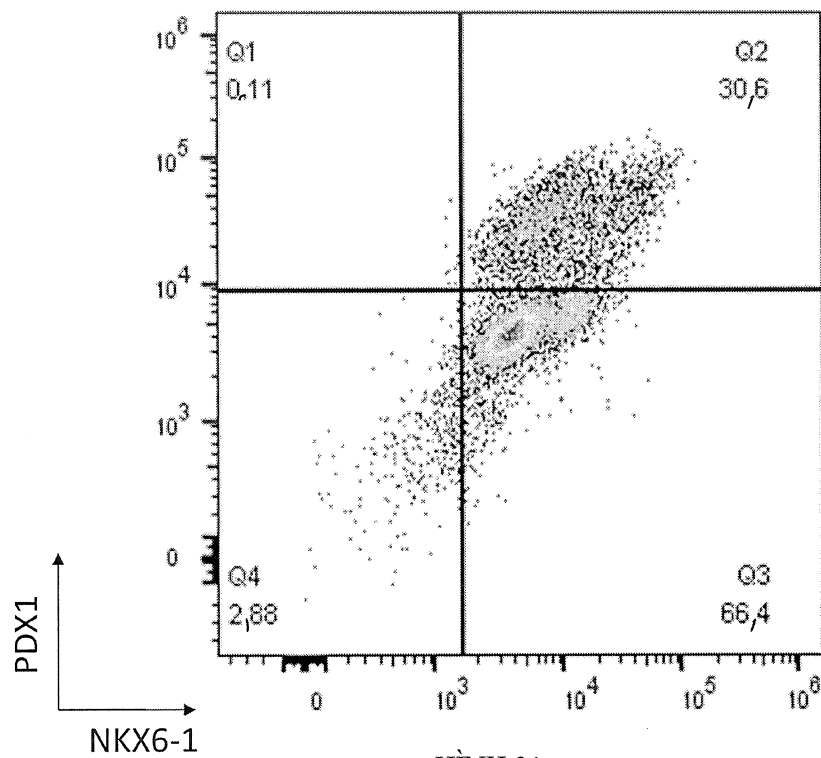


HÌNH 19B

32/42

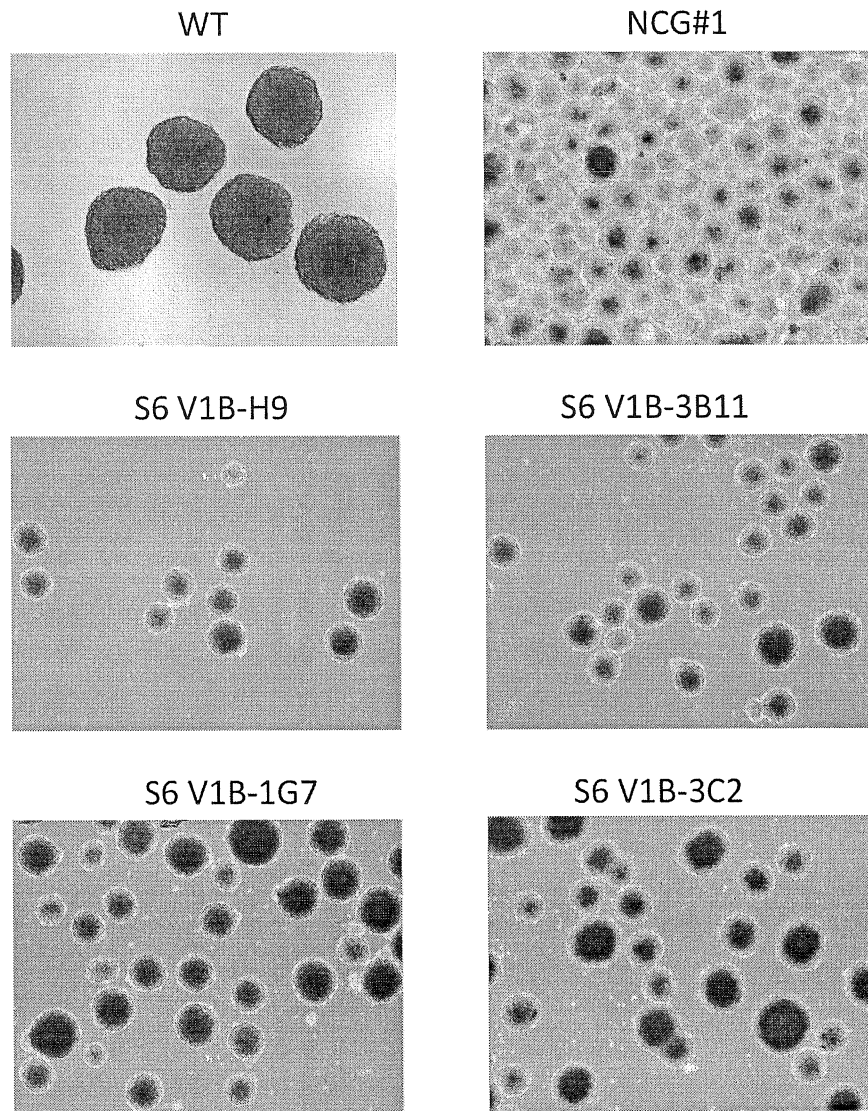


HÌNH 20



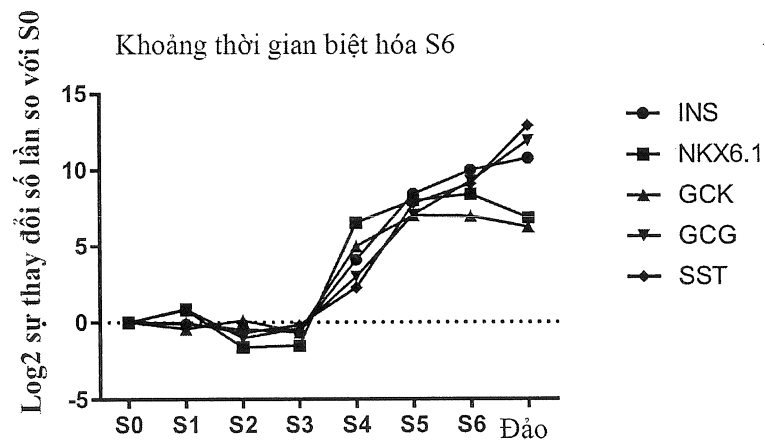
HÌNH 21

33/42

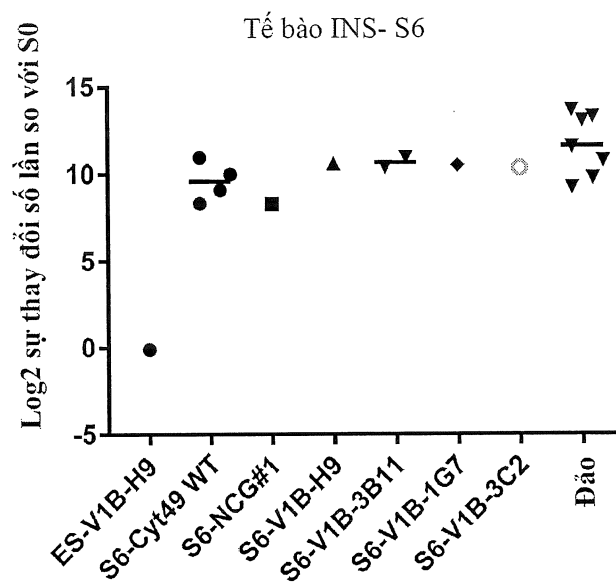


HÌNH 22

34/42



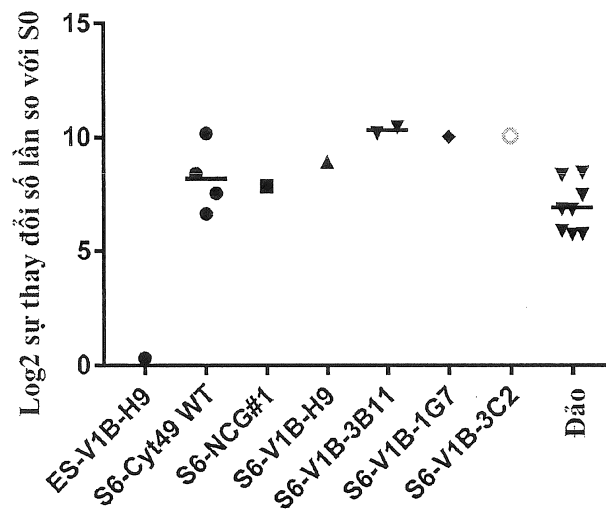
HÌNH 23A



HÌNH 23B

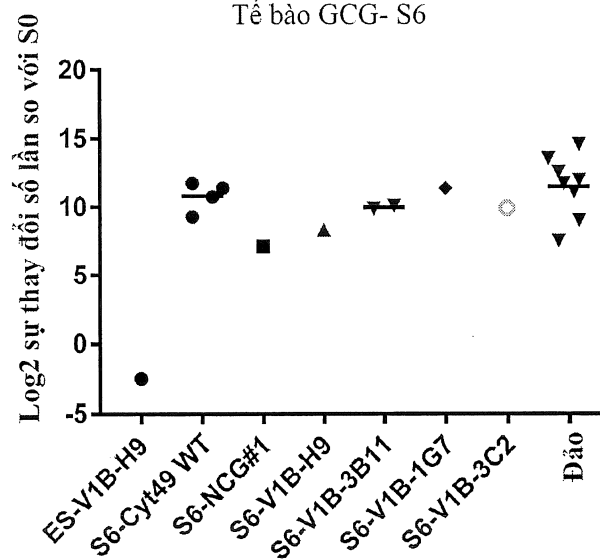
35/42

Tế bào NKX6.1- S6



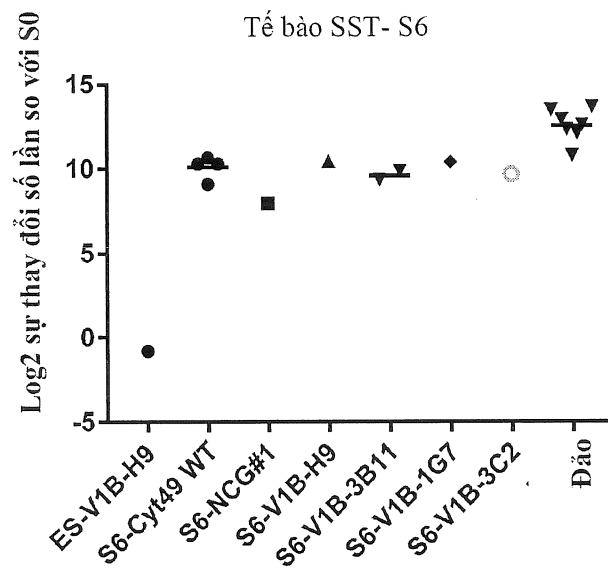
HÌNH 23C

Tế bào GCG- S6

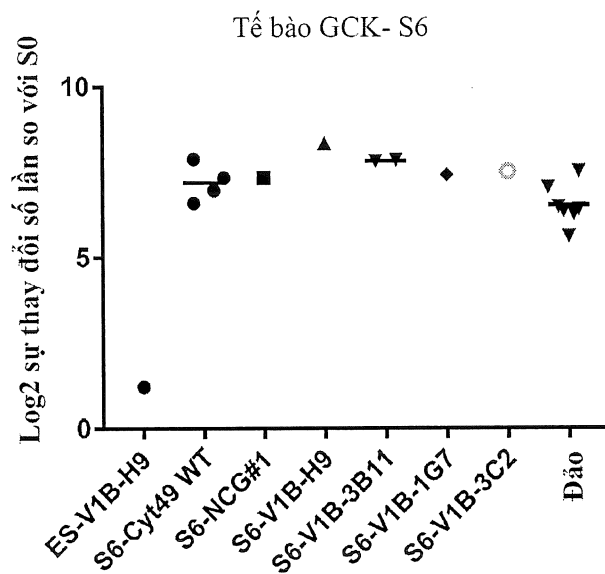


HÌNH 23D

36/42

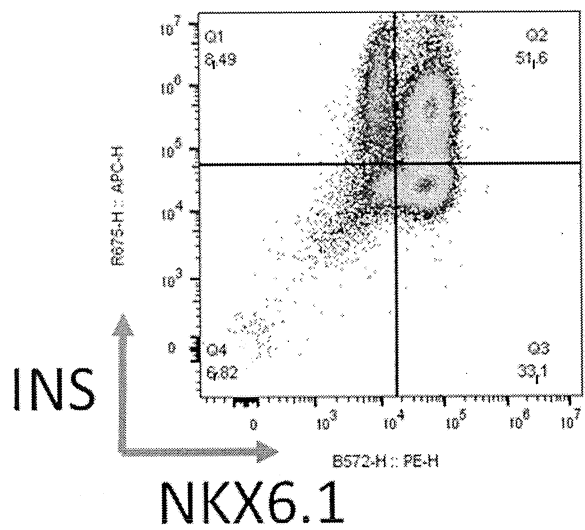
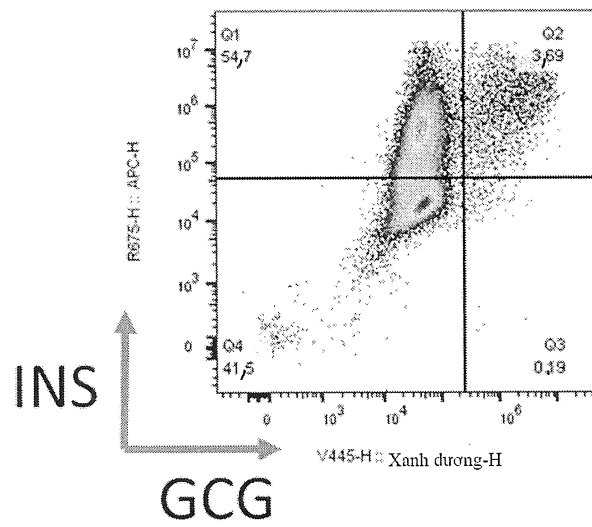


HÌNH 23E

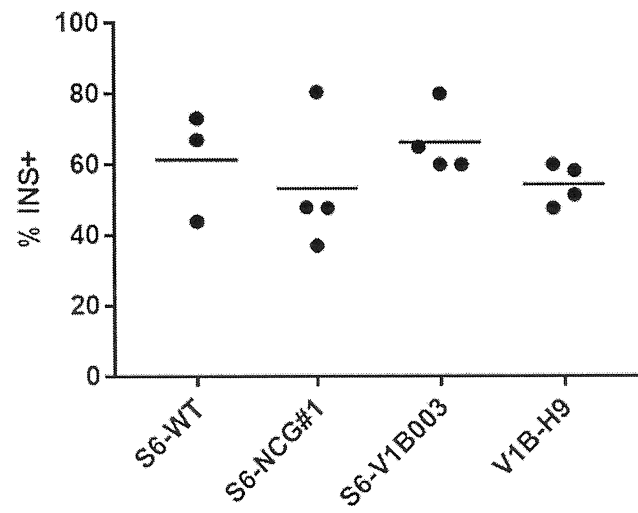


HÌNH 23F

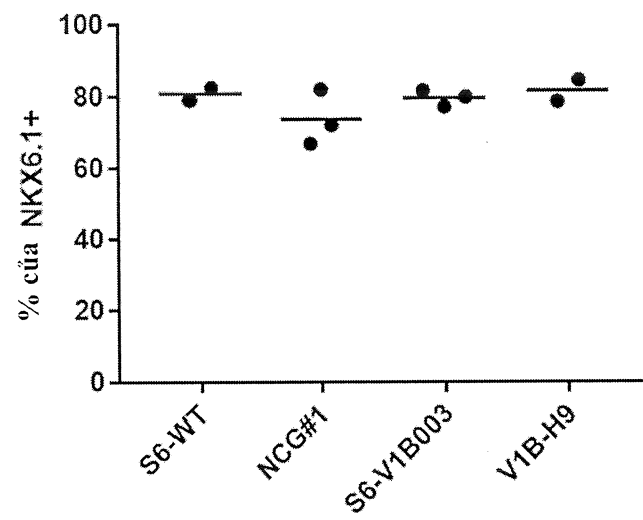
37/42



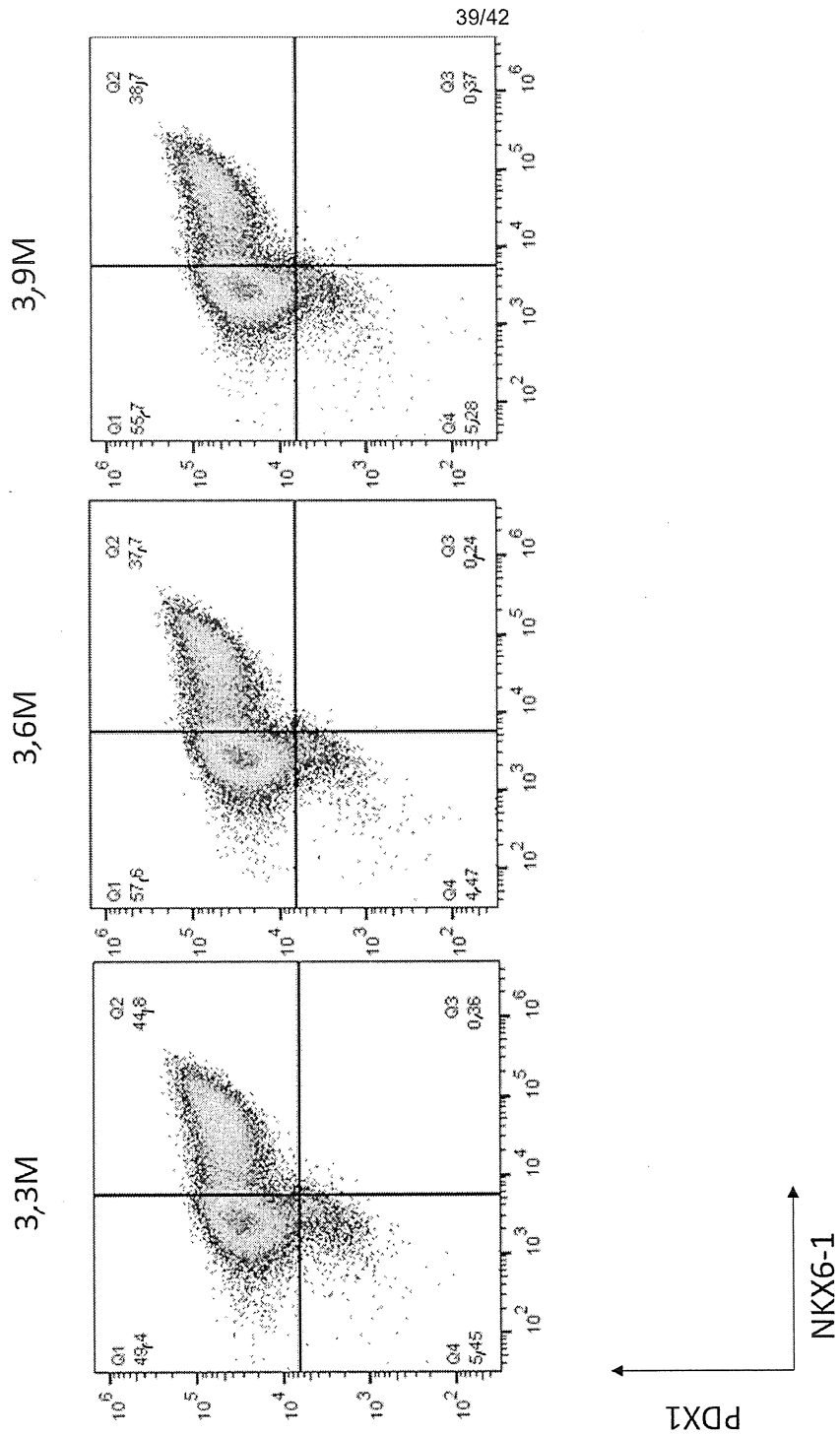
38/42



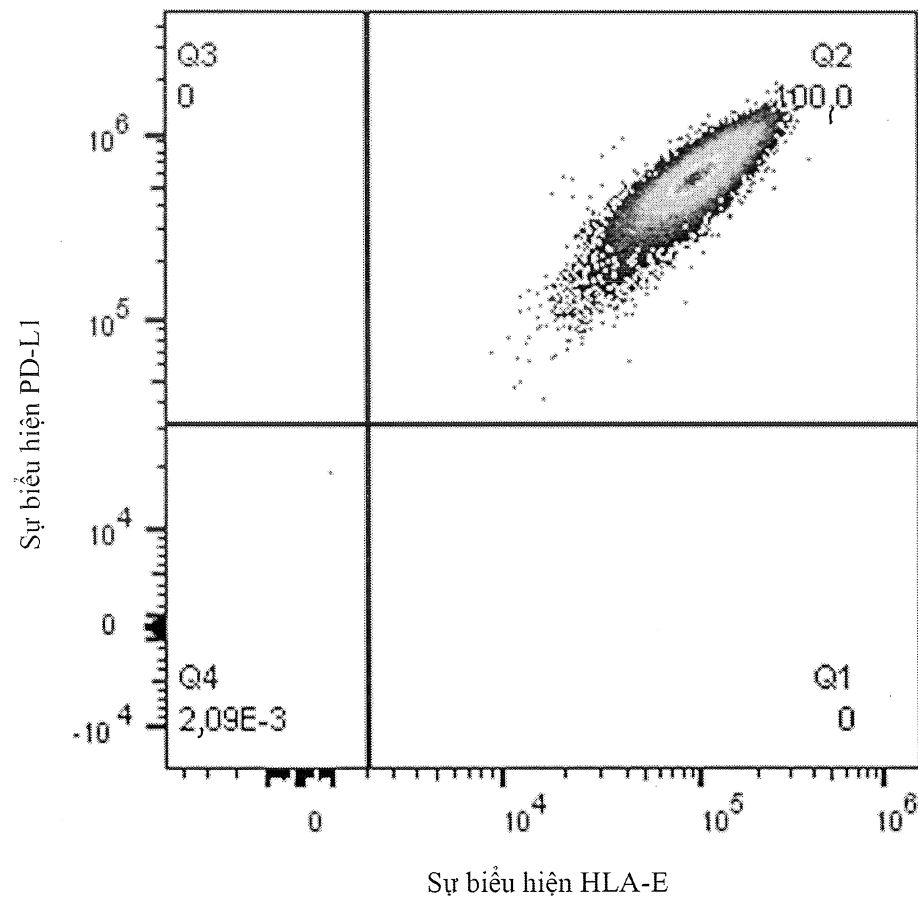
HÌNH 25A



HÌNH 25B



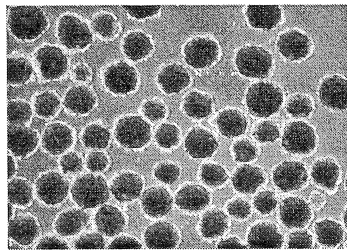
40/42



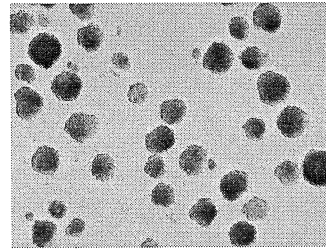
HÌNH 26B

41/42

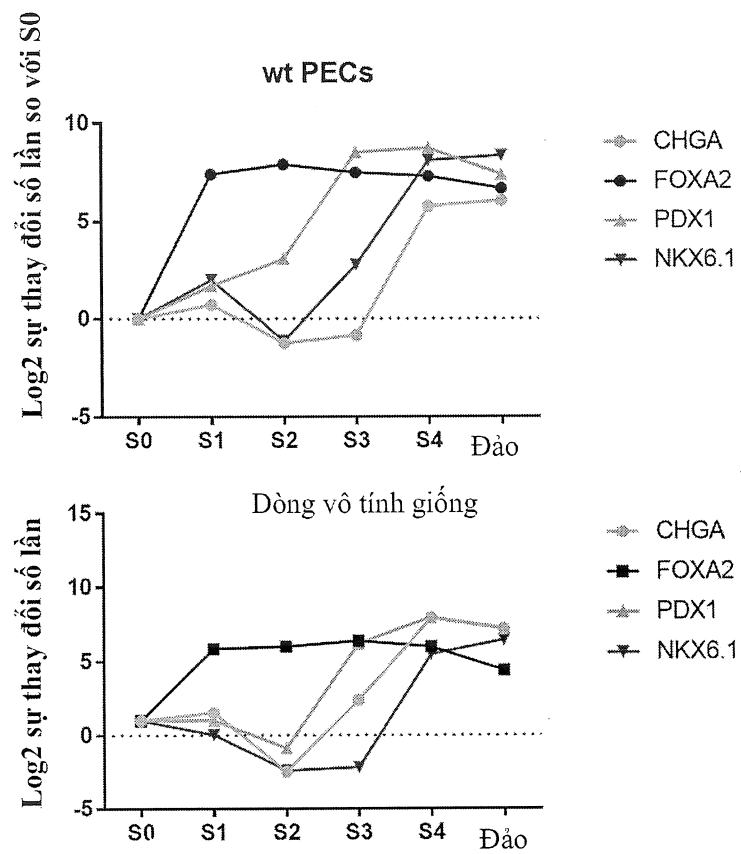
wt PECs



Dòng vô tính giống

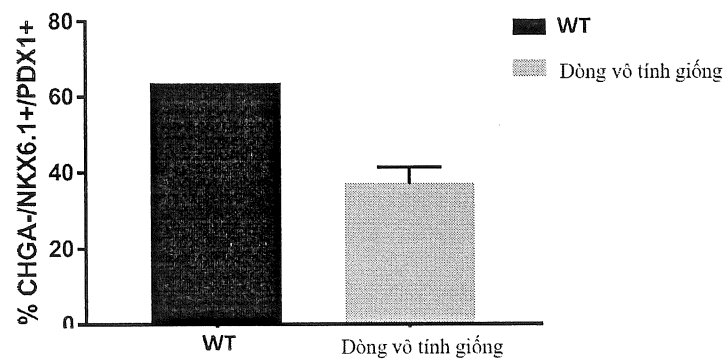


HÌNH 26A

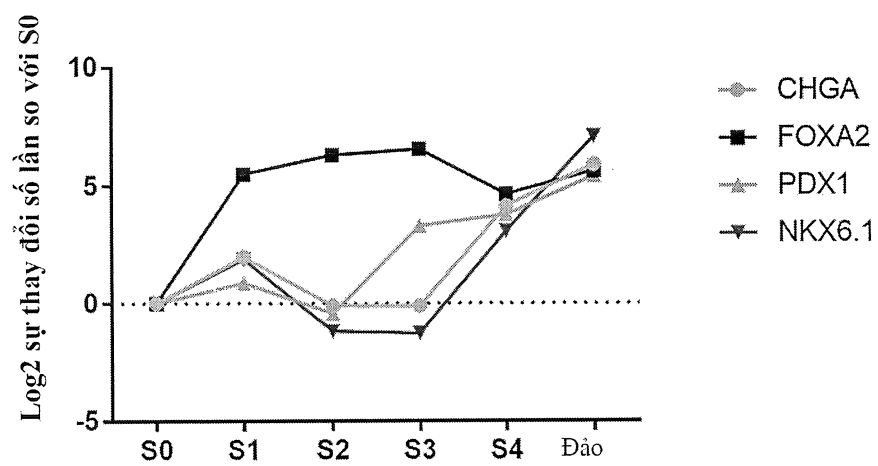


HÌNH 27B

42/42



HÌNH 27C



HÌNH 28

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CRISPR Therapeutics AG

REZANIA, Alireza

RAMOS-ZAYAS, Rebeca

<120> TẾ BÀO BIẾN ĐỔI GEN VÀ QUẦN THỂ TẾ BÀO

<130> 100867-666513 CT123-PCT

<150> 62/896,477

<151> 2019-09-05

<150> 62/979,756

<151> 2020-02-21

<160> 57

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

gctactctct ctttctggcc

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggccgagatg tctcgctccg

20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

cgcgagcaca gctaaggcca

20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 4

cagacagcaa actcaccag

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 5

aaactttgtc ccgaccctcc

20

<210> 6

<211> 130

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 6

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctg ggcgacctt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact 120

aggggttcct

130

<210> 7

<211> 800

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

gttctagggt ggaaactaag agaatgatgt acctagaggg cgctggaagc tctaaagccc 60
tagcagttac tgcttttact attagtggc gttttttct cccccccgcc ccccgacaaa 120
tcaacagaac aaagaaaatt acctaaacag caaggacata gggaggaact tcttggcaca 180
gaactttcca aacacttttt cctgaaggga tacaagaagc aagaaaggta ctctttcact 240
aggaccttct ctgagctgtc ctcaggatgc ttttgggact atttttctta cccagagaat 300
ggagaaaccc tgcagggaat tccaagctg tagttataaa cagaagttct ctttctgcta 360
ggtagcattc aaagatctta atcttctggg ttccgtttt ctggaatgaa aaatgcaggt 420
ccgagcagtt aactggctgg ggcaccatta gcaagtcact tagcatctct ggggccagtc 480
tgcaaagcga gggggcagcc ttaatgtgcc tccagcctga agtcctagaa tgagcgcccg 540
gtgtcccaag ctggggcgcg caccccatgat cggaggggcg cgatgtacag acagcaaact 600
cacccagtct agtgcattgcc ttcttaaaca tcacgagact ctaagaaaag gaaactgaaa 660
acgggaaagt cctctctct aacctggcac tgcgtcgtg gcttggagac aggtgacggt 720
ccctgcgggc cttgtcctga ttggctgggc acgcgtttaa tataagtgga ggcgtcgcgc 780
tggcgggcat tctgaagct 800

<210> 8

<211> 380

<212> ADN

<213> Cytomegalovirut

<400> 8

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcacgc tattaccatg 380

<210> 9

<211> 276

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 9

tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc cccccctcc ccacccccaa 60

ttttgtattt atttatttt taattatttt gtgcagcga gggggcgggg gggggggggg 120

cgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcg 180

gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcggcgg 240

cgcgggccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcg 276

<210> 10

<211> 1009

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 10

ggagtcgctg cgttgccctc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgctcgcg ccgccccccc 60

cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg 120

gggtgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg ctggttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 180

cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240

gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgcgg cccgcgctgc ccggcggtg tgagcgtgc 300

gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc gtgtgcgca ggggagcgcg gccggggggc 360

gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 420

gggggggtga gcaggggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccccc ctgcaccccc 480

ctccccgagt tgctgagcac ggccccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg 540

cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 600

cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg ccggcggctg 660

tcgaggcgcg gcgagccgca gccattgcct ttatggtaa tcgtgcgaga gggcgcaggg 720

acttctttg tcccaaatct ggcggagccg aaatctggga ggcgccgccg caccctct 780

agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 840

gtgcgtgcc gcgcccgct ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc cgcaggggga 900

cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg 960

ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttctcttt ttctacag 1009

<210> 11

<211> 873

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

atgaggatat ttgctgtctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60
 gtcacgggtc ccaaggacct atatgtggta gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120
 aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180
 gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaagggtca gcatagtagc 240
 tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
 atcacagatg tgaaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgacag ctatggtggt 360
 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaga 420
 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggtac 480
 cccaaggccg aagtcactg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
 accaccaatt ccaagagaga ggagaaactt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
 acaacaacta atgagatttt ctactgcact ttaggagat tagatcctga ggaaaacat 660
 acagctgaat tggtcacccc agaactacct ctggcacatc ctccaatga aaggactcac 720
 ttggtaatc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttcgt 780
 ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840
 aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg taa 873

<210> 12

<211> 225

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 12

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc ccccggtcct tccttgacct 60

tggaaggtgc cactcccact gtctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgg 225

<210> 13

<211> 800

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

ccagegtgag tctctctac cctcccgtc tggctcttc tctcccgtc tgcacctct 60

gtggccctcg ctgtctctc tcgtccgtg acttccctc tccaagtct ccttggtggc 120

ccgccgtggg gctagtccag ggctggatct cggggaagcg gcgggggtggc ctgggagtgg 180

ggaagggggg ggcacccgg gacgcgcgt acttgccct ttcggcgggg agcaggggag 240

acctttggcc tacggcgacg ggagggtcgg gacaaagttt agggcgtcga taagcgtcag 300

agcgccgagg ttgggggagg gtttctcttc cgctctttcg cggggcctct ggctcccca 360

gcgcagctgg agtgggggac gggtaggctc gtcccaaagg cgcggcgctg aggtttgtga 420

acgcgtggag gggcgcttgg ggtctggggg aggcgtcgcc cgggtaagcc tgtctgctgc 480

ggctctgctt cccttagact ggagagctgt ggacttcgtc taggcgccc ctaagttegc 540

atgtcctagc acctctgggt ctatgtgggg ccacaccgtg gggaggaaac agcacgcgac 600

gtttgtagaa tgcttggtg tgatacaaag cggtttcgaa taattaactt attgttccc 660

atcacatgtc acttttaaaa aattataaga actaccggtt attgacatct ttctgtgtgc 720

caaggacttt atgtgctttg cgtcatttaa tttgaaaac agttatcttc cgccatagat 780

aactactatg gttatcttct 800

<210> 14

<211> 141

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 14

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

gaagcgtgtc ttcatagcgc 20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

ttactcgtgt caaagccgtt 20

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

tgtcaaagcc gttaggatcc

20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

gccgtagga tcctggcttg

20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

gcggagtggc taaagtgctt

20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

tccgcaagcc aggatcctaa

20

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

gttcggcttt gagcttcctc

20

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

gagatggtga tcatgagacc

20

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

ttgtactcat atttgttcc

20

<210> 24

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 24

aacaaatatg agtacaagtt

20

<210> 25

<211> 800

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 25

accgctctca gaccagaaac gtccacaccc gccctccgat ggctgtcgc cctggctagg 60

tttagggtc agtgggatec tcttccact ggacccggga gaagacgctc aacagccccc 120

tcttccct ctttctctc ctctctcc tccccctc cctgcgccgc tccagagcgc 180

aacaaccatt ttccagcca ggagcacacc gtgtccacgc gccacagcga tctcactgat 240

tgtcgggct cctggtaaac aaggaccggg cagccaatgg gagggatgtg cacgagggca 300

gcacagcct ccgggccagc gctcgcgtgg ctctctggc ccgggctact atatagagac 360

gtttccgct cctgcttga actaaccct cttttctcc aaaggagtgc ttgtggagat 420

cggatcttt ctccagcaat tgggggaaag aaggctttt ctctgaatta gcttagtgta 480

accagcggcg tatatcttt aggcgccttt tcgaaaacct agtagttaat attcatttgt 540

ttaaacttta tttatTTTT aagctcaaac tgcttaagaa taccttaatt ccttaaagtg 600

aaataatTTT ttgcaaaggg gtttctcga ttggagctt ttttttctt ccaccgtcat 660

ttctaactct taaaaccaac tcagttccat catggtgatg ttcaagaaga tcaagtcttt 720

tgaggtggtc ttaacgacc ctgaaaaggt gtacggcagt ggcgagaagg tggctggccg 780

ggtgatagtg gaggtgtgtg 800

<210> 26

<211> 60

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 26

atgtctcgct cctgggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 60

<210> 27

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 27

gtcatggcgc cccgaaccct ctctctg 27

<210> 28

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 28

gggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcgggtggcg gatcg 45

<210> 29

<211> 297

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 29

atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca 60

aatttctga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg 120

aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg 180

tctttctatc tcttgacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc 240

cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatg 297

<210> 30

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 30

gggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggcgggcggcg gctccggtgg tgggtgatcc 60

<210> 31

<211> 1011

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 31

gggtcccact ccttgaagta ttccacact tccgtgtccc ggcccggccg cggggagccc 60

cgttcatct ctgtgggcta cgtggacgac acccagttcg tgcgttcga caacgacgcc 120

gcgagtcga ggtggtgcc gcgggcgcgcg tggatggagc aggaggggtc agagtattgg 180

gaccgggaga cacggagcgc caggacacc gcacagattt tccagtgaa tctgcggacg 240

ctgcgcggct actacaatca gagegaggcc gggcttcaca ccctgcagtg gatgcatggc 300

tgcgagctgg ggcccgacgg gcgcttcctc cgcgggtatg aacagttcgc ctacgacggc 360

aaggattatc tcaccctgaa tgaggacctg cgctcctgga ccgcggtgga cacggcggct 420

cagatctccg agcaaaagtc aaatgatgcc tctgaggcgg agcaccagag agcctacctg 480

gaagacacat gcgtggagtg gctccacaaa tacctggaga aggggaagga gacgctgctt 540

cacctggagc ccccaaagac acacgtgact caccacccca tctctgacca tgaggccacc 600

ctgaggtgct gggccctggg cttctaccct gcggagatca cactgacctg gcagcaggat 660

ggggagggcc ataccagga cacggagctc gtggagacca ggcctgcagg ggatggaacc 720

ttccagaagt gggcagctgt ggtgggcct tctggagagg agcagagata cacgtgccat 780

gtgcagcatg aggggctacc cgagcccgtc accctgagat ggaagccggc ttcccagccc 840

accatcccca tcgtgggcat cattgctggc ctggttctcc ttggatctgt ggtctctgga 900

gctgtggtg ctgctgtgat atggaggaag aagagctcag gtggaaaagg agggagctac 960

tctaaggctg agtggagcga cagtgcccg ggtctgagt ctcacagctt g 1011

<210> 32

<211> 800

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 32

cagggatccc agcagtgcaa acagacttcg gactacctgc gctatgaaga cacgcttctt 60

ctggaagacc agccaacagg taagcggccc aattcattgt tggagggtga aagctgatta 120

gagaagagaa ttgaatacac aaaacctgta cgaaatgttt taagttgctc agtttgagtg 180

gtttgaatta cgtgtgttg ctccctttt tctgtttta tttgcagaca ttctcctccc 240

cccccaaaaa aaagggtgat ttgtacaatt tttatgggtg ctgtgtccta aaggggatcc 300

tgaggggcgt tgcctcgggt agttaaagtc ttatgtgtgc ataagttgct tattctttgt 360

ctacttcta ttgagatgt tagtagagaa ctgtcctggg tgaatcttc agtattgcag 420

ggcttggcaa ctgtctgccc gacaaaatac atcagaattt ctctttaaga acaatatggg 480

atggattaaa aaatataat atgggatgaa attgggggta cttcaatacc ttgcatgcc 540

ccaagcatt cctatcaca cagatgcatt ttaagtgtaa cagcaagcct aatggctact 600

cgattttct tcccttcagg tgagaatgag atgggatca tgagacctgg aaacaaatat 660

gagtacaagt tcggcttga gttcctcag gggtaaatat cagctaaatg catctttgaa 720

ctttctgtc taaaatatct tgccctcctt tgatcactta ctgttcttgg agagcgttt 780

aaaattttca tttcttgac 800

<210> 33

<211> 7133

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 33

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct gcggccgcac gcgtgttcta ggggtgaaac taagagaatg atgtacctag 180

agggcgctgg aagctctaaa gccctagcag ttactgcttt tactattagt ggtcgttttt 240

tttccccccc cgccccccga caaatcaaca gaacaaagaa aattacctaa acagcaagga 300

catagggagg aacttcttgg cacagaactt tccaaacact tttcctgaa gggatacaag 360

aagcaagaaa ggtactcttt cactaggacc ttctctgagc tgcctcagg atgcttttgg 420

gactattttt cttaccaga gaatggagaa accctgcagg gaattcccaa gctgtagtta 480

taaacagaag ttctccttet gctaggtagc attcaaagat cttaatcttc tgggtttccg 540

ttttctegaa tgaaaaatgc aggtccgagc agttaactgg ctggggcacc attagcaagt 600

cacttagcat ctctggggcc agtctgcaaa gcgagggggc agccttaatg tgcctccagc 660

ctgaagtctt agaattgagcg cccggtgtcc caagctgggg cgcgcacccc agatcggagg 720

gcgccgatgt acagacagca aactcaccca gtctagtga tgccttctta aacatcacga 780

gactctaaga aaaggaaact gaaaacggga aagtcctct cttaacctg gcactgcgtc 840

gctggcttgg agacaggtga cggtcctgc gggccttgc ctgattggct gggcacgcgt 900

ttaatataag tggaggcgtc gcgctggcgg gcattcctga agctaagctt gtggacgata 960

tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat 1020

tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaatt ggcccgcctg 1080

gctgaccgcc caacgacccc cgcccatga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 1140

cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta ttacggtaa actgcccact 1200

tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 1260

aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt 1320

acatctacgt attagtcacg gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc 1380

actctcccca tctccccccc ctccccacc ccaattttgt attttttat ttttaatta 1440

tttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1500

cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgt 1560

ccgaaagttt ccttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc 1620

gcggcgggcg ggagtcgctg cgttgccctc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg 1680

ccgccccccc cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc 1740

ttctctccg ggctgtaatt agcgcttggg ttaatgacgg ctcgttctt ttctgtggct 1800

gcgtgaaagc cttaaaggcg tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg 1860

gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgctgc ccggcggctg 1920

tgagcgctgc gggcgcgcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgca ggggagcgcg 1980

gccgggggcg gtgccccg cggtcggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtcgggg 2040

gtgtgtgcgt ggggggggta gcaggggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccccc 2100

ctgcaccccc ctccccgagt tgctgagcac ggccccgctt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160

gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc 2220

ggggcggggc cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg 2280

ccggcggctg tcgaggcgcg gcgagccga gccattgcct ttatggtaa tcgtgcgaga 2340

gggcgcaggg acttccttg tcccaaatct ggcgagccg aaatctggga ggcgccgccg 2400

cacccctct agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg 2460

gagggccttc gtgcgtgcc gcgccgccgt ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc 2520

cgcaggggga cggctgcctt cggggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 2580

tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttctcttt ttctacagg 2640

ggggatccgt ttatctgcag aattgcacct tgacgtgcc accatgagga tatttgctgt 2700

ctttatattc atgacctact ggcatttgc gaacgcattt actgtcacgg ttccaagga 2760

cctatatgtg gtagagtatg gtagcaatat gacaattgaa tgcaaattcc cagtagaaaa 2820

acaattagac ctggctgcac taattgtcta ttgggaaatg gaggataaga acattattca 2880

atttgtgcat ggagaggaag acctgaaggt tcagcatagt agctacagac agagggcccg 2940

gctgtgaag gaccagctct ccctgggaaa tgctgcactt cagatcacag atgtgaaatt 3000

gcaggatgca ggggtgtacc gctgcatgat cagctatggg ggtgccgact acaagcgaat 3060

tactgtgaaa gtcaatgccc catacaaaa aatcaacaa agaattttgg ttgtggatcc 3120

agtcacctct gaacatgaac tgacatgtca ggctgagggc taccacaagg ccgaagtcatt 3180

ctggacaagc agtgaccatc aagtcctgag tggtgaagacc accaccacca attccaagag 3240

agaggagaaa cttttcaatg tgaccagcac actgagaatc aacacaacaa ctaatgagat 3300

tttctactgc acttttagga gattagatcc tgaggaaaac catacagctg aattggatc 3360

cccagaacta cctctggcac atcctccaaa tgaaaggact cacttggtta ttctgggagc 3420

catcttatta tgccttggtg tagcactgac attcatcttc cgtttaagaa aaggagagaat 3480

gatggatgtg aaaaaatgtg gcatccaaga taaaactca aagaagcaaa gtgatacaca 3540

tttgaggag acgtaaccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg 3600

ttgtttgcc cccccctg ccttcctga ccttgaagg tgccactccc actgtccttt 3660

cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 3720

gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 3780

atgcggtggg ctctatgggt cgaccagcg tgagtcttc ctaccctccc gctctgtcc 3840

ttctctccc gctctgcacc ctctgtggc ctcgtgtgc tctctgctc cgtgacttc 3900

cttctcaag ttctccttg tggccgccc tggggctagt ccagggtgg atctcgggga 3960

agcggcgggg tggcctggga gtggggaagg gggcgccac ccgggacgcg cgctactgc 4020

cccttcggc ggggagcagg ggagacctt ggcctacggc gacgggaggg tcgggacaaa 4080

gtttaggcg tcgataagcg tcagagcgcc gaggtgggg gagggttct ctccgctct 4140

ttcgggggc ctctggctcc cccagcgag ctggagtggg ggacgggtag gctcgtcca 4200

aaggcgggc gctgaggtt gtgaacgcgt ggagggggc ttggggtctg ggggagggc 4260

cgcccggtg agcctgtct ctgcggctct gctccctta gactggagag ctgtggactt 4320

cgtctaggcg cccgctaagt tcgcatgtcc tagcacctct gggcttatgt ggggccacac 4380

cgtggggagg aaacagcacg cgacgtttgt agaatgcttg gctgtgatac aaagcggttt 4440

cgaataatta acttatttgt tcccatcaca tgcactttt aaaaaattat aagaactacc 4500

cgttattgac atctttctgt gtgccaagga ctttatgtgc tttgcgtcat ttaattttga 4560

aaacagttat ctccgccat agataactac tatggttatc ttctggtaac cacgtgcgga 4620

ccgaggctgc agcgtcgtcc tccctaggaa cccctagtga tggagtggc cactccctct 4680

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgcg cccgggcttt 4740

gccccggcgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagctgcc tgcaggggcg cctgatgcgg 4800

tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tacgtcaaag caaccatagt 4860

acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg 4920

ctacacttgc cagegcceta ggccecgctc cttegettt ctteccctcc tttctcgca 4980

cgttcgccgg ctteccccgt caagctctaa atcgggggct ccttttaggg ttccgattta 5040

gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac ttgattggg tgatggttca cgtagtgggc 5100

catcgccctg atagacgggt tttegccctt tgacgttga gtccacgttc ttaatatgtg 5160

gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc gggtattct tttgatttat 5220

aagggaatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 5280

acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caattttatg gtgcactctc agtacaatct 5340

gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 5400

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 5460

gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga 5520

tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga acaataaaac tgtctgctta cataaacagt 5580

aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt cgaggccgcg attaaattcc 5640

aacatggatg ctgatttata tgggtataaa tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt 5700

gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc 5760

aaaggtagec ttgccaatga tgttacagat gagatggta gactaaactg gctgacggaa 5820

tttatgcctc ttcgaccat caagcatttt atccgtactc ctgatgatgc atggttactc 5880

accactgcga tccccggaaa aacagcattc caggtattag aagaatatcc tgattcaggt 5940

gaaaatattg ttgatgcgct ggcagtgttc ctgcgccggt tgcatcgat tctgtttgt 6000

aattgtcctt ttaacagega tcgcgtattt cgtctcgctc aggcgcaatc acgaatgaat 6060

aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa 6120

gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt 6180

gatttctcac ttgataacct tatttttgac gaggggaaat taatagggtg tattgatgtt 6240

ggacgagtcg gaatcgcaga ccgataccag gatcttgcca tcctatggaa ctgcctcggg 6300

gagttttctc cttcattaca gaaacggcctt ttcaaaaat atggtattga taatcctgat 6360

atgaataaat tgcagtttca ttgatgctc gatgagtttt tctaattca tgaccaaatt 6420

cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 6480

ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgt 6540

accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 6600

cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca 6660

cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 6720

tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 6780

taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 6840

gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga 6900

agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 6960

ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtct gtcgggttc gccacctctg 7020

acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag 7080

caacgcggcc ttttacggg tctggcctt ttgctggcct ttgctcaca tgt 7133

<210> 34

<211> 7763

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 34

cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgacctt 60

ggcgcccg cctcagtgag cgagcgagc gcgagagagg gaggggcaa ctccatcact 120

aggggttct gggccgcac gcgtaccgt ctgagaccag aaacgtccac acccgccctc 180

cgatggcctg tcgccctggc taggttttag ggtcagtggg atcctcttc cactggacc 240

gggagaagac gctcaacagc cccctcttc cctctcttc tctcttct ctcttccc 300

cctccctgcg ccgtccaga gcgcaacaac catttccca gccaggagca caccgtgtcc 360

acggccaca gcgatctcac tgattggtcg ggctcctggg aaacaaggac cgggcagcca 420

atgggaggga tgtgcacgag ggcagcacga gcctccgggc cagcgctcgc gtggctcttc 480

tggcccgggc tactatatag agacgtttcc gcctcctgct tgaaactaac cctcttttt 540

ctccaaagga gtgcttgtgg agatcggatc tttctccag caattggggg aaagaaggct 600

tttctctga attagcttag tgtaaccagc ggcgtatatt ttttaggcgc ctttgcgaa 660

acctagtagt taatattcat ttgtttaa cttattttat tttaagctc aaactgctta 720

agaatacctt aattccttaa agtgaaataa tttttgcaa aggggtttcc tcgattgga 780

gcttttttt tctccaccg tcatttctaa ctcttaaac caactcagtt ccatcatggt 840

gatgttcaag aagatcaagt ctttgaggt ggtctttaac gaccctgaaa aggtgtacgg 900

cagtggcgag aaggtggctg gccgggtgat agtggaggtg tgtgaagctt gtggacgata 960

tgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcatt 1020

tagttcatag cccatatatg gagttccgag ttacataact tacggtaaact ggcccgcctg 1080

gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 1140

cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta ttacggtaa actgcccact 1200

tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 1260

aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt 1320

acatctacgt attagtcac gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc 1380

actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta 1440

ttttgtgcag cgatggggggc ggggggggggg gggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1500

cgagggggcgg ggcggggcgga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct 1560

ccgaaagttt cctttatgg cgaggcgggc ggcggcgcg ccctataaaa agcgaagcgc 1620

gcggcgggcg ggagtcgtg cgttccttc gcccgtgcc ccgtccgcg ccgcctcgcg 1680

ccggccgcc cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc 1740

ttctctccg ggctgaatt agcgcttgg ttaatgacgg ctcgtttctt ttctgtggct 1800

gcgtgaaagc cttaaaggc tccgggagg ccctttgtc gggggggagc ggctcggggg 1860

gtgcgtgcgt gtgtgtgtc gtggggagc ccgcgtcgg ccgcgctgc ccggcggtg 1920

tgagcgctgc gggcgggcg cggggcttg tgcgtccgc gtgtgcgga ggggagcgcg 1980

gccggggggc gtgccccgc gtgcggggg gctgcgagg gaacaaaggc tgcgtcggg 2040

gtgtgtgcgt ggggggggta gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc 2100

ctgcacccc ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160

gggcgtggcg cggggctgc cgtgccggc ggggggtggc ggcaggtgg ggtgccggc 2220

ggggcggggc cgcctcggc cggggaggc tcggggagg ggcgcggcg ccccgagcg 2280

ccggcggctg tcgaggcgcg gcgagccgca gccattgcct ttatggtaa tcgtgcgaga 2340

gggcgcaggg acttcctttg tcccaaactc ggccggagccg aaatctggga ggccgccgccc 2400

cacccctct agcgggcgcg ggccaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg 2460

gagggccttc gtgcgtgcc gcgccgccgt cccctctcc atctccagcc tcggggctgc 2520

cgcaggggga cggctgccct cggggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 2580

tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcacgc cttctcttt ttctacagg 2640

ggggatccgt ttatctgcag aattgccct tgacgtgcc accatgtctc gctccgtggc 2700

cttagctgtg ctcgcgtac tctctcttc tggcctggag gctgtcatgg cgccccgaac 2760

cctcttctg ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcgatcca 2820

gcgtactcca aagattcagg ttactcacg tcattccagca gagaatggaa agtcaaattt 2880

cctgaattgc tatgtgtctg ggttcatcc atccgacatt gaagttgact tactgaagaa 2940

tggagagaga attgaaaaag tggagcattc agacttgtct ttcagcaagg actggtcttt 3000

ctatctcttg tactacactg aattaccccc cactgaaaaa gatgagtatg cctgccgtgt 3060

gaacatgtg actttgtcac agcccaagat agttaagtgg gatcgagaca tgggtggtgg 3120

tggttctggt ggtggtggtt ctggcggcgg cggctccggt ggtggtggat ccggtccca 3180

ctccttgaag tatttccaca cttccgtgtc ccggccccggc cgcgggggagc cccgcttcat 3240

ctctgtgggc tacgtggacg acaccagtt cgtgcgttc gacaacgacg ccgcgagtc 3300

gaggatggtg ccgcggggcgc cgtggatgga gcaggagggg tcagagtatt gggaccggga 3360

gacacggagc gccagggaca ccgcacagat ttccgagtg aatctgcgga cgtgcgcgg 3420

ctactacaat cagagcgagg ccgggtctca caccctgcag tggatgcatg gctgcgagct 3480

ggggccccgac gggcgcttcc tccgcgggta tgaacagttc gcctacgacg gcaaggatta 3540

tctcacctg aatgaggacc tgcgtcctg gaccgcgtg gacacggcgg ctcagatctc 3600

cgagcaaaag tcaaatgatg cctctgaggc ggagcaccag agagcctacc tggaagacac 3660

atgcgtggag tggctccaca aatacctgga gaagggaag gagacgtgc ttcacctgga 3720

gccccaaag acacacgtga ctcaccacc catctctgac catgaggcca ccctgagtg 3780

ctgggccctg ggcttctacc ctgcggagat cacttgacc tggcagcagg atggggaggg 3840

ccataccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca ggggatggaa cttccagaa 3900

gtgggcagct gtggtggtgc cttctggaga ggagcagaga tacacgtgcc atgtgcagca 3960

tgaggggcta ccgagccccg tcacctgag atggaagccg gcttcccagc ccaccatccc 4020

catcgtgggc atcattgctg gcctggttct ctttggatct gtggtctctg gagctgtgt 4080

tgctgctgtg atatggagga agaagagctc aggtggaaaa ggaggagct actctaaggc 4140

tgagtggagc gacagtgcc aggggtctga gtctcacagc ttgtaaccgc tgatcagcct 4200

cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga 4260

ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgatt 4320

gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg 4380

attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatgggt cgaccaggga 4440

tcccagcagt gcaaacagac ttcggagtac ctgcgctatg aagacacgct tcttctggaa 4500

gaccagccaa caghtaagcg gcccaattca ttgttgagg gtgaaagctg attagagaag 4560

agaattgaat acacaaaacc tgtacgaaat gttttaagtt gctcagttg agtggttga 4620

attacgtgtt gtgtcttct ttttctgtt ttaatttga gacattctc tccccccca 4680

aaaaaaaggg tgattgtac aatttttat ggtgctgtgt cctaaagggg atcctgaggg 4740

gcgttgccctc gggtagttaa agtcttatgt gtgcataagt tgcttattct ttgtctactt 4800

cctatttgag atgttagtag agaactgtcc tgggtgaatc ttccagtatt gcagggcttg 4860

gcaacttgct gcccgacaaa atacatcaga atttctctt aagaacaata tgggatggat 4920

taaaaaatat atatatggga tgaaattggg ggtacttcaa taccttgcg gccaccaag 4980

cattccttat cacacagatg cattttaagt gtaacagcaa gcctaatggc tactcgattt 5040

tcttccctt caggtgagaa tgagatgggtg atcatgagac ctggaaacaa atatgagtac 5100

aagtccggt ttgagcttcc tcaggggtaa atatcagcta aatgcatctt tgaactttc 5160

tgtctaaaat atcttgccct cctttgatca ctactgttc ttggagagcg ttttaaaatt 5220

ttcattttct tgacggtaac cactgtcgga ccgaggctgc agcgtcgtcc tcctaggaa 5280

cccctagtga tggagtggc cactccctct ctgcgcgtc gtcgctcac tgaggccggg 5340

cgaccaaagg tcgcccgcg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgcg cgagcgagcg 5400

cgcagctgcc tgcaggggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcctct gtgcggtatt 5460

tcacaccgca tacgtcaaag caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg 5520

cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgtc 5580

cttgccttt ctcccttcc ttctcgcca cgttcgccgg cttecccggt caagctctaa 5640

atcggggggt ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac 5700

ttgatttggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt ttgcgccctt 5760

tgacgttga gtccacgttc ttaatatgtg gactcttgtt ccaaactgga acaacactca 5820

accctatctc gggctattct ttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt 5880

taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta 5940

caattttatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc 6000

gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 6060

acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggtttca ccgatcac 6120

cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt ttatagggtt aatgcatga 6180

acaataaaac tgtctgctta cataaacagt aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa 6240

cgggaaacgt cgaggccgcg attaaattcc aacatggatg ctgattata tgggtataaa 6300

tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc 6360

gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcg ttgccaatga tgttacagat 6420

gagatggtca gactaaactg gctgacggaa ttatgcctc ttccgacat caagcatttt 6480

atccgtactc ctgatgatgc atggttactc accactgcga tccccgaaa aacagcattc 6540

cagggtattag aagaatatcc tgattcaggt gaaaatattg ttgatgcgct ggcagtgttc 6600

ctgcgccggt tgcatcagat tctgtttgt aattgtcctt ttaacagega tcgcgtattt 6660

cgtctcgtc aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat 6720

gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca 6780

ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt gatttctcac ttgataacct tatttttgac 6840

gaggggaaat taatagggtg tattgatgtt ggacgagtcg gaatcgaga ccgataccag 6900

gatcttgcca tctatggaa ctgcctcggg gagtttctc cttcattaca gaaacggctt 6960

ttcaaaaat atggtattga taatcctgat atgaataaat tgcagttca tttgatgctc 7020

gatgagtttt tctaattca tgacaaaaat ccctaacgt gagtttctg tccactgagc 7080

gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat 7140

ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgttgc cggatcaaga 7200

gtaccaact cttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 7260

ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 7320

cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgcgtccagt ggcgataagt cgtgtcttac 7380

cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg 7440

ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 7500

tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggttaag 7560

cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct 7620

ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc 7680

agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt tcttggcctt 7740

ttgctggcct tttgctcaca tgt 7763

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 35

tataagtgga ggcgtcgcg 20

<210> 36

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 36

gagtagcgcg agcacagcta 20

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 37

actggacgcg tcgcgctggc 20

<210> 38

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 38

aagtggaggc gtcgcgctgg

20

<210> 39

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

ggccacggag cgagacatct

20

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 40

gcccgaatgc tgcagcttc

20

<210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

ctcgcgctac tctctctttc

20

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 42

tcttgaagct gacagcattc

20

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 43

ttcttgaagc tgacagcatt

20

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 44

actctctctt tctggcctgg

20

<210> 45

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 45

gaagcgtgtc ttcatagcgc agg

23

<210> 46

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 46

ttactcgtgt caaagccgtt agg

23

<210> 47

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

tgtcaaagcc gtaggatcc tgg

23

<210> 48

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 48

gccgtagga tcctggcttg cgg 23

<210> 49

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

gcggagtggc taaagtgctt tgg 23

<210> 50

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 50

tccgcaagcc aggatcctaa cgg 23

<210> 51

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 51

gttcggcttt gagcttcctc agg

23

<210> 52

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

gagatggtga tcatgagacc tgg

23

<210> 53

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 53

ttgtactcat attgtttcc agg

23

<210> 54

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 54

aacaaatatg agtacaagtt cgg

23

<210> 55

<211> 1500

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 55

atgtctcgct cctggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 60

gtcatggcgc cccgaaccct ctctctgggt ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc 120

ggtggcggat cgatccagcg tactccaaag attcaggttt actcacgtca tccagcagag 180

aatggaaagt caaatttcct gaattgctat gtgtctgggt tcatccatc cgacattgaa 240

gttgacttac tgaagaatgg agagagaatt gaaaaagtgg agcattcaga cttgtcttcc 300

agcaaggact ggtctttcta tctctgttac tacactgaat tcacccccac tgaaaaagat 360

gagtatgcct gccgtgtgaa ccatgtgact ttgtcacagc ccaagatagt taagtgggat 420

cgagacatgg gtgggtgggt ttctgggtgt ggtgggtctg gcggcggcgg ctccgggtgt 480

ggtggatccg gctcccactc cttgaagtat ttccacactt ccgtgtcccg gcccggccgc 540

ggggagcccc gcttcactc tgtgggctac gtggacgaca ccagttcgt gcgcttcgac 600

aacgacgccg cgagtcgag gatggtgccg cgggcgccgt ggatggagca ggaggggtca 660

gagtattggg accgggagac acggagcgcc agggacaccg cacagattt ccgagtgaat 720

ctgcggacgc tgcgcggcta ctacaatcag agcgaggccg ggtctcacac cctgcagtgg 780

atgcatggct gcgagctggg gcccgacggg cgcttctcc gcgggtatga acagttcgcc 840

tacgacggca aggattatct caccctgaat gaggacctgc gctcctggac cgcggtggac 900

acggcggctc agatctccga gcaaaagtca aatgatgcct ctgaggcgga gcaccagaga 960

gcctacctgg aagacacatg cgtggagtgg ctccacaaat acctggagaa ggggaaggag 1020

acgtgcttc acctggagcc ccaaagaca cacgtgactc accaccccat ctctgacct 1080

gaggccacc tgaggtgctg ggccctgggc ttctacctg cggagatcac actgacctgg 1140

cagcaggatg gggagggcca taccaggac acggagctcg tggagaccag gcctgcaggg 1200

gatggaacct tccagaagtg ggcagctgtg gtggtgcctt ctggagagga gcagagatac 1260

acgtgccatg tgcagcatga ggggctacc gagcccgta cctgagatg gaagccggct 1320

tccagccca ccatcccat cgtgggcac attgctggcc tggttctct tggatctgtg 1380

gtctctggag ctgtggttgc tgctgtgata tggaggaaga agagctcagg tggaaaagga 1440

gggagctact ctaaggctga gtggagcgac agtgcccagg ggtctgagtc tcacagcttg 1500

<210> 56

<211> 7460

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 56

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttctt gcggccgcac gcgtaccgct ctgagaccag aaacgtccac acccgccctc 180

cgatggcctg tcgccctggc taggttttag ggtcagtggg atcctccttc cactggacct 240

gggagaagac gctcaacagc cccctccttc cctccttcc tctccttct ctccttcccc 300

cctccctgcg ccgctccaga gcgcaacaac cattttccca gccaggagca caccgtgtcc 360

acgcgccaca gcgattctac tgattggctg ggctcctggt aaacaaggac cgggcagcca 420

atgggaggga tgtgcacgag ggcagcacga gcctccgggc cagcgctcgc gtggctcttc 480

tggccccgggc tactatatag agacgtttcc gcctcctgct tgaaactaac ccctctttt 540

ctccaaagga gtgcttgtgg agatcggatc ttttctccag caattggggg aaagaaggct 600

ttttctga attagcttag tgtaaccagc ggcgtatatt ttttaggcgc ctttcgaaa 660

acctagtagt taatattcat ttgtttaa cttattttat tttaagctc aaactgctta 720

agaatacctt aattccttaa agtgaaataa tttttgcaa aggggtttcc tcgattgga 780

gctttttt tcttcaccg tcattctaa ctctaaaac caactcagtt ccatcatggt 840

gatgtcaag aagatcaagt ctttgaggt ggtctttaa gacctgaaa aggtgtacgg 900

cagtggcgag aaggtggctg gccgggtgat agtggaggtg tgtgaagctt gtggacgata 960

tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcatt 1020

tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggccccgctg 1080

gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 1140

cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta ttacggtaa actgcccact 1200

tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 1260

aatggccccg ctggcattat gccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt 1320

acatctacgt attagtcac gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc 1380

actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta 1440

ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1500

cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct 1560

ccgaaagttt ccttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc 1620

gcggcggggc ggagtcgctg cgttgccctc gcccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg 1680

ccgcccggcc cggtctgac tgaccgctt actccacag gtgagcgggc gggacggccc 1740

ttctctccg ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctgcttctt ttctgtggct 1800

gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg cctttgtgc gggggggagc ggctcggggg 1860

gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcg cccgcgctgc ccggcggctg 1920

tgagcgtgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg 1980

gccggggggc gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg 2040

gtgtgtgcgt ggggggggtga gcaggggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccccc 2100

ctgcaccccc ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160

gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc 2220

ggggcggggc cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg 2280

ccggcggctc tagagcctct gctaaccatg ttcatgcctt cttcttttc ctacagggg 2340

gatccgttta tctgcagaat tcgcccttga cgtcgccacc atgtctcgct cctgggcctt 2400

agctgtgctc gcgtactct ctctttctgg cctggaggct gtcattggcg cccgaaccct 2460

cttcctgggt ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cgatccagcg 2520

tactccaaag attcagggtt actcacgtca tccagcagag aatggaaagt caaatctct 2580

gaattgctat gtgtctgggt ttcattcacc cgacattgaa gttgacttac tgaagaatgg 2640

agagagaatt gaaaaagtgg agcattcaga cttgtcttc agcaaggact ggtctttcta 2700

tctctgtac tacactgaat tcacccccac tgaaaaagat gattatgcct gccgtgtgaa 2760

ccatgtgact ttgtcacagc ccaagatagt taagtggat cgagacatgg gtggtggtgg 2820

ttctggtggt ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt ggtggatccg gctcccactc 2880

cttgaagtat ttccacactt ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc gcttcactc 2940

tgtgggctac gtggacgaca ccagttcgt gcgttcgac aacgacgccg cgagtccgag 3000

gatgtgccg cgggcgccgt ggatggagca ggaggggtca gattattggg accgggagac 3060

acggagcgcc agggacaccg cacagatctt ccgagtgaat ctgcggacgc tgcgcggcta 3120

ctacaatcag agcgaggccg ggtctcacac cctgcagtgg atgcatggct gcgagctggg 3180

gcccgaacggg cgcttctcc gcgggtatga acagttcgcc tacgacggca aggattatct 3240

cacctgaat gaggacctgc gctcctggac cgcggtggac acggcggctc agatctccga 3300

gcaaaagtca aatgatgcct ctgaggcgga gcaccagaga gcctacctgg aagacacatg 3360

cgtggagtgg ctccacaaat acctggagaa ggggaaggag acgctgcttc acctggagcc 3420

cccaaagaca cacgtgactc accaccccat ctctgacct gaggccaccc tgaggtgctg 3480

ggccctgggc ttctacctg cggagatcac actgacctgg cagcaggatg gggagggcca 3540

taccaggac acggagctcg tggagaccag gcctgcagg gatggaacct tccagaagt 3600

ggcagctgtg gtggtgcctt ctggagagga gcagagatac acgtgccatg tgcagcatga 3660

ggggetaccc gagcccgta cctgagatg gaagccggct tccagccca ccatcccat 3720

cgtgggcatc attgtggcc tggttctct tggatctgt gtctctggag ctgtggtgc 3780

tgcttgata tggaggaaga agagctcagg tggaaaagga gggagctact ctaaggctga 3840

gtggagcgac agtgcccagg ggtctgagtc tcacagcttg taaccgctga tcagcctga 3900

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc ccccgctcct tcttgacct 3960

tggaaggtgc cactcccact gtccttcct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc 4020

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 4080

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatgggtcga ccagggatcc 4140

cagcagtga aacagacttc ggagtacctg cgctatgaag acacgcttct tctggaagac 4200

cagccaacag gtaagcggcc caattcattg ttggagggtg aaagctgatt agagaagaga 4260

attgaataca caaaacctgt acgaaatgtt ttaagttgct cagtttgagt ggtttgaatt 4320

acgtgtgtt gcttcctttt ttctgtttta atttcagac attctcctcc ccccccaaaa 4380

aaaagggtga ttgtacaat ttttatggt gctgtgtcct aaaggggatc ctgaggggcg 4440

ttgcctcggg tagttaaagt cttatgtgtg cataagttgc ttattctttg tctacttct 4500

attgagatg ttagtagaga actgtcctgg gtgaatcttt cagtattgca gggcttggca 4560

actgtctgcc cgacaaaata catcagaatt tctctttaag aacaatatgg gatggattaa 4620

aaaatatata tatgggatga aattgggggt acttcaatac ctgcatgcc acccaagcat 4680

tccttatac acagatgcat ttaagtgtg acagcaagcc taatggctac tcgattttct 4740

ttcccttcag gtgagaatga gatggtgatc atgagacctg gaaacaaata tgagtacaag 4800

ttcggtttg agcttctca ggggtaaata tcagctaaat gcattcttga acttttctgt 4860

ctaaaatata ttgccctcct ttgatcactt actgttcttg gagagcggtt taaaattttc 4920

attttcttga cgtaaccac gtgcggaccg aggctgcagc gtcgtcctcc ctaggaaccc 4980

ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga 5040

ccaaaggctcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 5100

agctgcctgc agggggcgct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgtg cggtatttca 5160

caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtagc cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 5220

gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 5280

tcgctttctt ccttctctt ctcgccacgt tcgcggcgtt tccccgtcaa gctctaaatc 5340

gggggctccc tttagggctc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 5400

attgggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggtttt cgcccttga 5460

cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tctgttcca aactggaaca acactcaacc 5520

ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa 5580

aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttacaa 5640

ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac 5700

accgcccaac acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgttaca 5760

gacaagetgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gtttcaccg tcataccga 5820

aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat gtcataaaca 5880

ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat acaaggggtg ttatgagcca tattcaacgg 5940

gaaacgtcga ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg atttatatgg gtataaatgg 6000

gctcgcgata atgtcgggca atcaggtgcg acaatctatc gcttgatgg gaagcccgat 6060

gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgtg ccaatgatgt tacagatgag 6120

atggtcagac taaactggct gacggaattt atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc 6180

cgtactctg atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc ccggaaaaac agcattccag 6240

gtattagaag aatatacctga ttcaggtgaa aatattgtg atgcgctggc agtgttcctg 6300

cgccgggtgc attegattcc tgtttgtaat tgtccttta acagcgatcg cgtattcgt 6360

ctcgtcagg cgcaatcacg aatgaataac ggtttggtg atgcgagtga tttgatgac 6420

gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc tggaagaaa tgcataaact ttgccattc 6480

tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat ttctacttg ataacctat tttgacgag 6540

gggaaattaa taggttgat tgatgttga cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat 6600

cttgccatcc tatggaactg cctcggtgag tttctcctt cattacagaa acggctttt 6660

caaaaatatg gtattgataa tctgatatg aataaattgc agtttcattt gatgctcgat 6720

gagttttct aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag tttcgttcc actgagcgtc 6780

agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 6840

ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgttgccgg atcaagagct 6900

accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 6960

tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagaccgc ctacatacct 7020

cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 7080

gttgactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 7140

gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 7200

gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 7260

cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttcaggg ggaaacgcct ggtatcttta 7320

tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga ttttgtgat gctcgtcagg 7380

ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacgggtcc tggcctttg 7440

ctggcctttt gtcacatgt 7460

<210> 57

<211> 706

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 57

ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg ccgccccgcc 60

cggtcttgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg 120

ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctggtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 180

cttaaagggc tccgggaggg cctttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240

gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgtgc ccggcggctg tgagcgtgc 300

gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg 360

gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 420

gggggggtga gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc ctgcaccccc 480

ctccccgagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg 540

cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 600

cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg ccggcggctc 660

tagagcctct gctaaccatg ttcatgcctt cttcttttc ctacag 706