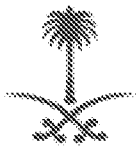


المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية و بموجب أحكام نظام براءات الإختراع و التصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة و الأصناف النباتية و النماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ و المعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 و تاريخ 1439/10/19هـ ، و لائحته التنفيذية.
يقرر منح :

سانجامو ثيرابيوتكس، إنك.
SANGAMO THERAPEUTICS, INC.

براءة اختراع رقم : SA 8295

بتاريخ : 1442/12/03 هـ
الموافق : 2021/07/13 م

عن الإختراع المسمى :

تنظيم يتدخل فيه إنزيم نوكلياز للتعبير الوراثي الجيني
NUCLEASE-MEDIATED REGULATION OF GENE EXPRESSION

وفق ما هو موضح في وصف الاختراع المرفق، ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق النظامية في المملكة العربية السعودية خلال فترة سريان الحماية.

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 8295 B1

[12] **براءة اختراع**

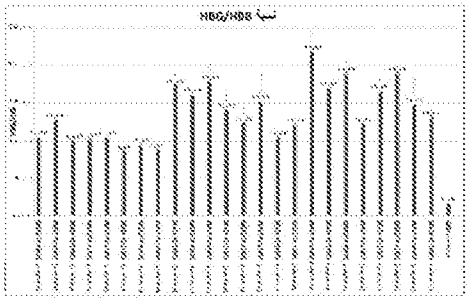
[45] **تاريخ المنح:** 1442/12/03 هـ
الموافق: 2021/07/13 م

[21] رقم الطلب: 517390307
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1439/02/19 هـ
الموافق: 2017/11/08 م
[30] بيانات الأسبقية:
US 62/303.595 2016/03/04 م
US 62/160.396 2015/05/12 م
[72] اسم المخترع: ريك، اندرياس
[73] مالك البراءة: سانجامو ثيرابيوتكس، إنك.
عنوانه: 501 كانال بوليفارد. سويت أيه100، ريتشموند، سي أيه 94804، أمريكا
جنسيته: امريكية
[74] الوكيل: مكتب الدكتور حسن الملا (محامون ومستشارون قانونيون)
[86] رقم الطلب الدولي: PCT/US2016/032049
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2016/05/12 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2016183298 A3
تاريخ النشر الدولي: 2016/11/17 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
C07K 014/047, A61P 043/000
A61L 027/038, A61K 035/014
C07H 021/000, C12N 001/019
[56] المراجع:
JP 2009515537, WO 2014085593
Bjoern Petersen ET AL" Advances in genetic modification of farm animals using zinc-finger nucleases (ZFN)"

الفاحص: حصه بنت عمر البيز

[54] اسم الاختراع: تنظيم يتدخل فيه إنزيم نوكلياز للتعبير الوراثي الجيني
NUCLEASE-MEDIATED REGULATION OF GENE EXPRESSION

[57] الملخص: يتعلق الكشف الحالي بمجال المعالجة الوراثية للجينوم genome engineering، تحديداً تعديل مستهدف منطقة "58+" من منطقة معزز BCL11A في الجينوم لخلية cell بشرية باستخدام بروتينات إصبع الزنك تستهدف منطقة معزز BCL11A ويشتمل بروتين إصبع الزنك zinc finger protein على 4، 5 أو 6 أصابع يتم تعيينها على أنها F1 إلى F4، F1 إلى F5 أو F1 إلى F6، كل إصبع يشتمل على منطقة تعريف حلزونية recognition helix region والتي تتعرف على موقع فرعي target subsite مستهدف حيث يتم اختيار البروتين من المجموعة المتكونة من بروتين يشتمل على مناطق التعريف الحلزونية، يكشف هذا الاختراع التركيبات والطرق للاستخدام في العلاج الجيني gene therapy والمعالجة الوراثية الجينومية genome engineering تحديداً طريقة لمعالجة مريض بحاجة إلى زيادة التعبير عن جين الجلوبين globin gene expression. الشكل (1)



عدد عناصر الحماية (14)، عدد الأشكال (13)

تنظيم يتدخل فيه إنزيم نوكلياز للتعبير الوراثي الجيني

NUCLEASE-MEDIATED REGULATION OF GENE EXPRESSION

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الكشف الحالي بمجال المعالجة الوراثية للجنيوم genome engineering، تحديداً تعديل مستهدف للجينوم بخلية مكوِّنة للدم hematopoietic cell.

عندما يتناول شخص ما جهود عمل المتواليات من الجينوم يكشف أنها أفصحت أن الجينوم البشري يحتوي على ما بين 20.000 و25.000 جين، لكن أقل من 2000 من المنظمات الانتساخية transcriptional regulators، يتضح أن عدد من العوامل ينبغي أن يتفاعل من أجل التحكم في التعبير الوراثي الجيني في جميع المظاهر الزمنية، التطورية والنوعية لنسيج المختلفة منها. يتم التحكم في التعبير الوراثي الجيني بواسطة خليط معقد بشكل كبير من المنظمات الانتساخية العامة والنوعية ويمكن كذلك أن يتم التحكم في التعبير الوراثي بواسطة عناصر حمض الديوكسي ريبونوكلييك DNA deoxyribonucleic acid تؤثر على الموضع سيس. تشتمل عناصر حمض الديوكسي ريبونوكليي DNA المذكورة على كل من عنصر حمض الديوكسي ريبونوكليي DNA الموضعيين مثل المعزز القلبي ومواقع ربط العامل الانتساخي المرتبطة بها كما العناصر البعيدة في صورة معززات، كاتمات، عوازل ومناطق تحكم في الموقع locus control regions (LCRs) (انظر Matson et al (2006) Ann Rev Genome Hum Genet 7: 29-50).

تم أولاً تحديد العناصر المعززة في جينوم فيروسي SV40، وبعد ذلك ظهر في موقع سلسلة ثقيلة من الجلوبولين المناعي البشري human immunoglobulin. وتعرف حالياً بأنها تضطلع بأدوار تنظيمية في التعبير الوراثي عن الكثير من الجينات، يبدو أن المعززات enhancers تؤثر بشكل رئيسي في الأنماط الزمانية والمكانية للتعبير الوراثي عن الجين. وظهر كذلك أن وظيفة المعززات تكون بأسلوب لا يعتمد على المسافة من مقوي القلب للجين، ولا تعتمد على أي من اتجاه متوالية محددة بالنسبة إلى المقوي. يمكن أن تقع المعززات على بعد عدة مئات من كيلو قواعد قبلية أو بعدية من منطقة مقوي قلب، حيث يمكن أن تقع في متوالية إنترون intron، أو حتى تتخطى الطرف 3' من جين.

تم وصف الطرق والتركيبات المختلفة للقطع المستهدف ل حمض الديوكسي ريبونوكليي DNA الجينومي. يمكن أن يتم استخدام حالات القطع المستهدفة المذكورة، على سبيل المثال، لحث التوليد الطفري المستهدف، حث صور الحذف المستهدفة لمتواليات حمض الديوكسي ريبونوكليي DNA الخلوية، وتسهيل عودة الارتباط الجيني recombination المستهدفة في موقع كروموسومي chromosomal locus محدد سلفاً. انظر، مثل، براءة الاختراع الأمريكية أرقام 9,255,250، 9,200,266، 9,045,763، 9,005,973، 9,150,847، 8,956,828، 8,945,868، 8,703,489، 8,586,526، 6,534,261، 6،599,692، 6,503,717، 6,689,558، 7,067,317، 7,262,054، 7,888,121، 7,972,854، 7,914,796، 7,951,925، 8,110,379، 8,409,558 ؛ منشورات براءات الاختراع الأمريكية 20030232410، 20050208489، 20050026157، 20050064474، 20060063231، 20080159996، 201000218264، 20120017290، 20110265198، 20130137104، 20130122591، 20130177983، 20130196373، 20150056705 و 20150335708، والتي تم تضمين الكشوف الخاصة بها كمراجع بأكملها.

تنطوي هذه الطرق عادةً على استخدام أنظمة القطع المعالجة وراثياً لحث كسر جديلة مزدوج double strand break (DSB) أو حز في متوالية حمض الديوكسي ريبونوكليي DNA مستهدفة بحيث أن إصلاح الكسر بواسطة عملية توليد الخطأ مثل ربط طرف غير متجانس non-homologous end joining (NHEJ) أو الإصلاح باستخدام قالب إصلاح (إصلاح موجه بالتجانس homology directed repair أو HDR) يمكن أن يتسبب في تعطيل جين أو إدخال متوالية مقصودة (تكامل مستهدف). يمكن أن يتم كذلك استخدام هذه التقنية لإدخال التغييرات النوعية لموقع في متوالية الجينوم من خلال استخدام أو أوليجو نوكليوتيد مانح، تتضمن إدخال صور الحذف النوعية للمناطق الجينومية، أو من الطفرات النقطية النوعية أو صور التغييرات الموضعية (المعروفة كذلك في صورة تصحيح جيني). يمكن أن يحدث القطع من خلال استخدام إنزيمات نوكلياز نوعية مثل إنزيمات نوكلياز إصبع الزنك المعالج وراثياً zinc finger nucleases (ZFN)، إنزيمات نوكلياز مرسل شبيه بمنشط الاستنساخ transcription-activator like effector nucleases (TALENs)، أو باستخدام نظام Cas/CRISPR بـ tracr RNA/crRNA معالجة وراثياً ('حمض ريبي نووي RNA Ribonucleic Acid توجيهية منفردة') لتوجيه القطع النوعي. كذلك، يتم تطوير إنزيمات نوكلياز مستهدفة على أساس نظام عنقريط (مثل، من T. thermophilus، معروف باسم 'TtAgo'، انظر

Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258–261)، والتي يمكن أن يكون لها كذلك إمكانية للاستخدامات في تنقيح الجينوم والعلاج الجيني.

تعد خلايا الدم الحمراء Red blood cells (RBCs)، أو الكريات الدموية الحمراء، عبارة عن المكون الخلوي الرئيسي للدم. في الحقيقة، تحتل خلايا الدم الحمراء RBCs ربع الخلايا في بشر. تفتقر خلايا الدم الحمراء RBCs الناضجة إلى نوية والكثير من العضيات الأخرى في البشر، وتعد كاملة من خضاب الدم، البروتين المعدني الذي يعمل على حمل الأكسجين إلى الأنسجة كما يحمل ثاني أكسيد الكربون خارج الأنسجة وعودة مرة أخرى إلى الرئتين للإزالة. يعوض هذا البروتين ما يقارب 97% من الوزن الجاف من RBCs ويزيد من قدرة الدم على حمل الأكسجين بحوالي سبعين ضعف. يعد خضاب الدم عبارة عن رباعي وحدات غير متجانس يشتمل على سلاسل جلوبين شبيهة بألفا (α) وسلسلتي جلوبين شبيهة ببيتا (β) و4 مجموعات هيم. في البالغين تتم الإشارة إلى رباعي وحدات α2β2 على أنه خضاب الدم Hemoglobin A (HbA) A أو خضاب الدم للبالغين. بشكل معتاد، يتم تخليق سلاسل ألفا وبيتا في نسبة تقريباً 1: 1 وتبدو هذه النسبة حيوية من حيث خضاب الدم وثبات RBC. في جنين متطور، يتم إنتاج صورة مختلفة من خضاب الدم، خضاب الدم الجنيني (HbF)، والذي له آلفة ارتباط مرتفعة للأكسجين مقارنة بخضاب الدم (A) بحيث يمكن أن يتم توصيل الأكسجين إلى نظام الطفل من خلال مجرى دم الأم. يوجد جينان يشفرا الجلوبين الجنيني متشابهان في المتوالية ويصطلح عليهما HPG1 (مشار إليهما باسم Ggamma) و HPG2(Agamma). يحتوي كذلك بروتين خضاب الدم الجنيني على سلسلتي جلوبين α، لكن محل سلاسل جلوبين β البالغة، يكون بها اثنتين من سلاسل جلوبين (γ) جاما جنينية (أي، يكون خضاب الدم الجنيني عبارة عن α2γ2). عند تقريباً 30 أسبوع من الاهتضام، يبدأ تخليق جلوبين جاما في الجنين في الانخفاض بينما يزداد جلوبين بيتا. عند تقريباً 10 أشهر من العمر، يعد خضاب الدم لحديث الولادة عبارة جميعه عن α2β2 على الرغم من أن بعضاً من الهيموغلوبين HbF F يظل في البالغين (تقريباً 1–3% من خضاب الدم الكلي). يعد تنظيم التحول من إنتاج جلوبين جاما إلى بيتا معقد تماماً، وينطوي أولاً على نقص متحكم فيه لاستنساخ جلوبين جاما بزيادة متحكم فيها متزامنة باستنساخ جلوبين بيتا.

يمكن أن تكون العيوب الوراثية في المتواليات التي تشفر سلاسل خضاب الدم مسئولة عن عدد من الأمراض المعروفة باسم الاعتلالات الهيموجلوبينية hemoglobinopathies، المتضمنة فقر الدم بالخلية المنجلية وثَلاسيمِيَّة. في أغلي المرضى الذين يعانون من الاعتلالات الهيموجلوبينية، تظل

الجينات التي تشفر جلوبين جاما موجودة، لكن التعبير الوراثي يعد منخفض نسبياً نتيجة الكبح الجيني المعتاد حول الولادة كما هو موصوف أعلاه.

تُشير التقديرات إلى أن 1 من بين 5000 شخص في الولايات المتحدة يحملون مرض الخلايا المنجلية sickle cell disease (SCD)، معظمهم من سكان أفريقيا جنوب الصحراء الكبرى. يبدو أن هناك فائدة للمواد الحاملة غير متجانسة الزيجوت بطفرة الخلية المنجلية للحماية من الملاريا، لذلك قد تكون هذه السمة قد تم اختيارها بشكل إيجابي مع مرور الزمن، حيث تشير التقديرات إلى أن ثلث السكان في أفريقيا جنوب الصحراء الكبرى يحملون سمة الخلايا المنجلية. ينتج مرض الخلايا المنجلية عن طفرة في جين جلوبين β وكنتيجة له يتم استبدال فالين بحامض الجلوتاميك في حمض أميني رقم 6 (GAG إلى GTG في مستوى الحمض الديوكسي ريبونوكليي DNA)، حيث يشار إلى الهيموجلوبين الناتج "خضاب الدم S" أو " HbS". في حالات الأكسجين الأكثر انخفاضاً، تُعرض الإزاحة البنيوية في صورة الديوكسي من HbS ضمادة غير آلفة للماء للبروتين بين المناطق الحلزونية E وF. يكون بمقدور الوحدات البنائية غير الآلفة للماء من الفالين عند موضع 6 من سلسلة البيتا في الهيموجلوبين الارتباط بالضمادة غير الآلفة للماء، مما يتسبب في تراكم جزيئات HbS وتكوين رواسب ليفية. تتسبب هذه التراكمات بدورها في تشوه خلايا الدم الحمراء RBCs أو اتخاذها للشكل المنجلي، مما يؤدي إلى فقدان مرونة الخلايا. من ثم لا تكون خلايا الدم الحمراء RBCs التي تتخذ شكلاً منجلياً قادرة على الانضغاط داخل الطبقات الشعرية ويمكن أن ينتج عنها انسداد الأوعية الدموية في مرضى داء كريات الخلايا المنجلية. بالإضافة إلى ذلك، تكون RBCs المصابة بداء كريات الخلايا المنجلية أكثر هشاشة من خلايا الدم الحمراء RBCs الطبيعية، وتميل نحو انحلال الدم، مما يؤدي في النهاية إلى فقر الدم لدى المريض.

علاج وإدارة مرضى بداء كريات الخلايا المنجلية sickle cell هو افتراض قائم مدى الحياة يشمل العلاج بالمضادات الحيوية، وإدارة الألم، وعمليات نقل الدم خلال الحلقات الحادة. يتمثل أحد المناهج في استخدام هيدروكسي يوريا hydroxyurea، الذي يمارس آثاره جزئياً من خلال زيادة إنتاج جلوبين جاما. لا تزال الآثار الجانبية طويلة الأمد للعلاج بالهيدروكسي يوريا المزمن غير معروفة، ولكن، يعطي العلاج آثاراً جانبية غير مرغوب فيها ويمكن أن يكون له فعالية متغيرة من مريض لمريض. على الرغم من زيادة فعالية علاجات بداء كريات الخلية المنجلية، فإن متوسط العمر المتوقع للمرضى لا يزال فقط في منتصف إلى أواخر 50 عاماً، ويكون للأمراض المصاحبة للمرض تأثيراً عميقاً على جودة حياة المريض.

أمراض الثَلاسيمِيَّة Thalassemias هي أيضا أمراض تتعلق بالهيموجلوبين وعادة ما تنطوي على تعبير وراثي منخفض عن سلاسل جلوبين. يمكن أن يحدث هذا من خلال طفرات في المناطق التنظيمية للجينات أو من طفرة في متوالية تشفير جلوبين ينتج عنها تعبير وراثي منخفض أو مستويات منخفضة أو بروتين وظيفي من جلوبين. ترتبط أمراض الثَلاسيمِيَّة ألفا بشكل رئيسي بسكان غرب أفريقيا والمنحدرين من أصل آسيوي، ويمكن أن تكسب مناعة ضد الملاريا. ترتبط أمراض الثَلاسيمِيَّة بيتا بشكل رئيسي بسكان من أصل البحر الأبيض المتوسط، وعادة من اليونان والمناطق الساحلية من تركيا وإيطاليا. في الثَلاسيمِيَّة المنخفضة، واحد فقط من مركبات الأليل جلوبين β يحمل طفرة. سيعاني الأفراد من فقر الدم المصغر، وعادة ما يتضمن الكشف أقل من الحجم الجسيمي الرئيسي الطبيعي (<80 فمتو لتر). تكون مركبات الأليل بالخاضعين المصابين بالثَلاسيمِيَّة المنخفضة عبارة عن β+/β أو β0/β (حيث تشير " β+" إلى مركبات الأليل alleles التي تسمح بمقدار ما بحدوث تكوين سلسلة β، وتشير "β" إلى مركبات أليل جلوبين β globin alleles من نوع غير معالج، وتشير "β0" إلى طفرات جلوبين β globin mutations تشتمل على صورة ما من الحذف). غالباً ما يكون من الممكن للخاضع للثَلاسيمِيَّة المتوسطة أن يعيش حياة طبيعية ولكنه قد يحتاج إلى نقل الدم بين الحين والآخر، وخاصة في أوقات المرض أو الحمل، حسب شدة فقر الدم لديهم. يمكن أن تكون مركبات الأليل لدى هؤلاء المرضى عبارة عن β+/β+ أو β+/βo. تحدث الثَلاسيمِيَّة العُظمى عندما يكون لمركبي الأليل طفرات من الثَلاسيمِيَّة. هذا هو فَقْرُ الدَّمِ الصَّغيرُ الكُرَيَّات الشديد و فقر الدم ناقص الصباغ. يؤدي عدم علاجه، إلى فقر الدم، تضخم الطحال وتشوهات العظام الشديدة. مما يتسبب في الوفاة قبل عُمر 20 عاماً. يتكون العلاج من نقل الدم بشكل دوري؛ استئصال الطحال لتضخم الطحال و المعالجة الخالبية لحمل زائد من الحديد ناجم عن نقل الدم. كذلك يتم استخدام عمليات زراعة النخاع لعلاج الأشخاص الذين يعانون من الثَلاسيمِيَّة الشديدة في حال القدرة على تحديد مانح مناسب، ولكن يمكن أن يكون لمقل هذا الإجراء مخاطر كبيرة.

يتمثل أحد المناهج التي تم اقتراحها لعلاج كل من مرض الخلايا المنجلية SCD وأمراض ثَلاسيمِيَّة بيتا هو في زيادة التعبير الوراثي عن جلوبين جاما بهدف الحصول على HbF الذي يحل وظيفياً محل خضاب الدم للبالغين الزائغ. كما ذُكر أعلاه، يعتقد أن علاج مرضى الخلايا المنجلية SCD بهيدروكسي يوريا ناجح جزئياً بسبب تأثيره على زيادة التعبير الوراثي عن جلوبين جاما. المجموعة الأولى من المركبات التي تم اكتشافها للتأثير على نشاط إعادة تنشيط جلوبين جاما هي عقاقير سامة للخلايا. تم أولاً توضيح القدرة على التسبب في التخليق الجديد لجلوبين جاما بواسطة المعالجة

الصيدلانية باستخدام 5- آزاسيتيدين في حيوانات تجارب (DeSimone (1982) Proc Nat'l Acad Sci USA 79(14):4428-31). أكدت الدراسات اللاحقة قدرة 5- آزاسيتيدين على زيادة HbF في المرضى الذين يعانون من β ثَلاسيمِيَّة ومرض كريات الخلايا المنجلية (Ley, et al., (1982) N. Engl. J. Medicine, 307: 1469-1475, and Ley, et al., (1983) Blood 62: 370-380). بالإضافة إلى ذلك، تم توضيح الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة (مثل البيوتيرات ومشتقاتها) في نظم التجريبية لزيادة HbF (Constantoulakis et al., (1988) Blood 72(6):1961-1967). أيضا، هناك شريحة من السكان البشريين يحملون حالة تعرف باسم "استدامة الهيموجلوبين الجنيني الوراثية " Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin' (HPFH) حيث تستمر كميات مرتفعة من HbF في البالغين HPFH (10-40% في زيجوت متغايرة heterozygotes استدامة الهيموجلوبين الجنيني الوراثية (أنظر Thein et al (2009) Hum. Mol. Genet 18 (R2): R216-R223). وهذه حالة نادرة، ولكن في غياب أي تشوهات مرتبطة بجلوبين بيتا، لا ترتبط مع أي مظاهر سريرية دلالية، حتى عندما يكون 100٪ من هيموجلوبين الفرد عبارة عن HbF. عندما يكون لدى الأفراد المصابين بَثلاسيمِيَّة بيتا beta thalassemia وأيضا لديهم عارض مشترك من استدامة الهيموجلوبين الجنيني الوراثية co-incident HPFH، فإن التعبير الوراثي عن HbF يمكن أن يقلل من شدة المرض. وعلاوة على ذلك، فإن شدة المسار الطبيعي لمرض كريات الخلايا المنجلية يمكن أن يختلف بشكل كبير من مريض إلى مريض، وهذا التباين، في جزء منه، يمكن أن يعزى إلى حقيقة أن بعض الأفراد الذين يعانون من المرض بشكل أقل يعبرون وراثياً عن مستويات أعلى من HbF.

يوجد منهج واحد لزيادة التعبير الوراثي عن HbF يتضمن تحديد الجينات التي تلعب منتجاتها دوراً في التحكم في التعبير الوراثي عن جلوبين جاما. أحد هذه الجينات هو BCL11A، تم تحديده لأول مرة بسبب دوره في تطور الخلايا الليمفاوية. يشفر BCL11A بروتين إصبع الزنك الذي يُعتقد أنه يشارك في التنظيم النوعي لمرحلة النمو المحددة للتعبير الوراثي عن جلوبين جاما. يتم التعبير الوراثي عن BCL11A في خلايا السلائف الحمرية البالغة ويؤدي الخفض بشكل متحكم به للتعبير الوراثي عنها إلى زيادة في الوراثي عن جلوبين جاما. بالإضافة إلى ذلك، يبدو أن الربط بين BCL11A mRNA متحكم بنموه. في الخلايا الجنينية، يبدو أن متغيرات BCL11A mRNA الأقصر، والمعروفة باسم متغيرات BCL11A-S و BCL11A-XS يتم التعبير الوراثي عنها بشكل أساسي، بينما في الخلايا البالغة، يتم التعبير عن المتغيرات BCL11A-L و BCL11A-XL mRNA الأطول. *أنظر*، Sankaran et al (2008) Science 322 p. 1839. يبدو أن البروتين BCL11A يتفاعل مع

موضع جلوبين بيتا لتغيير بنيته وبالتالي تعبيره الوراثي في مراحل النمو المختلفة. وقد تم اقتراح استخدام RNA المستهدفة لجين BCL11A (أنظر، على سبيل المثال، منشور رقم براءة الاختراع الأمريكي رقم 20110182867) ولكن هذه التقنية بها العديد من أوجه النقص المحتملة، وهي أنه لا يمكن التغلب عليها بشكل كامل، قد يمثل توصيل مثل هذه RNAs مشكلة، ويجب أن يكون RNAs متواجداً بشكل مستمر، مما يتطلب علاجات متعددة على مدى الحياة.

يوفر استهداف متواليات معززة لـ BCL11A آلية لزيادة HbF. *أنظر، على سبيل المثال*، منشور رقم براءة الاختراع الأمريكي رقم 20150132269. وقد حددت الدراسات على الجينوم واسعة النطاق مجموعة من الاختلافات الجينية في BCL11A التي ترتبط مع زيادة مستويات HbF. هذه الاختلافات عبارة عن مجموعة من SNPs الموجودة في المناطق غير المشفرة من BCL11A التي تعمل كمرحلة نوعية، منطقة معززة مقيدة للسلالات. كشف المزيد من التحقيقات عن أن هذا المعزز لـ BCL11A يكون مطلوباً في خلايا حمراء للتعبير الوراثي عن BCL11A، لكنه غير مطلوب بالنسبة لتعبيره الوراثي في الخلايا ب (أنظر Bauer et al, (2013) Science 343:253-257). تم العثور على المنطقة المعززة داخل إنترون 2 من الجين BCL11A، وتم تحديد ثلاثة مناطق من فرط الحساسية لـ DNAseI (غالبا ما تشير إلى حالة الكروماتين المرتبطة بإمكانية التحكم) في إنترون 2. تم تحديد هذه المناطق الثلاث كـ "+62"، "+58" و "+55" وفقاً للمسافة بالكيلو من موقع بدء نسخ BCL11A. هذه المناطق المعززة هي تقريباً 350 (+55)؛ 550 (+58)؛ و 350 (+62) النيوكليوتيدات في الطول (Bauer 2013, ibid).

بالتالي، تظل هناك حاجة إلى طرق وتركيبات إضافية لتغيير التعبير الوراثي عن جين BCL11A على سبيل المثال لمعالجة اعتلالات هيموجلوبينية hemoglobinopathies مثل داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة وثَلاسيمِيَّة بيتا.

الإسناد المرجعي للطلبات ذات الصلة

يستند الطلب الحالي إلى أسبقية الطلب المؤقت بالولايات المتحدة الأمريكية رقم 62/160.396 المودع في 12 مايو 2015، والطلب المؤقت بالولايات المتحدة الأمريكية رقم 62/303.595، المودع في 4 مارس 2016، والذي يتم تضمين الكشوف الخاصة بها في هذا الطلب كمراجع بأكملها.

<u>الوصف العام للاختراع</u>

يصف الاختراع الحالي التركيبات والطرق للاستخدام في العلاج الجيني والمعالجة الوراثية الجينومية. تحديداً، تتعلق الطرق والتركيبات الموصوفة في إخماد (مثل، بواسطة الإبطال الكامل أو الجزئي للتعبير الوراثي الخاص به) جين BCL11A، على سبيل المثال جين يؤثر في صورة منظم لواحد أو أكثر من الجينات الإضافية. تحديداً، يصف الاختراع الطرق والتركيبات للتدخل مع وظيفة المعزز في جين BCL11A لخفض أو تعطيل نشاطه في سلالات الخلايا النوعية. بشكل إضافي، يوفر الاختراع الطرق والتركيبات للتدخل مع وظائف معززة BCL11A حيث لا تقع المتواليات المعززة داخل جين BCL11A. يتسبب النقص المتحكم فيه الناتج لجين BCL11A في هذه الظروف بدوره في التعبير الوراثي المتزايد عن جلوبين جاما.

في بعض الجوانب، يشتمل الاختراع على بروتين إصبع زنك غير ناشئ طبيعياً يشتمل على بروتين إصبع الزنك (ZFP) يشتمل على 4، 5 أو 6 أصابع، كل إصبع يشتمل على منطقة حلزونية للتعرف والتي تتعرف على موقع فرعي مستهدف حيث تشتمل المناطق الحلزونية للتعرف على المتواليات بالترتيب الوارد في صف منفرد بالجدول 1. في تجسيدات معينة، يشتمل ZFP على مناطق حلزونية للتعرف كما هو موضح في الجدول 1 للبروتينات المعرفة كالتالي: 51446، 51463، 51484، 51856، 51857 أو 51862 (والتي ترتبط بالموقع المستهدف الموضح في المتوالية رقم: 1) و51536، 51949، 51990، 51993، 51979، 51982، 52015، 52032 (والتي ترتبط بالموقع المستهدف الموضح في المتوالية رقم: 12). بالتالي، في تجسيدات معينة، يتم في هذا الطلب توفير بروتين إصبع الزنك يتضمن المناطق الحلزونية للتعرف التالية:

(1) F1: STGNLTN (المتوالية رقم: 7)؛

F2: TSGSLTR (المتوالية رقم: 5)؛

F3: DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)؛ و

F4: AQCCLFH (المتوالية رقم: 6)؛ أو

(2) F1: DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)؛

F2: RPYTLRL (المتوالية رقم: 3)؛

F3: SRGALKT (المتوالية رقم: 8)؛

F4: TSGSLTR (المتوالية رقم: 5)؛

F5: DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)؛ و

F6: AQCCLFH (المتوالية رقم: 6)؛

(3) F1: DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)؛

F2: RNFSLTM (المتوالية رقم: 9)؛

F3: SNGNLRN (المتوالية رقم: 10) أو STGNLTN (المتوالية رقم: 7) أو SSYNLAN (المتوالية رقم: 11)؛

F4: TSGSLTR (المتوالية رقم: 5)؛

F5: DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)؛ و

F6: AQCCLFH (المتوالية رقم: 6)؛ أو

(4) F1: RSDHLTQ (المتوالية رقم: 13)؛

F2: QSGHLAR (المتوالية رقم: 14)؛

F3: QKGTLGE (المتوالية رقم: 15)؛

F4: RHRDLSR (المتوالية رقم: 18)؛ و

F5: RRDNLHS (المتوالية رقم: 17)؛ أو

(5) F1: RNDHRTT (المتوالية رقم: 19)؛

F2: QKAHLIR (المتوالية رقم: 20)؛

F3: QKGTLGE (المتوالية رقم: 15)؛

F4: RGRDLSR (المتوالية رقم: 21) أو LKRTLKR (المتوالية رقم: 25)؛ و

F5: RRDNLHS (المتوالية رقم: 17)؛ أو

(6) F1: RSDHLTQ (المتوالية رقم: 13)؛

F2: QRAHLTR (المتوالية رقم: 22)؛

F3: QKGTLGE (المتوالية رقم: 15) أو QSGTRNH (المتوالية رقم: 24)؛

F4: HRNTLVR (المتوالية رقم: 23)؛ و

F5: RRDNLHS (المتوالية رقم: 17)؛ أو

(7) F1: RSDHLTQ (المتوالية رقم: 13)؛

F2: QKAHLIR (المتوالية رقم: 20)؛

F3: QKGTLGE (المتوالية رقم: 15) أو QSGTRNH (المتوالية رقم: 24)؛

F4: RGRDLSR (المتوالية رقم: 21)؛ و

F5: RRDNLHS (المتوالية رقم: 17)؛ أو

(8) F1: F1: RSDHLTQ (المتوالية رقم: 13)؛

F2: QSGHLAR (المتوالية رقم: 14)؛

F3: QSGTRNH (المتوالية رقم: 24)؛

F4: QSSDLSR (المتوالية رقم: 16)؛ و

F5: RRDNLHS (المتوالية رقم: 17).

في تجسيدات معينة، يتم اندماج بروتينات إصبع الزنك كما هي موصوفة في هذا الطلب مع نطاق وظيفي (مثل، نطاق تنشيط نسخي، نطاق كبح نسخي، نطاق قطع (لتكوين إنزيم نوكلياز إصبع الزنك)، وهكذا). يمكن أن يتم استخدام إنزيمات نوكلياز إصبع الزنك في أزواج الديمرة للقطع عند أو بالقرب من واحد أو كلا الموقعين المستهدفين لـ ZFNs من الزوج، على سبيل المثال يمكن أن يشكل

"شركاء اليسار" بالجدول 1 (مثل، 51446، 51463، 51484، 51856، 51857، أو 51862) دايمرات مع "شركاء اليمين" بالجدول 1 (مثل، 51536، 51949، 51990، 51993، 51979، 51982، 52015، أو 52032) لقطع متواليات معززة BCL11A.

في جانب آخر، يشتمل الاختراع على توصيل إنزيم نوكلياز واحد على الأقل (مثل، إنزيم نوكلياز يرتبط بمتوالية معززة من BCL11A) إلى خلية جذعية بشرية أو خلية منتجة لغيرها (PC/HSC) لأغراض المعالجة الوراثية الجينومية. في تجسيدات معينة، يشتمل إنزيم النوكلياز على بروتين إصبع الزنك (ZFP) يشتمل على 4، 5 أو 6 أصابع، كل إصبع يشتمل على منطقة حلزونية للتعرف والتي تتعرف على موقع فرعي مستهدف حيث تشتمل المناطق الحلزونية للتعرف على المتواليات بالترتيب الموضح في صف منفرد بالجدول 1. يمكن كذلك أن يشتمل إنزيم (إنزيمات) النوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب على رابط (مثل، بين نطاق ربط DNA ونطاق القطع)، على سبيل المثال رابط كما هو موضح في المتواليات ذات أرقام الهوية:26-29 ومنشور البراءة الأمريكية رقم 20150132269.

في بعض التجسيدات، يتم توصيل إنزيم النوكلياز في صورة ببتيد، بينما في أخرى يتم توصيله في صورة حمض نووي يشفر إنزيم النوكلياز الواحد على الأقل. في بعض التجسيدات، يتم استخدام إنزيم نوكلياز واحد. في بعض التجسيدات المفضلة، يعد الحمض النووي الذي يشفر إنزيم النوكلياز عبارة عن mRNA، وفي بعض الأمثلة، تتم حماية mRNA. في بعض الجوانب، يمكن أن يتم كيميائياً تعديل mRNA (انظر على سبيل المثال Kormann et al, (2011) Nature Biotechnology 29(2):154-157). في جوانب أخرى، يمكن أن يشتمل mRNA على غطاء ARCA (انظر البراءتين الأمريكيتين 7.074.596 و 8.153.773). في تجسيدات أخرى، يمكن أن تشتمل mRNA على خليط من نوكليوتيدات غير معدلة ومعدلة (انظر منشور البراءة الأمريكية رقم 2012/0195936). في تجسيد مفضل، يتم توصيل الحمض النووي الذي يشفر إنزيم (إنزيمات) النوكلياز إلى PC/HSC من خلال النقل الكهربي. في بعض التجسيدات، ينقطع إنزيم النوكلياز في أو بالقرب من موقع الربط لعامل الاستنساخ. في بعض الجوانب، يعد عامل الاستنساخ GATA-1.

في جوانب أخرى، يشتمل الاختراع على خلية أو سلالة خلية يتم فيها تعديل متوالية معززة من BCL11A داخلية المنشأ جينياً بواسطة إنزيم نوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب (مثل، الموضح في الجدول 1)، على سبيل المثال بالمقارنة مع متوالية النوع غير المعالج من الخلية. تعد الخلايا

المعدلة باستخدام إنزيم النوكلياز أو سلالات الخلية كما هو موصوف في هذا الطلب قابلة للتمييز من حيث البنية و/أو الوظيفة عن كل من خلايا من النوع غير المعالج والخلايا المعدلة الأخرى (التي يتدخل فيها إنزيم النوكلياز). يمكن أن تكون الخلية المعدلة وراثياً أو سلالات الخلايا غير متجانسة الزيجوت أو متجانسة الزيجوت للتعديل. يمكن أن تشتمل التعديلات على إدخالات (مثل، إدخال جين ناقل)، صور الحذف و/أو توليفات منها. في بعض التجسيدات المفضلة، تتسبب الإدخالات، صور الحذف و/أو توليفات منها في تدمير موقع ربط عامل استنساخ. في تجسيدات معينة، يكون التعديل عند أو بالقرب من موقع (مواقع) الربط و/أو القطع لإنزيم (إنزيمات) النوكلياز، على سبيل المثال، داخل 1–300 (أو أي قيمة بينها) أزواج قاعدة قبلية أو بعدية عن الموقع (المواقع) الخاصة بالقطع، بشكل أكثر تفضيلاً داخل 1–100 من أزواج القاعدة (أو أي قيمة بينها) لأي جانب من موقع (مواقع) الربط و/أو القطع الموضحة في الجدول 1، بشكل مفضل أكثر حتى داخل 1 إلى 50 من أزواج القاعدة (أو أي قيمة بينها) على أي جانب من موقع (مواقع) الربط و/أو القطع. يمكن كذلك أن يتضمن التعديل تعديلات على واحد أو أكثر من لنوكليوتيدات في القطع و/أو في واحد أو أكثر من مواقع الربط. في تجسيدات معينة، لا يتم تعديل واحد أو أكثر من موقع (مواقع) مستهدف لإنزيم النوكلياز. في تجسيدات أخرى، يتم تعديل واحد على الأقل من المواقع المستهدفة لإنزيم (إنزيمات) النوكلياز. في تجسيدات معينة، يكون التعديل عند أو بالقرب من منطقة "58+" من معزز BCL11A، على سبيل المثال، في أو بالقرب من موقع ربط نوكلياز موضح في أي من المتوالية رقم: 1 والمتوالية رقم: 12. يمكن أن يتم تعديل أي خلية أو سلالة خلية بواسطة إنزيمات النوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب، على سبيل المثال خلية جذعية (خلية جذعية مكوِّن للدم مثل خلية جذعية مكونة للدم +CD34) أو خلية دم حمراء (RBC) خلية منتجة لغيرها. يتم كذلك وصف الخلايا أو سلالات الخلايا التي تم الحصول عليها بعد التعديل بواسطة إنزيم نوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب، على سبيل المثال الخلايا أو سلالات الخلايا المشتقة من خلية معدلة بإنزيم نوكلياز أو سلالة الخلايا. يتم كذلك توفير الخلايا المتمايزة جزئياً أو كلياً المشتقة من الخلايا الجذعية المعدلة كما هو موصوف في هذا الطلب (مثل، خلايا منتجة لغيرها خلايا دم حمراء RBCs أو خلية دم حمراء RBC). يمكن أن يتم نشر الخلايا المشتقة من الخلايا المعدلة بإنزيم النوكلياز (و/أو تمايزها) في المعمل (مزرعة) أو يمكن أن تتمايز داخل خاضع حي، على سبيل المثال بعد الإعطاء خارج الجسم الحي لخلية جذعية معدلة بإنزيم النوكلياز. يمكن أن تظهر أي من الخلايا المعدلة وراثياً أو سلالات الخلايا التي تم الكشف عنها في هذا الطلب التعبير الوراثي المتزايد عن جلوبين جاما. يتم كذلك توفير التركيبات مثل تركيبات تشتمل على الخلايا المعدلة وراثياً كما هو موصوف في هذا الطلب.

في جوانب أخرى، يشتمل الاختراع على توصيل حمض نووي مانح إلى خلية مستهدفة للحصول على خلية معدلة وراثياً يتم فيها دمج المانح في الخلية. يمكن أن يتم توصيل المانح قبل، بعد، أو مع الحمض النووي الذي يشفر إنزيم (إنزيمات) النوكلياز بالجدول 1. يمكن أن يشتمل الحمض النووي المانح على متوالية خارجية المنشأ (جين ناقل) مراد دمجه في جينوم الخلية، على سبيل المثال، موقع داخلي المنشأ. في بعض التجسيدات، يمكن أن يشتمل المانح على جين كامل الطول أو شظية منه مجانحة بواسطة مناطق التجانس مع موقع القطع المستهدف. في بعض التجسيدات، يفتقر المانح إلى المناطق المتجانسة ويتم دمجه في موقع مستهدف من خلال آلية مستقلة للتجانس (*أي* ربط طرف غير متجانس non-homologous end joining (NHEJ)). يمكن أن يشتمل المانح على أي متوالية حمض نووي، على سبيل المثال حمض نووي والذي، عند استخدامه كركيزة لإصلاح موجه بالتجانس لكسر مزدوج الجديلة مستحث بإنزيم النوكلياز، يؤدي إلى حذف نوعي لمانح مراد توليده في الموقع الكروموسومي ذاتي المنشأ (مثل، منطقة معززة BCL11A) أو، بشكل بديل (أو بالإضافة إلى)، صور أليلية جديدة من (مثل، الطفرات النقطية التي تزيل موقع ربط عامل استنساخ) الموقع ذاتي المنشأ المراد إنشاؤه. في بعض الجوانب، يعد الحمض النووي المانح عبارة عن أوليجونوكليوتيد حيث يؤدي الدمج إلى حالة تصحيح جيني، أو حذف مستهدف.

في جوانب أخرى، يتم توصيل إنزيم النوكلياز و/أو المانح (كليهما) بواسطة طرق نقل الجين الفيروسي و/أو غير الفيروسي. في تجسيدات مفضلة، يتم توصيل المانح إلى الخلية من خلال فيروس مرتبط بالغدة adeno-associated virus (AAV). في بعض الأمثلة، يشتمل الفيروس المرتبط بالغدة AAV على LTRs التي تكون من نمط مصلي غير متجانس بالمقارنة مع النمط المصلي الغلافي البروتيني.

في بعض الجوانب، يتم عمل صور حذف تشتمل على مناطق داخل المناطق فائقة الحساسية DNAseI من المعزز (مثل، المنطقة +58 من معزز BCL11A) باستخدام واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز كما هو موضح في الجدول 1. يمكن أن تشتمل هذه الصور من الحذف على ما يتراوح من حوالي 1 نوكليوتيد إلى حوالي 551 نوكليوتيد. بالتالي، يمكن أن تشتمل صور الحذف على، 1، 5، 10، 15، 20، 25، 30، 40، 50، 100، 150، 200، 250، 300، 350، 400، 450، 500، 550 نوكليوتيد، أو أي قيمة بينها. في بعض التجسيدات، تشتمل صور الحذف على مناطق ربط لواحد أو أكثر من عوامل الاستنساخ. في بعض التجسيدات المفضلة، تشتمل صور الحذف على موقع ربط GATA-1، أو موقع الربط لـ GATA-1 في توليفة مع عوامل أخرى.

في بعض التجسيدات، يتم اندماج نطاقات ارتباط DNA بالجدول 1 مع نطاق وظيفي. تتضمن بعض الجوانب اندماج لنطاقات ارتباط DNA مع نطاقات قادرة على تنظيم التعبير الوراثي عن جين. في بعض التجسيدات، تشتمل بروتينات الاندماج على نطاق ربط DNA بالجدول 1 مندمج مع نطاق تعديلي للتعبير الوراثي عن جين حيث يكبح عامل التعديل التعبير الوراثي عن الجين.

في بعض التجسيدات، يتم تلامي خلايا PC/HSC مع إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA من الاختراع (أي، ZFPs كما هو موضح في الجدول 1). في بعض التجسيدات، يتم توصيل إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA في صورة أحماض نووية وفي تجسيدات أخرى، يتم توصيلها في صورة بروتينات. في بعض التجسيدات، تعد الأحماض النووية عبارة عن mRNAs تشفر إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA، وفي تجسيدات أخرى، يمكن أن تتم حماية mRNAs. في بعض التجسيدات، يمكن أن يتم بشكل كيميائي تعديل mRNA، يمكن أن يشتمل على غطاء ARCA و/أو يمكن أن يشتمل على خليط من النوكليوتيدات غير المعدلة والمعدلة. يتم كذلك توفير خلايا أو سلالات خلايا مشتقة من تلك الخلايا، تتضمن خلايا متمايزة جزئياً أو كلياً.

في بعض الجوانب، يتم تلامس خلايا PC/HSC مع إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA وفق الاختراع خارج الجسم الحي، بعد فِصادَة PC/HSC من خاضع، أو تنقية من النخاع العظمي الذي تم تجميعه. في بعض التجسيدات، تتسبب إنزيمات النوكلياز الموصوف في هذا الطلب في التعديلات داخل المناطق المعززة من BCL11A، على سبيل المثال خلية معدلة وراثياً ناتجة تعد مميزة بنيوياً و/أو وظيفياً من الخلايا من النوع غير المعالج و/أو المعدلة الأخرى (مثل، معدلة في إنزيم النوكلياز). في تجسيدات أخرى، يتم إدخال PC/HSC تحتوي على تعديلات المنطقة المعززة BCL11A مرة أخرى في الخاضع. في بعض الأمثلة، يتم تمديد PC/HSC تحتوي على تعديلات المنطقة المعززة BCL11A قبل الإدخال. في جوانب أخرى، يتم إعطاء PCs/HSC المعدل وراثياً إلى الخاضع في زراعة النخاع العظمي حيث يتمايز طعم PC/HSC، وينضج في الجسم الحي. في بعض التجسيدات، يتم عزل PC/HSC من الخاضع بعد G-CSF- و/أو التحريك المستحث بواسطة بليريكسافور (Plerixafor)، وفي أخرى، يتم عزل الخلايا من نخاع العظم البشري أو الأحبال السرية البشرية. في بعض الجوانب، تتم معالجة الخاضع حتى إجراء تنقي العظم المتوسط قبل إدخال الطعم المشتمل على PC/HSC المعدلة، بينما في جوانب أخرى، تتم معالجة الخاضع بنظام تهيئة نقوي للعظام شديد. في بعض التجسيدات، يتم استخدام الطرق والتركيبات وفق الاختراع لمعالجة اعْتِلاَل

هيموجلوبيني أو الوقاية منه. في بعض الجوانب، يعد الاعْتِلاَل الهيموجلوبيني عبارة عن ثَلاسيمِيَّة بيتا، بينما في جوانب أخرى، يعد الاعْتِلاَل الهيموجلوبيني عبارة عن داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة.

في بعض التجسيدات، يتم كذلك تلامي PC/HSC مع جزيء مانح. في بعض التجسيدات، يتم توصيل الجزيء المانح بواسطة ناقل فيروسي. يمكن أن يشتمل الجزيء المانح على واحد أو أكثر من المتواليات التي تشفر بولي ببتيد وظيفي (مثل، cDNA أو شظية منه)، مع مقوي أو دونه. يمكن أن يتم تضمين متواليات إضافية (متواليات مشفرة أو غير مشفرة) عندما يتم استخدام جزيء مانح للإخماد، تتضمن لكنها لا تنحصر في، متواليات تشفر ببتيد 2A، موقع SA، IRES، وهكذا.

في أحد الجوانب، تشتمل الطرق والتركيبات وفق الاختراع على طرق لتلامس PC/HSC في الجسم الحي. يتم توصيل إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA إلى PC/HSC في الموقع بواسطة الطرق المعروفة في المجال. في بعض التجسيدات، تشتمل إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA وفق الاختراع على جسيم فيروسي يتم إعطاءه إلى الخاضع الذي بحاجة، بينما في أخرى، تشتمل إنزيمات النوكلياز و/أو بروتينات ربط DNA على جسيم بحجم النانو (مثل جسيم شحمي). في بعض التجسيدات، يتم توصيل الجسيمات الفيروسية و/أو الجسيمات التي بحجم النانو إلى العضو (مثل نخاع العظم) حيث تستقر PC/HSC.

في جانب آخر، يتم في هذا الطلب وصف طرق دمج حمض نووي مانح في جينوم خلية من خلال آليات مستقلة عن التجانس. تشتمل الطرق على تكوين كسر مزدوج الجديلة double-stranded break (DSB) في جينوم خلية وقطع الجزيء المانح باستخدام إنزيم نوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب، بحيث أنه يتم دمج الحمض النووي المانح في موقع DSB. في تجسيدات معينة، يتم دمج الحمض النووي المانح من خلال الطرق المعتمدة على عدم التجانس (مثل ربط طرف غير متجانس NHEJ). كما لوحظ أعلاه، عندما يتم القطع داخل الخلية يمكن أن يتم دمج المتواليات المانحة بأسلوب مستهدف في جينوم خلية في موقع كسر مزدوج الجديلة DSB. يمكن أن تتضمن المتوالية المانحة واحد أو أكثر من مواقع الاستهداف المتشابهة لواحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز المستخدمة لتكوين كسر مزدوج الجديلة DSB. بالتالي، يمكن أن يتم قطع متوالية المانح بواسطة واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز المتشابهة المستخدمة لقطع الجين ذاتي المنشأ الذي يكون فيه الدمج مرغوباً. في تجسيدات معينة، تتضمن المتوالية المانحة مواقع استهداف إنزيم النوكلياز مختلفة عن إنزيمات النوكلياز المستخدمة لحث كسر مزدوج الجديلة DSB. يمكن أن يتم تكوين كسر مزدوج الجديلة

DSBs في جينوم الخلية المستهدفة بواسطة أي آلية. في تجسيدات معينة، يتم تكوين كسر مزدوج الجديلة DSB بواسطة واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز لإصبع الزنك (ZFNs)، بروتينات الاندماج التي تشتمل على نطاق ربط إصبع الزنك، والتي تتم معالجتها وراثياً لربط متوالية داخل المنطقة المقصودة، ونطاق قطع أو نطاق نصفي للقطع.

في أحد الجوانب، يمكن أن يشفر المانح بروتين تنظيمي مقصود (مثل ZFP TFs، TALE TFs أو Cas TF/CRISPR) يرتبط بـ و/أو يعدل التعبير الوراثي عن جين مقصود. في أحد التجسيدات، ترتبط البروتينات التنظيمية بمتوالية DNA وتمنع ارتباط العوامل التنظيمية الأخرى. في تجسيد آخر، يمكن أن يعدل ربط البروتين التنظيمي (أي يحث أو يكبت) التعبير الوراثي عن DNA مستهدف.

في بعض التجسيدات، تتضمن خلية PC/HSC المحورة وراثياً و/أو حيوان جين ناقل يمكن أن يشفر جين بشري. في بعض الأمثلة، يشتمل الحيوان المحور وراثياً على تعطيل جيني في الموقع ذات المنشأ المناظر للجين الناقل خارجي المنشأ، بما يسمح بتطوير نظام في الجسم الحي حيث يمكن أن تتم دراسة البروتين البشري بمعزل. يمكن أن يتم استخدام نماذج محورة وراثياً مذكورة لأغراض المراقبة لتحديد الجزيئات الصغيرة أو الجزيئات الحيوية الكبيرة أو الكيانات الأخرى التي يمكن أن تتفاعل مع أو تعدل البروتين البشري المقصود. في بعض الجوانب، يتم دمج الجين الناقل في الموقع المختار (مثل، مرفأ آمن) في خلية جذعية (مثل، خلية جذعية جينية، خلية جذعية متعددة القدرات مستحثة، خلية جذعية مكوِّنة للدم، وهكذا) أو جنين حيواني تم الحصول عليه بواسطة أي من الطرق الموصوفة في هذا الطلب، وبعد ذلك يتم غرس الجنين بحيث أنه تتم ولادة حيوان حي. ثم تتم تربية الحيوان حتى ينضج جنسياً والسماح له بإنتاج ذرية حيث سيشتمل بعضاً من ذريته على الأقل عل متوالية جين داخلية المنشأ منقحة أو الجين الناقل المدمج.

في جانب آخر، يتم في هذا الطلب توفير طريقة تغيير التعبير الجيني (مثل، BCL11A و/أو جين جلوبين) في خلية، تشتمل الطريقة على: إدخال، في الخلية، واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب (موضح في الجدول 1)، في ظل ظروف بحيث أنه يتم التعبير عن الواحد أو أكثر من البروتينات ويتم تغيير التعبير الوراثي عن الجين. في تجسيدات معينة، يتم تغيير التعبير الوراثي عن جين جلوبين (مثل، جلوبين جاما أو جلوبين بيتا) (مثل، زيادته). يمكن كذلك أن تشتمل أي من الطرق الموصوفة في هذا الطلب على دمج متوالية مانحة (مثل، جين ناقل أو شظية منه في ظل التحكم في مقوي خارجي المنشأ أو داخلي المنشأ) في جينوم الخلية، على سبيل المثال

دمج مانح في أو بالقرب من موقع قطع إنزيم النوكلياز في جين BCL11A. يتم إدخال المتوالية المانحة إلى الخلية باستخدام ناقل فيروسي، في صورة أوليجو نوكليوتيد و/أو على بلازميد. يمكن أن تكون الخلية التي يتم فيها تغيير التعبير الوراثي الجيني، على سبيل المثال، خلية دم حمراء (RBC) خلية منتجة لغيرها و/أو خلية جذعية مكونة للدم (مثل، خلية +CD34).

في تجسيدات أخرى، يتم في هذا الطلب توفير طريقة إنتاج خلية معدلة وراثياً تشتمل على تعديل جينومي داخل متوالية معززة من BCL11A داخلية المنشأ (تعديل على متوالية النوكليوتيد من متوالية المعززة من BCL11A)، تشتمل الطريقة على الخطوات: أ) تلامس خلية مع بولي نوكليوتيد (مثل DNA أو mRNA) يشفر إنزيم نوكلياز إصبع الزنك الذي يشتمل على 4، 5، أو 6 نطاقات إصبع الزنك يكون فيها كل نطاق من نطاقات إصبع الزنك مشتملاً على منطقة حلزونية للتعرف في الترتيب الموضح في صف منفرد بالجدول 1؛ ب) تعريض الخلية إلى ظروف باعثة على التعبير عن بروتين إصبع الزنك من البولي نوكليوتيد؛ وج) تعديل المتوالية المعززة من BCL11A داخلية المنشأ مع بروتين إصبع الزنك الذي تم التعبير عنه بشكل كافٍ لإنتاج الخلية المعدلة وراثياً. في تجسيدات معينة، تتم استثارة الخلايا بسيتوكين واحد على الأقل (مثل، قبل الخطوة (أ)). يمكن أن يتم تلامس البولي نوكليوتيد مع الخلية باستخدام أي طريقة مناسبة، تتضمن لكنها لا تنحصر في، من خلال نقل العدوى، باستخدام ناقل غير فيروسي، باستخدام ناقل فيروسي، بواسطة الوسائل الكيميائية أو بواسطة التعريض إلى مجال كهربائي (مثل، النقل الكهربي electroporation).

يتم كذلك توفير خلايا تشتمل على واحد أو توليفة من التعديلات الجينومية الموصوفة في هذا الطلب، المتضمنة الخلايا المشتقة من الخلايا المنتجة بواسطة الطرق الموصوفة في هذا الطلب.

يتم كذلك توفير طريقة لمعالجة مريض بحاجة إلى زيادة التعبير عن جين الجلوبين، تشتمل الطريقة على إعطاء المريض المستحضر الصيدلاني (الخلايا المعدلة وراثياً، البروتينات و/أو بولي نوكليوتيدات) كما هو موصوف في هذا الطلب بمقدار كافٍ لزيادة التعبير الوراثي عن جين الجلوبين في المريض. في تجسيدات معينة، يعد المريض معروف عن أنه يعاني من، عرضة للمعاناة من، أو على حافة خطر المعاناة من ثَلاسيمِيَّة أو داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة.

يتم كذلك توفير طقم، يشتمل على الأحماض النووية، البروتينات و/أو الخلايا المعدلة وراثياً وفق الاختراع. يمكن أن يشتمل الطقم على أحماض نووية تشفر إنزيمات النوكلياز، (مثل جزيئات نظام RNA أو ZFN، TALEN أو Cas/CRISPR يشفر جينات متضمنة في ناقل تعبير مناسب)، أو

حصص من بروتينات إنزيم النوكلياز ، جزئيات مانحة، عوامل معدلة للجذعية مناسبة، خلايا، عوامل منظمة، و/أو تعليمات (مثل، لإجراء الطرق الخاصة بالاختراع) وما شابه. يتضمن الاختراع، لكنه لا يقتصر على، خلية معدلة وراثياً (مثل، خلية جذعية مثل (CD34+) خلية جذعية مكونة للدم أو خلية منتجة لغيرها خلايا الدم الحمراء RBC) تشتمل على تعديل جينومي واحد على الأقل مصنوع بواسطة إنزيم النوكلياز (مثل، كما هو موضح في صف منفرد بالجدول 1)، حيث يكون التعديل الجينومي داخل متوالية معززة من BCL11A داخلية المنشأ، وكذلك حيث يتم اختيار التعديل الجينومي من المجموعة المتكونة من إدخالات، صور الحذف وتوليفات منها ويشتمل على تعديل في أو بالقرب من أي من المتوالية رقم: 1 والمتوالية رقم: 12. في تجسيدات معينة، تعد الخلية عبارة عن خلية متمايزة معدلة وراثياً مشتقة من خلية جذعية كما هو موصوف في هذا الطلب (مثل، خلايا الدم الحمراء RBC مشتقة من خلية جذعية مكونة للدم أو خلايا الدم الحمراء RBC خلية منتجة لغيرها).

يمكن أن يشتمل إنزيم النوكلياز nuclease على نوكلياز إصبع زنك واحد على الأقل إصبع الزنك المعالج وراثياً (ZFN) (مثل، كما هو موضح في الجدول 1) و/أو TALEN واحد على الأقل و يمكن أن يتم إدخال إنزيم (إنزيمات) النوكلياز في الخلية في صورة بروتين و/أو في صورة بولي نوكليوتيد يشفر إنزيم (إنزيمات) النوكلياز. في تجسيدات معينة، يشتمل التعديل الجينومي على إدخال يشتمل على تكامل بولي نوكليوتيد مانح يشفر جين ناقل. يتم كذلك توفير تركيبات صيدلية تشتمل على واحد أو أكثر من الخلايا المعدلة وراثياً الموصوفة في هذا الطلب.

يتم كذلك توفير بروتين ربط DNA يشتمل على بروتين إصبع الزنك يشتمل على 4، 5 أو 6 نطاقات إصبع الزنك يشتمل على منطقة حلزونية للتعرف، حيث تشتمل بروتينات إصبع الزنك على المناطق الحلزونية للتعرف في الترتيب الموضح في صف منفرد بالجدول 1. يتم كذلك توفير بروتين TALE يشتمل على مجموعة من تكرارات ترتبط بمتوالية تشتمل على جزء (مثل، على الأقل 4، 5، 6 أو يزيد) أزواج قاعدة من المواقع المستهدفة الموضحة في الجدول 1. يتم كذلك توفير بروتين اندماج يشتمل على بروتين إصبع الزنك أو بروتين TALE كما هو موصوف في هذا الطلب ومن نطاق قطع أو نطاق نصفي للقطع النوع غير المعالج أو المعالج وراثياً في صورة بولي نوكليوتيدات تشفر البروتينات (ZFPs، TALEs، ZFNs، TALENs) كما هو موصوف في هذا الطلب. يتم كذلك توفير خلايا (مثل، خلايا جذعية معزولة مثل خلايا جذعية (CD34+)) تشتمل على واحد أو أكثر من بولي نوكليوتيدات و/أو بروتينات كما هو موصوف في هذا الطلب. يتم كذلك توفير أطقم تشتمل على واحد أو أكثر من البروتينات، بولي نوكليوتيدات و/أو خلايا كما هو موصوف في هذا الطلب.

يتم كذلك وصف طريقة تغيير التعبير الوراثي عن جين جلوبين في خلية (مثل، خلية منتجة لغيرها خلايا الدم الحمراء RBC و/أو خلية جذعية مكونة للدم)، تشتمل الطريقة على: إدخال، في الخلية، واحد أو أكثر من بولي نوكليوتيدات تشفر واحد أو أكثر من إنزيمات نوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب، في ظل ظروف بحيث أنه يتم التعبير عن الواحد أو أكثر من البروتينات ويتم تغيير التعبير الوراثي عن جين الجلوبين (مثل، جلوبين جاما و/أو بيتا) (مثل، زيادته). في تجسيدات معينة، تشتمل كذلك الطرق على دمج متوالية مانح في جينوم الخلية، على سبيل المثال باستخدام ناقل فيروسي، في صورة أوليجونوكليوتيد أو على بلازميد. يمكن أن تشتمل متوالية المانح على جين ناقل في ظل التحكم في مقوي داخلي المنشأ أو خارجي المنشأ.

يتم كذلك توفير طريقة إنتاج خلية معدلة وراثياً تشتمل على تعديل جينومي داخل متوالية معززة من BCL11A داخلية المنشأ (مثل، موقع مستهدف كما هو موضح في الجدول 1)، تشتمل الطريقة على الخطوات: (أ) تلامس خلية مع بولي نوكليوتيد polynucleotide يشفر بروتين اندماج يشتمل على نوكلياز إصبع زنك يشتمل على 4، 5، أو 6 نطاقات إصبع الزنك يشتمل فيه كل نطاق من نطاقات إصبع الزنك على منطقة حلزونية للتعرف بالترتيب الموضح في صف منفرد بالجدول 1؛ (ب) تعريض الخلية إلى ظروف باعثة على التعبير عن بروتين الاندماج من البولي نوكليوتيد؛ و(ج) تعديل المتوالية المعززة من BCL11A داخلية المنشأ مع بروتين الاندماج الذي تم التعبير عنه كافٍ لإنتاج الخلية المعدلة وراثياً. في تجسيدات معينة، الطريقة تشتمل كذلك على استثارة الخلايا بسيتوكين واحد على الأقل. يمكن أن يتم توصيل البولي نوكليوتيد(نوكليوتيدات) داخل الخلية، على سبيل المثال باستخدام نظام توصيل غير فيروسي، نظام توصيل فيروسي، و/أو مادة ناقلة للتوصيل ويمكن أن يشتمل على تعريض الخلايا إلى مجال كهربائي.

يتم كذلك توفير طرق معالجة مريض في حاجة إلى زيادة في التعبير الوراثي الجيني عن الجلوبين (مثل، مريض معروف على أنه يعاني من، عرضة للإصابة بـ، أو على حافة خطر تطور اعتلال جلوبيني مثل ثَلاسيمِيَّة (مثل، β- ثَلاسيمِيَّة) أو داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة، تشتمل الطريقة على إعطاء المريض تركيبة صيدلية كما هو موصوف في هذا الطلب (مثل، بروتينات، بولي نوكليوتيدات و/أو خلايا) بمقدار كافٍ لزيادة الوراثي الجيني عن الجلوبين في المريض.

هذه الجوانب وغيرها ستتضح بسهولة لذوي المهارة في المجال في ضوء الكشف ككل.

شرح مختصر للرسومات

يمثل الشكل 1 رسماً بيانياً يصف النسبة النسبية لتعبير وراثي عن جلوبين جاما بشري (HBG) human gamma globin إلى التعبير الوراثي عن جلوبين بيتا بشري human beta globin expression (HBB) في خلايا الدم الحمراء المشتقة من خلايا +CD34 المنقحة بزوج من إصبع الزنك المعالج وراثياً ZFN نوعي لـ BCL11a الموضح.

يمثل الشكلان 2أ و 2ب رسمين بيانيين يصفان نشاط زوجين من إصبع الزنك المعالج وراثياً ZFN نوعي لـ BCL11a في خلايا +CD34 معزولة عن دم محيطي peripheral blood (PB). تم نقل العدوى إلى الخلايا باستخدام جهاز نقل كهربي BTX. يتم توضيح مركبات إنديل **%** التي تم الكشف عنها (قياس نشاط ربط طرف غير متجانس NHEJ القابل للكشف عنه) بكل حالة أسفل الرسومات البيانية بالشكل 2أ (مدى إدخال mRNA من 0.5 إلى 4 ميكروجرام) والشكل 2ب (مدى إدخال mRNA من 2.0 إلى 8.0 ميكروجرام).

يمثل الشكل 3 رسماً بيانياً يصف التعبير الوراثي عن جلوبين جاما بشري (HBG) كنسبة نسبية لـ HBG إلى جلوبين بيتا بشري (HBB) التالي لتمايز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر لخلايا PB +CD34 المنقحة الموضحة في الشكل 2ب. تتم مقارنة أنواع mRNA، حيث يتم تشفير ZFNs على نفس جزيء mRNA ولكنه يكون منفصلاً بواسطة متوالية ببتيد للقطع الذاتي (يتم تحديدها كـ"2a")، مع استخدام اثنين من mRNAs حيث تشفر mRNA أحد أزواج ZFN (يتم تحديدها كـ " sep" بشكل منفصل).

يمثل الشكلان 4أ و 4ب رسمين بيانيين يصفان نشاط زوجين من ZFN نوعي لـ BCL11a في خلايا +CD34 معزولة عن نخاع العظام (BM) تم نقل العدوى إلى الخلايا باستخدام جهاز نقل كهربي BTX. يتم توضيح مركبات إنديل **%** التي تم الكشف عنها (قياس نشاط NHEJ القابل للكشف عنه) بكل حالة أسفل الرسومات البيانية بالشكل 4أ (مدى إدخال mRNA من 2.0 إلى 8.0 ميكروجرام). يصف الشكل 4ب نشاط زوج واحد من ZFNs حيث يتم الإمداد بـ ZFNs إما كأنواع mRNA مفردة مع متوالية ببتيد للقطع الذاتي 2a تفصل المتواليات المشفرة لكل ZFN أو عندما يتم الإمداد باثنين من ZFNs على mRNAs منفصلة).

يمثل الشكلان 5أ و 5ب رسمين بيانيين يصفان نشاط زوج من ZFN في خلايا +CD34 مشتقة من PB باستخدام جهاز نقل كهربي Maxcyte. يتم توضيح النسبة المئوية مركبات إنديل **%** التي تم الكشف عنها (قياس نشاط NHEJ القابل للكشف عنه) بكل حالة أسفل الرسومات البيانية بالشكل 5أ والشكل 5ب. يصف الشكل 5أ مقارنة بين زوجين من ZFN، ويصف الشكل 5ب نشاط أزواج ZFNs حيث يتم الإمداد بـ ZFNs إما كأنواع mRNA منفردة مع متوالية ببتيد للقطع الذاتي 2a تفصل المتواليات المشفرة لكل ZFN أو عندما يتم الإمداد باثنين من ZFNs على mRNAs منفصلة.

يصف الشكل 6 رسماً بيانياً يوضح نشاط واسع النطاق للزوج (أ)(SBS51446/51536) والزوج (ب) (SBS51857/51949) في الخلايا +CD34 المشتقة من نخاع العظام. وإما أن يتم الإمداد بـ mRNAs التي تشفر أزواج ZFN إما كـ mRNAs منفردة حيث يتم فصل المتواليات المشفرة لكل نصف من زوج ZFN بواسطة متوالية ببتيد للقطع الذاتي 2a، أو كـ mRNAs منفصلة مشفرة لكل ZFN. يتم توضيح النشاط في مركبات الإنديل% التي تم الكشف عنها.

يوضح الشكل 7 رسماً بيانياً يصف الكمية النسبية للتعبير الوراثي جلوبين جاما بشري HBG و جلوبين بيتا بشري HBB الذي تم الكشف عنه بعد 14 يوماً من التمايز الذي يلي تنقيح الجين واسع النطاق الموضح في الشكل 6. كما سبق، تم اختبار العينات إما كـ mRNAs منفردة مشفرة لكل من ZFNs، أو كـ mRNAs منفصلة. يتم توضيح كمية مركبات الإنديل التي تم الكشف عنها في اليوم صفر من التمايز عبر القاع، ويتضح أن مسارات نشاط الإنديل مع كمية HGB المعبر عنها وراثياً.

يمثل الشكل 8 رسماً بيانياً يصف النسبة المئوية لمركبات الإنديل التي تم الكشف عنها في تنقيح واسع النطاق للخلايا +CD34 من نخاع النظام الذي تمت معالجته بالزوج B، إما كـ mRNAs منفردة أو كـ mRNAs منفصلة كما هو موصوف أعلاه.

الشكلان 9أ و9ب عبارة عن رسوم بيانية تصف النسبة المئوية لمركبات الإنديل التي تم الكشف عنها في تنقيح واسع النطاق للخلايا +CD34 من نخاع النظام الذي تمت معالجته بالزوج B، إما كـ mRNAs منفردة أو كـ mRNAs منفصلة كما هو موصوف أعلاه.

الشكلان 10أ و10ب عبارة عن رسوم بيانية تصف نتائج التحليل خارج المستهدف للزوج (أ)(الشكل 10أ) والزوج (ب) (الشكل 10ب).

الشكلان 11أ و11ب عبارة عن رسوم بيانية توضح تحليل RT qPCR في الزمن الحقيقي للتمايز في المعمل بالتجربة 1 (الشكل 11أ) والتجربة 2 (الشكل 11ب) باستخدام خلايا مريض ونوع غير معالج (wt) معالجة بـ SB ZFN mRNA. توضح الرسوم البيانية النسب النسبية لجلوبين جاما إلى جلوبين ألفا mRNAs.

الشكلان 12أ و12ب عبارة عن رسوم بيانية توضح نسب جلوبين جاما إلى جلوبين ألفا بالتجربة 1 (الشكل 12أ) والتجربة 2 (الشكل 12ب). بالنسبة لقيم جلوبين جاما، تمت إضافة قيم قمم Agamma و Ggamma و، عند إمكانية تطبيق ذلك، قمة Agamma T.
يوضح الشكل 13 رسماً بيانياً نسب البروتين المشابهة للجاما/البيتا المرسومة وفقاً لحالة أليل في المستعمرات المفردة التي تم تحليلها. تم تخزين البيانات بواسطة فئة النمط الجيني ("+" للأليل غير معدل، "−" للأليل المنقح؛"+/+" للنوع غير المعالج؛ "+/−" لأحادي الأليل المعدل؛ و"−/−" لثنائي الأليل المعدل).

الوصف التفصيلي:

يتم في هذا الطلب الكشف عن التركيبات والطرق الخاصة بالمعالجة الوراثية الجينومية لتعديا BCL11A و/أو التعبير الوراثي عن جلوبين جاما ولمعالجة و/أو الوقاية من الاعتلالات الهيموجلوبينية. تحديداً، يتم تحقيق وجود إنزيمات النوكلياز تشتمل على ZFPs التي بها المناطق الحلزونية للتعرف كما هو موضح في صف منفرد بالجدول 1 بشكل فعال في HSC/PC ويتسبب ذلك في تغير في التعبير الوراثي عن جلوبين جاما النسبي أثناء تكوين الكريات الحمراء اللاحق. يعد هذا التعديل لـ BCL11A والتعبير الوراثي عن جلوبين جاما مفيد تحديداً لمعالجة الاعتلالات الهيموجلوبينية (مثل، أمراض ثَلاسيمِيَّة بيتا، داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة) حيث يوجد تعبير وراثي عن جلوبين بيتا غير كافٍ أو تعبير وراثي عن صورة مطفرة من بيتا−جلوبين. باستخدام الطرق والتركيبات الخاصة بالاختراع، يمكن أن يتم التغلب على التعقيدات والمضاعفات المتعلقة بالمرض الناجمة عن الجلوبين بيتا غير العادي من خلال تغيير التعبير الوراثي عن جلوبين جاما في خلايا منتجة لغيرها من كريات دموية حمراء.

نظرة عامة

تستخدم ممارسات الطرق، كما تحضير واستخدام التركيبات التي تم الكشف عنها في هذا الطلب، ما لم تتم الإشارة إلى ما هو خلاف ذلك، تعد التقنيات التقليدية في العلم الحيوي الجزيئي، الكيمياء الحيوية، بنية الكروماتين والتحليل، الكيمياء المحوسبة، مزرعة الخلايا، DNA الناتج عن عودة الارتباط الجيني والمجالات ذات الصلة ضمن المهارة الخاصة بالمجال. يتم بشكل كامل توضيح هذه التقنيات في الدراسات. انظر، على سبيل المثال، Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001؛ Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 والتحديثات الدورية؛ سلسلة METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego؛ Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998؛ METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999؛ و METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

التعريفات

يتم استخدام المصطلحات "حمض نووي،" "بولي نوكليوتيد،" و"أوليجو نوكليوتيد" بالتبادل وتشير إلى بوليمر ديوكسي ريبو نوكليوتيد أو ريبو نوكليوتيد، في هيئة خطية أو دائرية، وفي إما صورة منفردة الجديلة أو مزدوجة الجديلة. لأغراض الكشف الحالي، لا يتم تفسير هذه المصطلحات على أنها مقيدة بالنسبة إلى طول بوليمر. يمكن أن تتضمن المصطلحات النظائر المعروفة من النوكليوتيدات الطبيعية، كما النوكليوتيدات التي يتم تعديلها في شقوق القاعدة، السكر و/أو الفوسفات (مثل، السلاسل الرئيسية من فوسفوروثيوات). بشكل عام، يكون لنظير من نوكليوتيد محدد القدرة النوعية على تكوين الأزواج المشابهة من القاعدة؛ أي، سيقترن نظير من A بقاعدة مع T.

يتم استخدام المصطلحات "بولي ببتيد polypeptide،" "ببتيد peptide" و"بروتين protein" بالتبادل لتشير إلى بوليمر polymer من الوحدات البنائية من الحمض الأميني amino acid residues. ينطبق كذلك المصطلح على بوليمرات الحمض الأميني التي يكون فيها واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية عبارة عن نظائر كيميائية أو مشتقات معدلة من أحماض أمينية تحدث بشكل طبيعي مناظرة.

يشير "الارتباط" إلى تفاعل بيني نوعي لمتوالية، غير تساهمي بين الجزيئات الكبيرة (مثل، بين بروتين وحمض نووي). لا تتطلب جميع المكونات لتفاعل بيني لربط أن تكون نوعية لمتوالية (مثل، تتلامس مع الوحدات البنائية من الفوسفات في السلسلة الرئيسية من DNA)، طالما أن التفاعل البيني ككل يكون نوعي لمتوالية. يتم بشكل عام تمييز التفاعلات البينية المذكورة بواسطة ثابت انفصال (K_d) بمقدار 10^{-6} مولار$^{-1}$ أو أقل. يشير مصطلح "آلفة" إلى شدة الارتباط: تترابط آلفة الارتباط المتزايدة مع قيمة K_d منخفضة.

يعد "بروتين ربط" عبارة عن بروتين قادر على الارتباط بجزيء آخر. يمكن أن يرتبط بروتين ربط مع، على سبيل المثال، جزيء DNA (بروتين ربط DNA)، جزيء RNA (بروتين ربط RNA) و/أو جزيء بروتيني (بروتين ربط بروتين). في حالة بروتين ربط بروتين، يمكن أن يرتبط بذاته (لتكوين دايمرات متجانسة، ترايمرات ثلاثية، وهكذا) و/أو يمكن أن يرتبط بواحد أو أكثر من جزيئات من بروتين أو بروتينات مختلفة. يمكن أن يكون لبروتين ربط ما يزيد عن نوع واحد من نشاط الارتباط. على سبيل المثال، يكون لبروتينات إصبع الزنك نشاط ارتباط بـ DNA، ارتباط بـ RNA وارتباط ببروتين.

يعد "بروتين ربط DNA إصبع الزنك" (أو بروتين ربط) عبارة عن بروتين، أو نطاق داخل بروتين كبير، والذي يرتبط بـ DNA بأسلوب نوعي لمتوالية من خلال واحد أو أكثر من أصابع الزنك، والتي تمثل مناطق متوالية الحمض الأميني داخل نطاق الربط الذي يتم تثبيت بنيته من خلال تنسيق أيون الزنك. يتم عادةً اختصار مصطلح بروتين ربط DNA إصبع الزنك على أنه بروتين إصبع الزنك أو ZFP.

يعد "نطاق ربط TALE DNA" أو "TALE" عبارة عن بولي ببتيد يشتمل على واحد أو أكثر من نطاقات تكرارية TALE /وحدات. تتدخل نطاقات التكرار في ربط TALE بمتوالية DNA المستهدفة القريبة. تعد "وحدة تكرارية" منفردة (المشار إليها كذلك في صورة "تكرارية") عادةً من 33-35 من الأحماض الأمينية بالطول وتظهر تجانس لمتوالية ما على الأقل مع متواليات تكرارية من TALE أخرى داخل بروتين TALE ناشئ طبيعياً.

يمكن أن تتم "المعالجة الوراثية" لإصبع الزنك ونطاقات ربط TALE لترتبط بمتوالية نوكليوتيد محددة سلفاً، على سبيل المثال من خلال المعالجة الوراثية (تغيير واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية) من المنطقة الحلزونية للتعرف من إصبع زنك ناشئ طبيعياً أو بروتين TALE. بالتالي،

تعد بروتينات ربط DNA المعالجة وراثياً (أصابع الزنك أو TALEs) عبارة عن بروتينات ناشئة بشكل غير طبيعي. تتمثل أمثلة غير مقيدة من الطرق للمعالجة الوراثية لبروتينات ربط DNA في التصميم والانتقاء. يعد بروتين ربط DNA مصمم هو عبارة عن بروتين غير ناشئ بالطبيعة تصميمه /تركيبته تنشأ بشكل مبدئي من معيار عقلاني. يتضمن معيار عقلاني للتصميم تطبيق قواعد الاستبدال وخوازميات محوسبة لمعالجة المعلومات في قاعدة بيانات تخزن المعلومات لتصميمات ZFP و/أو TALE حالية وبيانات ربط. انظر، على سبيل المثال، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,140081، 6,453,242، 6,534,261، و 8,585,526 6,140,081؛ أنظر ايضا براءات الإختراع الدولية 98/53098، 98/53059، 98/53060، 02/016536 و 03/016496.

يعد بروتين إصبع الزنك "مختار" أو TALE عبارة عن بروتين غير موجود في الطبيعة والذي ينجم إنتاجه بشكل أولي من عملية تجريبية مثل عرض الملتهمة، الحجز التفاعلي البيني أو الاختيار الهجيني. انظر على سبيل المثال، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 5,789,538، 5,529,523، 6,007,988، 6,013,453، 8,586,526، براءات الإختراع الدولية 95/19431، 96/06166، 98/53057، 98/54311، 00/27878، 01/60970، 01/88197، 02/099084.

يعد"TtAgo" عبارة عن بروتين عنقريط " Argonaute " بدائي النواة من المعتقد أنه يتدخل في الكتم الجيني. يتم اشتقاق TtAgo من البكتيريا Thermus thermophilus. انظر، مثل، Swarts et al, ibid, G. Sheng et al., (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 652). يعد "نظام " TtAgo عبارة عن جميع المكونات المطلوبة التي تتضمن، على سبيل المثال، DNAs توجيهية للقطع بواسطة إنزيم TtAgo.

يشير مصطلح "عودة الارتباط الجيني Recombination" إلى عملية تبادل معلومات وراثية بين اثنين من البولي نوكليوتيدات، المتضمنة لكنها لا تنحصر في، احتجاز مانح بواسطة ربط طرف غير متجانس non-homologous end joining (NHEJ) وعودة الارتباط الجيني المتجانس. لأغراض هذا الكشف، يشير "عودة الارتباط الجيني المتجانس homologous recombination (HR)" إلى الصورة المتخصصة من هذه التبادل الذي يحدث، على سبيل المثال، أثناء إصلاح الكسور بالجديلة المزدوجة في الخلايا من خلال آليات إصلاح موجهة التجانس. تتطلب هذه العملية تجانس متوالية نوكليوتيد، تستخدم جزيء "مانح" لإصلاح قالبي لجزيء "مستهدف" (أي، ذلك الذي يعاني من كسر بالجديلة

المزدوج)، ويعد معروف بشكل مختلف على أنه "تحويل جين غير عابر" أو "تحويل جين له مسار قصير"، لأنه يؤدي إلى نقل المعلومات الوراثية من المانح إلى المستهدف. دون التقيد بأي نظرية محددة، يمكن أن ينطوي هذا النقل على تصحيح عدم توافق لـ DNA غير متجانس الازدواج يتشكل بين المستهدف المكسور والمانح، و/أو "تلدين جديلة تعتمد على التخليق"، حيث يتم فيه استخدام المانح لإعادة تخليق معلومات جينية ستشكل جزءاً من المستهدف، و/أو العمليات ذات الصلة. تتسبب عادةً لعودة الارتباط الجيني المتجانس HR نوعية مذكورة في تغيير المتوالية للجزيء المستهدف بحيث يتم تضمين جزء أو جميع المتوالية للبولي نوكليوتيد المانح في البولي نوكليوتيد المستهدف.

في طرق الكشف، يشكل واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز المستهدفة كما هو موصوف في هذا الطلب قطع مزدوج الجديلة (DSB) في المتوالية المستهدفة (مثل، الكروماتين الخلوي) في موقع محدد سلفاً. يمكن أن يتسبب قطع مزدوج الجديلة DSB في صور حذف و/أو إدخالات بواسطة آليات إصلاح موجه بالتجانس أو بواسطة إصلاح موجه بغير التجانس. يمكن أن تتضمن صور الحذف أي عدد من أزواج القاعدة. بالمثل، يمكن أن تتضمن الإدخالات أي عدد من أزواج القاعدة تتضمن، على سبيل المثال، دمج لبولي نوكليوتيد "مانح"، اختيارياً له تجانس مع متوالية البولي نوكليوتيد في منطقة الكسر. يمكن أن يتم الدمج المادي للمتوالية المانحة أو، بشكل بديل، يتم استخدام البولي نوكليوتيد المانح في صوة قالب لإصلاح كسر من خلال عودة الارتباط الجيني المتجانس، بما يتسبب في إدخال جميع أو جزء من متوالية النوكليوتيد كما في المانح في الكروماتين الخلوي. بالتالي، يمكن أن يتم تغيير متوالية أولى في كروماتين خلوي و، في تجسيدات معينة، يمكن أن يتم تحويلها إلى متوالية موجودة في البولي نوكليوتيد المانح. بالتالي، يمكن أن يتم إدراك استخدام المصطلحات "يستبدل" أو "استبدال" لتمثيل استبدال لمتوالية نوكليوتيد واحدة بأخرى (أي، استبدال متوالية في النسخ المعلوماتي)، ولا يتطلب بالضرورة استبدال مادي أو كيميائي لبولي نوكليوتيد واحد بآخر.

في أي من الطرق الموصوفة في هذا الطلب، يمكن أن يتم استخدام أزواج إضافية من بروتينات إصبع الزنك أو TALEN للقطع المزدوج الجديلة الإضافي للمواقع المستهدفة الإضافية داخل الخلية.

يمكن أن يتم استخدام أي من الطرق الموصوفة في هذا الطلب لإدخال مانح من أي حجم و/أو إخماد جزئي أو كلي لواحدة أو أكثر من المتواليات المستهدفة في خلية بواسطة دمج مستهدف لمتوالية

مانح يخل بالتعبير الوراثي للجين (الجينات) المقصودة. يتم كذلك توفير سلالات خلايا ذات جينات مخمدة جزئياً أو كلياً.

في أي من الطرق الموصوفة في هذا الطلب، يمكن أن تحتوي متوالية النوكليوتيد خارجية المنشأ ("المتوالية المانحة" أو "الجين الناقل") على متواليات والتي تكون متجانسة، لكنها غير متطابقة، مع المتواليات الجينومية في المنطقة المقصودة، بما يحقق استثارة لعودة الارتباط الجيني المتجانس لإدخال متوالية غير متطابقة في المنطقة المقصودة. بالتالي، في تجسيدات معينة، تظهر أجزاء المتوالية المانحة المتجانسة مع المتواليات في المنطقة المقصودة بين حوالي 80 إلى 99% (أو أي رقم صحيح بينهما) من تطابق المتوالية مع المتوالية الجينومية التي يتم استبدالها. في تجسيدات أخرى، يكون التجانس بين المتوالية المانحة والمتوالية الجينومية أعلى من 99%، على سبيل المثال في حال اختلاف نوكليوتيد 1 فقط بين المتوالية المانحة والمتوالية الجينومية على مدار 100 من أزواج القاعدة المتجاورة. في حالات معينة، يمكن أن يحتوي جزء غير متجانس من المتوالية المانحة على متواليات غير موجودة في المنطقة المقصودة، بحيث يتم إدخال المتواليات الجديدة في المنطقة المقصودة. في هذه الأمثلة، تتم بشكل عام مجانحة المتوالية غير المتجانسة بواسطة المتواليات 50-1000 زوج قاعدة (أو أي قيمة رقم صحيح بينها) أو أي عدد من أزواج القاعدة التي تزيد عن 1000، والتي تكون متجانسة أو متطابقة مع المتواليات في المنطقة المقصودة. في تجسيدات أخرى، تعد المتوالية المانحة غير متجانسة بالنسبة إلى المتوالية الأولى، ويتم إدخالها في الجينوم بواسطة آليات عودة الارتباط الجيني غير المتجانسة.

يشير مصطلح "قطع" إلى كسر سلسلة رئيسية تساهمية من جزيء DNA. يمكن أن يتم بدء قطع بواسطة مجموعة مختلفة من الطرق تشتمل على، لكنها لا تنحصر في، التحلل المائي الإنزيمي أو الكيميائي لرابطة فوسفو داي إستر. يمكن وجود كل من قطع بجديلة منفردة وقطع بجديلة مزدوجة، ويمكن أن يحدث قطع بالجديلة المزدوجة كنتيجة حالتي قطع جديلة منفردة مميزتين. يمكن أن يتسبب قطع DNA في إنتاج أي من الأطراف غير الحاد أو متعاقبة الترتيب. في تجسيدات معينة، يتم استخدام بولي ببتيدات اندماج لقطع DNA مزدوج الجديلة مستهدف.

يُعد مصطلح "نطاق نصفي للقطع" عبارة عن متوالية من البولي ببتيد التي، ترتبط ببولي ببتيد ثانٍ (أما متماثل أو مختلف) لتُكون معقد به نشاط قطعي (يُفضل نشاط قطعي مزدوج الجديلة). يتم استخدام المصطلحات " النطاقات النصفية للقطع الأول والثاني"؛ " + و – النطاقات النصفية للقطع"

و "النطاقات النصفية للقطع اليمنى واليسرى" بالتبادل للإشارة إلى زوج من النطاقات النصفية للقطع التي تتحول إلى الصورة الدايمرية.

يُعد مصطلح " نطاق نصفي للقطع معالج وراثياً" عبارة عن نطاق نصفي للقطع تم تعديله لتكوين دايمرات متجانسة ملزمة مع نطاق نصفي للقطع أخر (مثل، نطاق نصفي للقطع أخر معالج وراثياً). أنظر، أيضاً، منشورات براءات الاختراع الأمريكية رقم 2005/0064474، 20070218528، 20080131962، و 20110201055 التي تم استخدامها في هذه الوثيقة كمرجع في مجملها.

يُشير المصطلح "متوالية" إلى متوالية نيوكليوتيد لها أي طول، والتي يمكن أن تكون DNA أو RNA؛ ويمكن أن تكون خطية، دائرية أو متفرعة ويمكن أن تكون إما مفردة الجديلة أو مزدوجة الجديلة. يُشير المصطلح "متوالية المانح" إلى متوالية نيوكليوتيد يتم إدخالها في جينوم. يمكن أن تكون متوالية المانح ذات أي طوال، على سبيل المثال يمكن أن يكون طولها بين 2 و 100.000.000 نيوكليوتيدات (أو أي قيمة رقم صحيح بينهما أو تزيد عنهما)، بشكل مفضل يمكن أن يتراوح طولها بين 100 و 100.000 نيوكليوتيد (أو أي قيمة رقم صحيح بينهما أو تزيد عنهما)، بشكل أكثر تفضيلاً يمكن أن يتراوح طولها بين 2000 و 20.000 نيوكليوتيد (أو أي قيمة رقم صحيح بينهما أو تزيد عنهما)، وبشكل مفضل على الإطلاق يمكن أن يتراوح طولها بين 5 و 15 كيلو قاعدة (أو أي قيمة بينهما).

"الكروماتين Chromatin" هو بنية بروتين نووية تشتمل على الجينوم الخلوي. يحتوي الكروماتين الخلوي على الحمض النووي، بشكل رئيسي DNA، والبروتين، بما في ذلك الهيستونات والبروتينات الكروموسومية غير الهيستون. يوجد معظم الكروماتين الخلوي الحقيقي النواة في صورة نيوكليوسومات، حيث يشتمل قلب النيوكليوسوم تقريباً على 150 أزواج قاعدية من DNA المرتبطة بثماني الوحدات يشتمل على اثنين من كل من الهيستونات H2A، H2B، H3، و H4؛ ويمتد DNA الرابط (ذو طول متغير حسب الكائن الحي) بين قلوب النيوكليوسوم. ويرتبط جزيء هيستون H1 بشكل عام مع DNA الرابط. لأغراض الكشف الحالي، يقصد بمصطلح "الكروماتين" أن يشمل جميع أنواع البروتين النووي الخلوي، سواء بدائية النواة أو حقيقية النواة. ويشمل الكروماتين الخلوي كلا من الكروماتين الكروموسومي والحلقي.

يعد "الكروموسوم chromosome"، عبارة عن معقد كروماتين يشتمل على جميع أو جزء من الجينوم من خلية. يتسم عادة جينوم الخلية بالنواة الخلوية الخاصة به، والتي تكون تجميعاً من جميع

الكروموسومات التي تشتمل على جينوم الخلية. يمكن أن يشتمل جينوم خلية على واحد أو أكثر من الكروموسومات.

يعد "إيبسوم episome" عبارة عن حمض نووي نسخي، معقد نووي بروتيني أو بنية أخرى تشتمل على حمض نووي لا يشكل جزءاً من النواة الخلوية الكروموسومية لخلية. تتضمن أمثلة إيبسومات وبلازميدات جينومات فيروسية معينة.

تمثل "منطقة يمكن الوصول إليها" عبارة عن موقع في كروماتين خلوي يمكن أن يتم فيه ربط موقع مستهدف موجود في الحمض النووي بواسطة جزيء خارجي المنشأ والذي يتعرف على الموقع المستهدف. دون التقيد بأي نظرية محددة، من المعتقد أن منطقة يمكن الوصول إليها هي تلك التي لا تتم تعبئتها في بنية جسيم نووي. يمكن بشكل معتاد أن يتم الكشف على البنية المميزة لمنطقة يمكن الوصول إليها بواسطة حساسيتها إلى المسبارات الكيميائية والإنزيمية، على سبيل المثال، إنزيمات النوكلياز.

يعد "موقع مستهدف" أو "متوالية مستهدفة" عبارة عن متوالية حمض نووي تحدد جزء من حمض نووي سيرتبط به جزيء الربط، بشرط وجود ظروف كافية للارتباط.

يعد جزيء "خارجي المنشأ" عبارة عن جزيء يوجد بشكل معتاد في خلية، لكن يمكن إدخاله في خلية بواسطة واحدة أو أكثر من الطرق الوراثية، الحيوية الكيميائية أو غيرها. يتم تحديد "وجود طبيعي في الخلية" بالنسبة إلى المرحلة التطورية المحددة والظروف البيئية للخلية. بالتالي، على سبيل المثال، يعد جزيء موجود فقط أثناء التطور الجنيني للعضلة عبارة عن جزيء خارجي المنشأ بالنسبة إلى خلية عضلة بالغة. بالمثل، يعد جزيء مستحث بصدمة حرارية عبارة عن جزيء خارجي المنشأ بالنسبة إلى خلية غير مصدومة بالحرارة. يمكن أن يشتمل جزيء خارجي المنشأ، على سبيل المثال، على نسخة وظيفية من جزيء ذاتي المنشأ به خلل وظيفي أو نسخة بها خلل وظيفي من جزيء داخلي المنشأ يعمل بشكل طبيعي.

يمكن أن يكون جزيء خارجي المنشأ، من ضمن أمور أخرى، عبارة عن جزيء صغير، أي يتم توليده بواسطة عملية كيميائية توليفية، أو جزيء كبير مثل بروتين، حمض نووي، كربوهيدرات، شحوم، بروتين سكري، بروتين دهني، بولي سكاريد، أي مشتق معدل من الجزيئات أعلاه، أو أي معقد يشتمل على واحد أو أكثر من الجزيئات أعلاه. تتضمن الأحماض النووية DNA وRNA، يمكن

أن تكون منفردة الجديلة أو مزدوجة الجديلة؛ يمكن أن تكون خطية، متفرعة أو دائرية؛ ويمكن أن تكون من أي طول. تتضمن الأحماض الأمينية تلك القادرة على تكوين مزدوجات، كما أحماض نووية تشكل مكون ثلاثي. انظر، على سبيل المثال، البراءات الأمريكية أرقام 5,176,996 و 5،251،422. تتضمن البروتينات، لكنها لا تنحصر في، بروتينات ربط DNA، عوامل نسخ، عوامل إعادة نمذجة كروماتين، بروتينات ربط DNA معالجة بالميثيل، إنزيمات بوليمراز، إنزيمات ميثيلاز، إنزيمات نزع الميثيل، إنزيمات أسيتلاز، إنزيمات نزع الأسيتيل، كينازات، إنزيمات فوسفيتاز، إنزيمات إنتيجراز، إنزيمات ريكومبيناز، إنزيمات ليجاز، إنزيمات توبو أيزوميزاز، إنزيمات جيراز وإنزيمات هليكاز.

يمكن أن يكون جزيء خارجي المنشأ من نفس النوع من الجزيء كما جزيء ذاتي المنشأ، مثل، بروتين خارجي المنشأ أو حمض نووي خارجي المنشأ. على سبيل المثال، يمكن أن يشتمل حمض نووي خارجي المنشأ على جينوم فيروسي معدي، بلازميد أو إيبيسوم تم إدخاله في خلية، أو كروموسوم لا يوجد بشكل طبيعي في الخلية. تعد طرق إدخال الجزيئات خارجية المنشأ في الخلية معروفة لذوي الخبرة في المجال وتتضمن، لكنها لا تنحصر في، نقل يتدخل فيه شحم (أي، جسيمات شحمية، تتضمن شحوم متعادلة وكاتيونية)، النقل الكهربي، الحقن المباشر، تشريب الخلية، القذف الجسيمي، الترسيب المشترك لكالسيوم الفوسفات، نقل يتدخل فيه DEAE–ديكستران ونقل يتدخل فيه ناقل فيروسي. يمكن كذلك أن يكون جزيء خارجي المنشأ من النوع ذاته من الجزيء كما جزيء داخلي المنشأ لكنه مشتق من أنواع مختلفة عن الأنواع التي تم اشتقاق الخلية منه. على سبيل المثال، يمكن أن يتم إدخال متوالية حمض نووي بشرية في سلالة خلية مشتقة بالأصل من فأر أو هاميستر. تعد طرق إدخال الجزيئات خارجية المنشأ في الخلايا النباتية معروفة لذوي الخبرة في المجال وتتضمن، لكنها لا تنحصر في، تحويل بروتوبلاست، كربيد سيليكون (مثل، WHISKERS™)، تحويل يتدخل فيه Agrobacterium، نقل يتدخل فيه الشحوم (أي، الجسميات الشحمية، المتضمنة شحوم متعادلة وكاتيونية)، النقل الكهربي، الحقن المباشر، تشريب الخلية، القذف الجسيمي (مثل، استخدام "مدفع جيني")، الترسيب المشترك لكالسيوم الفوسفات، نقل يتدخل فيه DEAE–ديكستران ونقل يتدخل فيه ناقل فيروسي.

على النقيض، يعد جزيء "ذاتي المنشأ" هو ذلك الموجود بصورة طبيعية في خلية محددة في مرحلة تطورية محدد في ظل ظروف بيئية محددة. على سبيل المثال، يمكن أن يشتمل حمض نووي ذاتي المنشأ على كروموسوم، الجينوم من حمض نووي من مُتَقَدِّرة، يخضوري أو جينوم عضيي آخر، أو

إيبسوم ناشئ طبيعياً. يمكن أن تتضمن جزيئات ذاتية المنشأ إضافية البروتينات، على سبيل المثال، عوامل الاستنساخية والإنزيمات.

كما هو مستخدم في الطلب، يتضمن المصطلح "منتج حمض نووي خارجي المنشأ" كل من منتجات بولي نوكليوتيد وبولي ببتيد، على سبيل المثال، منتجات استنساخية (بولي نوكليوتيدات مثل RNA) ومنتجات النقل (بولي ببتيدات).

يعد جزيء "اندماج" عبارة عن جزيء يتم فيه دمج اثنين أو أكثر من جزيئات الوحدة الفرعية، بشكل مفضل بشكل تساهمي. يمكن أن تكون جزيئات الوحدة الفرعية من نفس النوع الكيميائي للجزيء، أو يمكن أن تكون من أنواع كيميائية مختلفة من الجزيئات. تتضمن أمثلة النوع الأول من جزيء الاندماج، لكنها لا تنحصر في، بروتينات اندماج (على سبيل المثال، اندماج بين نطاق ربط ZFP أو TALE DNA وواحد أو أكثر من نطاقات التنشيط) والأحماض النووية الخاصة بالاندماج (على سبيل المثال، حمض نووي يشفر بروتين الاندماج الموصوف أعلاه). تتضمن أمثلة جزيء الاندماج من النوع الثاني، لكنه لا ينحصر في، اندماج بين حمض نووي مشكل لمكون ثلاثي وبولي ببتيد، واندماج بين مادة رابطة لحز ضئيل وحمض نووي.

يمكن أن ينتج التعبير عن بروتين اندماج في خلية من توصيل بروتين الاندماج إلى الخلية أو بواسطة توصيل بولي نوكليوتيد يشفر بروتين الاندماج إلى خلية، حيث يتم نسخ البولي نوكليوتيد، ويتم نقل المستنسخ، لتوليد بروتين الاندماج. يمكن كذلك أن يتدخل قطع بولي ببتيد، عابر للجدائل وربط البولي ببتيد في تعبير وراثي عن بروتين في خلية. يتم تقديم طرق توصيل بولي نوكليوتيد وبولي ببتيد إلى الخلايا في موضع آخر من هذا الكشف.

يتضمن "جين"، لأغراض الكشف الحالي، منطقة DNA تشفر منتج جيني (انظر أدناه)، كما جميع مناطق DNA التي تنظم إنتاج منتج الجين، سواء كانت المتواليات التنظيمية المذكورة متجاورة مع متواليات تشفير و/أو نسخية أم غير متجاورة. وفقاً لذلك، يتضمن جين، لكن ليس بالضرورة يقتصر على، متواليات مقوية، ناهيات، متواليات تنظيمية انتقالية مثل مواقع ربط ريبوسوم ومواقع دخول ريبوسوم داخلي، معززات، كاتمات، عازلات، عناصر حدود، أصول تناسخ، مواقع ربط كتلة ومناطق تحكم في الموقع.

يشير مصطلح "التعبير الوراثي عن الجين" إلى تحويل المعلومات، المتضمنة في جين، إلى منتج جيني. يمكن أن تكون منتج جين عبارة عن المنتج الاستنساخي المباشر لجين (مثل، mRNA، tRNA، rRNA، RNA مضاد لاتجاه النسخ، ريبوزيم، RNA بنيوي أو أي نوع آخر من RNA) أو بروتين يتم إنتاجه بواسطة نقل mRNA. تتضمن كذلك منتجات الجين RNAs والتي يتم تعديلها، بواسطة عمليات مثل التغطية، المعالجة بمجموعة بولي أدينيل، المعالجة بمجموعة الميثيل، والتنقيح، والبروتينات المعدلة بواسطة، على سبيل المثال، المعالجة بمجموعة الميثيل methylation، المعالجة بمجموعة الإسيتيل acetylation، المعالجة بمجموعة الفوسفوريل phosphorylation، المعالجة بمجموعة اليوبكتين ubiquitination، المعالجة بمجموعة الميثيل ADP-ريبوسيل ribosylation، المعالجة بمجموعة الميريستيل myristilation، والمعالجة بمجموعة الجليكوزيل glycosylation.

يشير مصطلح "تعديل" بالتعبير الوراثي عن جين إلى تغير في نشاط الجين. يمكن أن يتضمن تعديل التعبير الوراثي، لكنه لا ينحصر في، تنشيط الجين وكبح الجين. يمكن أن يتم استخدام تنقيح الجينوم (مثل، القطع، التغيير، الإخماد، الطفرة العشوائية) لتعديل التعبير الوراثي. يشير الإخماد الجيني إلى أي تقليل في التعبير الوراثي الجيني بالمقارنة مع خلية لا تتضمن نظام ZFP، TALE أو CRISPR/Cas كما هو موصوف في هذا الطلب. بالتالي، يمكن أن يكون الإخماد الجيني جزئي أو مكتمل.

يعد mRNA "محمي" عبارة عن ذلك الذي تم فيه تغيير mRNA بأسلوب ما لزيادة ثبات mRNA أو نقله. تتضمن أمثلة صور الحماية استخدام بديل لما يصل إلى 25% من الوحدات البنائية من السيتودين واليوريدين بـ2-ثيو يوريدين 2-thiouridine (s2U) و5-ميثيل سيتيدين 5-methylcytidine (m5C). يظهر mRNA الناتج توليد أقل للمناعة وثبات أكثر بالمقارنة مع نظيره غير المعدل. (انظر see Karikó *et al.* ((2012), *Molecular Therapy*, Vol. 16, No. 11, pages 1833 – 1844). تتضمن التغيرات الأخرى إضافة ما يطلق عليه غطاء ARCA، والذي يزيد من قابلية الانتقال لـ mRNA الذي تم إنتاجه في المعمل (انظر، طلب البراءة الأمريكية رقم 7074596).

تعد "المنطقة المقصودة" عبارة عن أي منطقة كروماتين خلوية، مثل، على سبيل المثال، جين أو متلازمة غير مشفرة داخل أو مجاورة لجين، يكون من المرغوب فيها ربط جزيء خارجي المنشأ. يمكن أن يكون الارتباط لأغراض قطع DNA المستهدف و/أو إعادة الارتباط المستهدفة. يمكن أن توجد المنطقة المقصودة في كروموسوم، إيبسوم، جينوم عضيي (مثل، مُتَقَدِّرة، يخضوري)، أو جينوم

فيروسي معدي، على سبيل المثال. يمكن أن تكون المنطقة المقصودة داخل منطقة التشفير لجين، داخل مناطق غير مشفرة مستنسخة مثل، على سبيل المثال، متواليات رائدة، متواليات مقطورية أو انترونات، أو داخل مناطق غير مستنسخة، إما قبلية أو بعدية من منطقة التشفير. يمكن أن تكون المنطقة المقصودة صغيرة كما مقدار زوج نوكليوتيد منفرد أو حتى طول 2.000 من أزواج نوكليوتيد، أو أي قيمة مدمجة من أزواج النوكليوتيد.

تتضمن الخلايا " حقيقية النواة"، لكنها لا تنحصر في، خلايا فطرية (مثل خميرة)، خلايا نباتية، خلايا حيوانية، خلايا ثديية وخلايا بشرية (أي، خلايا T).

يتم استخدام المصطلحين "روابط تشغيلية" و"مرتبطة بشكل تشغيلي" (أو" متصلة بشكل قابل للتشغيل") بشكل متبادل بالإشارة إلى موضع متجاور من اثنين أو أكثر من المكونات (مثل عناصر المتوالية)، والتي يتم فيها وضع المكونات بحيث أن يعمل المكونان بشكل معتاد ويسمحا بإمكانية أن واحد على الأقل من المكونات يمكنه أن يتدخل في وظيفة يتم القيام بها من خلال واحد على الأقل من المكونات الأخرى. على سبيل التوضيح، يتم بشكل تشغيلي ربط متوالية تنظيمية استنساخية، مثل مقوي، بمتوالية تشفير حال تحكمت المتوالية التنظيمية الاستنساخية في مستوى الانتساخ لمتوالية التشفير استجابة لوجود أو عدم وجود واحد أو أكثر من العوامل التنظيمية الاستنساخية. يتم بشكل عام على نحو تشغيلي ربط متوالية تنظيمية استنساخية في الموضع سيس بمتوالية تشفير، لكن ليس بالضروري أن تكون مجاورة بشكل مباشر لها. على سبيل المثال، يعد المعزز عبارة عن متوالية تنظيمية استنساخية يتم ربطها بشكل تشغيلي بمتوالية تشفير، حتى إن لم تكونا متجاورتين.

بالنسبة إلى بولي ببتيدات الاندماج، يمكن أن يشير المصطلح "متصل بشكل قابل للتشغيل" إلى حقيقة أن كل مكون من المكونات يقوم بإجراء الوظيفة ذاتها في الربط بالمكون الآخر كما لو كان لم يتم ربطه. على سبيل المثال، بالنسبة إلى بولي ببتيد اندماج يتم فيه اندماج نطاق ربط DNA في ZFP، TALE أو Cas مع نطاق تنشيط، يعد نطاق ربط DNA في ZFP، TALE أو Cas ونطاق التنشيط في رابطة تشغيلية حال أنه، في بولي ببتيد الاندماج، بمقدور جزء نطاق ربط DNA في ZFP، TALE من Cas الارتباط بالموقع المستهدف له و/أو موقع ربطه، بينما يكون بمقدور نطاق التنشيط الزيادة للتعبير الوراثي الجيني بشكل متحكم فيه. عندما يتم اندماج في بولي ببتيد اندماج نطاق ربط DNA في ZFP، TALE أو Cas مع نطاق قطع، يعد نطاق ربط DNA في ZFP، TALE أو Cas ونطاق القطع في رابطة تشغيلية حال أنه، في بولي ببتيد الاندماج، بمقدور جزء

نطاق ربط DNA في ZFP، TALE من Cas الارتباط بالموقع المستهدف له و/أو موقع ربطه، بينما يكون بمقدور نطاق القطع قطع DNA بالقرب من الموقع المستهدف.

يعد مصطلح "شظية وظيفية " من بروتين، بولي ببتيد أو حمض نووي عبارة عن بروتين، بولي ببتيد أو حمض نووي لا تكون المتوالية الخاصة به متطابقة مع البروتين كامل الطول، بولي ببتيد أو حمض نووي، يحتفظ كذلك بالوظيفة ذاتها كما البروتين كامل الطول، بولي ببتيد أو حمض نووي. يمكن أن تمتلك شظية وظيفية عدد أكثر، أقل، أو العدد ذاته من الوحدات البنائية كما الجزيء الأصلي المناظر، و/أو يمكن أن تحتوي على واحد أو أكثر من استبدالات الحمض النووي أو النوكليوتيد. تعد طرق تحديد وظيفة حمض نووي (مثل، وظيفة تشفير، لها القدرة على التهجين مع حمض نووي آخر) معروفة في المجال. بالمثل، تعد طرق تحديد وظيفة البروتين معروفة جيداً في المجال. على سبيل المثال، يمكن أن يتم تحديد وظيفة ربط DNA لبولي ببتيد، على سبيل المثال، بواسطة اختبارات ربط المرشح، الحركية والإزاحة بالنقل الكهربي، أو الترسيب المناعي. يمكن أن يتم اختبار قطع DNA بواسطة النقل الكهربي بالهلام. انظر .Ausubel et al، أعلاه. يمكن أن يتم تحديد قدرة بروتين على التفاعل مع بروتين آخر، على سبيل المثال، بواسطة الترسيب المناعي المشترك، اختبارات ثنائية التهجين أو التتميم، في صورتين وراثية وحيوية كيميائية.

يكون بمقدور "ناقل" نقل متواليات جينية إلى الخلايا المستهدفة. عادةً، تعني المصطلحات "بنية ناقل"، "ناقل تعبير"، و"ناقل نقل جين"، أي بنية حمض نووي قادرة على توجبه التعبير الوراثي عن جين مقصود والتي يمكن أن تنقل متواليات الجين إلى الخلايا المستهدفة. بالتالي، يتضمن المصطلح الاستنساخ، والمواد الناقلة للتعبير الوراثي، كما نواقل مدمجة.

يتم استخدام المصطلحات "خاضع" و"مريض" بشكل متبادل ويشير إلى الثدييات مثل المرضى من البشر والرئيسيات من غير البشر، كما الحيوانات التجريبية مثل الأرانب، الكلاب، الهررة، الجرذان، الفئران، والحيوانات الأخرى. وفقاً لذلك، يعني المصطلح " خاضع" أو "مريض" كما هو مستخدم في الطلب أي مريض ثديي أو خاضع والذي يتم إعطاء الخلايا الجذعية وفق الاختراع له. يتضمن الخاضعون وفق الاختراع الحالي هؤلاء الذين تم تعريضهم إلى واحد أو أكثر من التوكسينات الكيميائية، المتضمنة، على سبيل المثال، توكسين عصبي.

يشير مصطلح "اتخاذ الصورة الجذعية" إلى القدرة النسبية لأي خلية أن تعمل في بأسلوب مشابه للخلية الجذعية، أي، درجة القدرة الشاملة-، المتعددة-، أو القليلة- والتمددية أو التجديد الذاتي اللانهائي التي يمكن أن تتمتع به أي خلية جذعية.

إنزيمات نوكلياز

يتم في هذا الطلب وصف تركيبات، تحديداً إنزيمات نوكلياز، مفيدة في قطع في الجيم الحي لجزيء مانح يحمل جين ناقل وإنزيمات نوكلياز لقطع جينوم الخلية بحيث يتم دمج الجين الناقل في الجينوم بأسلوب مستهدف. في تجسيدات معينة، يكون واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز ناشئاً بشكل طبيعي. في تجسيدات أخرى، يكون واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز ناشئاً بشكل غير طبيعي، أي، معالج وراثياً في نطاق ربط DNA و/أو نطاق القطع. على سبيل المثال، يمكن أن يتم تغيير نطاق ربط DNA لإنزيم نوكلياز ناشئ طبيعيًا ليرتبط بموقع مستهدف مختار (مثل، إنزيم نوكلياز كبير تمت معالجته وراثياً ليربط موقع مختلف عن موقع الربط المترافق). في تجسيدات أخرى، يشتمل إنزيم نوكلياز على نطاقات ربط وقطع DNA غير متجانسة (مثل، إنزيمات نوكلياز إصبع الزنك؛ بروتينات ربط DNA من نطاق مرسل TAL؛ نطاقات ربط DNA لإنزيم نوكلياز كبير مع نطاقات قطع غير متجانسة).

أ-نطاقات ربط DNA

في تجسيدات معينة، يشتمل نطاق ربط DNA لواحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز المستخدمة للقطع و/أو القطع المستهدف في الجسم الحي لجينوم من خلية تشتمل على بروتين إصبع الزنك. بشكل مفضل، يكون بروتين إصبع الزنك عبارة عن بروتين ناشئ بشكل غير طبيعي من حيث أنه يتم معالجته وراثياً ليربط موقع مستهدف مختار. انظر، على سبيل المثال، انظر، على سبيل المثال، Pabo et al. (2001) Ann. Rev. ؛Beerli et al. (2002) Nature Biotechnol. 20:135-141 Segal et al. ؛Isalan et al. (2001) Nature Biotechnol.19:656-660 ؛Biochem.70:313-340 Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. ؛(2001) Curr. Opin. Biotechnol.12:632-637 Biol.10:411-416؛ براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,453,242، 6,534,261، 6,599,692، 6,503,717، 6,689,558، 7,030,215، 6،794،136، 7,067،317، 7,262,054، 7,070,934، 7,253,273 ومنشورات براءات الاختراع الأمريكية أرقام 2005/0064474، 2007/0218528، 2005/0267061، والتي تم تضمينها جميعها بالكامل كمراجع.

يمكن أن يكون لنطاق ربط إصبع زنك معالج وراثياً قدرة ربط نوعية جديدة، مقارنة مع بروتين إصبع زنك ناشئ بشكل طبيعي. تتضمن طرق المعالجة الوراثية، لكنها لا تنحصر في، تصميم عقلاني وأنواع مختلفة من الاختيار. يتضمن التصميم العقلاني، على سبيل المثال، استخدام قواعد بيانات تشتمل على متواليات النوكليوتيد الثلاثية (أو الرباعية) ومتواليات حمض أميني من إصبع زنك منفرد، ترتبط فيها كل متوالية نوكليوتيد ثلاثية أو رباعية مع واحدة أو أكثر من متواليات الحمض الأميني لأصابع الزنك التي ترتبط مع المتوالية الثلاثية أو الرباعية المحددة. انظر، على سبيل المثال، البراءات ذات الملكية المشتركة الأمريكية 6,453,242 و 6,534,261، التي تم تضمينها في هذا الطلب بأكملها كمراجع.

يتم الكشف عن طرق اختيار توضيحية تنطبق على نطاقات ربط DNA، تتضمن أنظمة عرض الملتهمة وأنظمة ثنائية التهجين، في براءات الاختراع الأمريكية 5,789,538، 5,925,523، 6,007,988، 6,013,453، 6,410,248، 6,140,466، 6,200,759 و 6,242,568 كما الدولية 98/37186، 98/53057، 00/27878، 01/88197 و البريطانية 2,338,237. بالإضافة إلى ذلك، تم وصف تعزيز القدرة النوعية على الربط لنطاقات ربط إصبع الزنك، على سبيل المثال، في الطلب الدولي الذي له ملكية مشتركة 02/077227.

بالإضافة إلى ذلك، كما تم الكشف عنه في هذه المراجع وغيرها، يمكن أن يتم ربط نطاقات إصبع الزنك و/أو بروتينات إصبع الزنك المتعددة معاً باستخدام أي متواليات رابطة مناسبة، تتضمن على سبيل المثال، روابط من 5 أو أكثر من الأحماض الأمينية في الطول. انظر، كذلك براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,479,626، 6,903,185، 7,153,949 للمتواليات الرابطة التوضيحية ذات 6 أو أكثر من الأحماض الأمينية في الطول. يمكن أن تتضمن البروتينات التي تم وصفها في هذا الطلب أي توليفة من الروابط المناسبة بين أصابع الزنك المنفردة من البروتين.

يعد اختيار المواقع المستهدفة؛ ZFPs وطرق لتصميم بروتينات الاندماج وانشاؤها (وبولي نوكليوتيدات تشفرها) معروفاً لذوي الخبرة في المجال ويتم وصفه بالتفصيل في براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,140,081؛ 5,789,538؛ 6,453,242؛ 6,534,261؛ 5,925,523؛ 6,007,988؛ 6,013,453؛ 6,200,759؛ WO 95/19431؛ WO 96/06166؛ WO 98/53057؛ WO 98/54311؛ WO 00/27878؛ WO 01/60970؛ WO 01/88197؛ WO 02/099084؛ WO 98/53058؛ WO 98/53059؛ WO 98/53060؛ WO 02/016536 و WO 03/016496.

يمكن أن يتم استخدام تقريباً أي رابط (مباعد) بين واحد أو أكثر من مكونات نطاق ربط DNA (مثل، أصابع الزنك)، بين واحد أو أكثر من نطاقات ربط DNA و/أو بين نطاق ربط DNA ونطاق وظيفي (مثل، إنزيم نوكلياز). تتضمن الأمثلة غير المقيدة من المتواليات الرابطة المناسبة براءات الاختراع الأمريكية أرقام 8,772,453؛ 7,888,121؛ 6,479,626؛ 6,903,185؛ و7,153,949؛ ومنشورات الأمريكية أرقام 20090305419؛ 20150064789 و20150132269. بالتالي، يمكن أن تتضمن البروتينات الموصوفة في هذا الطلب أي توليفة من روابط مناسبة بين مكونات ربط DNA المنفردة و/أو بين نطاق ربط DNA والنطاق الوظيفي للتركيبات الموصوفة في هذا الطلب.

ب- نطاقات القطع

يمكن أن يتم بشكل تشغيلي ربط أي نطاق قطع مناسب بنطاقات ربط DNA كما هو موصوف في هذا الطلب لتكوين إنزيم نوكلياز. يمكن أن يكون نطاق القطع غير متجانس بالنسبة إلى نطاق ربط DNA، على سبيل المثال نطاق ربط DNA بإصبع زنك ونطاق قطع من نوكلياز. يمكن أن يتم الحصول على نطاقات قطع غير متجانسة من أي من إنزيم نوكلياز داخلي أو خارجي. تتضمن إنزيمات النوكلياز الداخلية التوضيحية التي يتم منها اشتقاق نطاق قطع، لكنها لا تنحصر في، إنزيمات نوكلياز داخلية للتقييد وإنزيمات نوكلياز داخلية للاستضافة. انظر، على سبيل المثال، New England Biolabs, Beverly, MA 2003 Catalogue؛ و Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res.25:3379-3388. تعد الإنزيمات الإضافية التي تقطع DNA معروفة (على سبيل المثال، إنزيم نوكلياز S1 ؛ إنزيم نوكلياز فولي من نوع mung ؛ I DNase بنكرياسي؛ إنزيم نوكلياز المكورات الصغيرة؛ إنزيم نوكلياز HO من خميرة؛ انظر كذلك Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1993). يمكن أن يتم استخدام واحد أو أكثر من هذه الإنزيمات (أو الشظايا الوظيفية منها) كمصدر لنطاقات قطع ونطاقات نصفية للقطع.

بالمثل، يمكن أن يتم اشتقاق نطاق نصفي للقطع من أي نوكلياز أو جزء منه، كما ورد أعلاه، يتطلب كذلك دايمرة لنشاط القطع. بشكل عام، يكون من المطلوب وجود بروتيني اندماج للقطع حال اشتملت بروتينات الاندماج على نطاقات نصفية. بشكل بديل، يمكن أن يتم استخدام بروتين منفرد يشتمل على نطاقين نصفيين للقطع. يمكن أن يتم اشتقاق النطاقين النصفيين للقطع من النوكلياز الداخلي ذاته (أو شظايا وظيفية منه)، أو يمكن أن يتم اشتقاق كل نطاق نصفي للقطع من نوكلياز داخلي مختلف (أو شظايا وظيفية منه). بالإضافة إلى ذلك، يتم بشكل مفضل وضع مواقع الاستهداف

لبروتيني الاندماج، بالنسبة إلى بعضهما البعض، بحيث يضع ارتباط بروتيني الاندماج على المواقع المستهدفة الخاصة بها نطاقات نصفية للقطع في اتجاه مكاني من بعضها البعض بما يسمح للنطاقات النصفية للقطع بأن تشكل نطاق قطع وظيفي، مثل، بواسطة الدايمرة. بالتالي، في تجسيدات معينة، يتم فصل الحواف القريبة بواسطة 5-8 نوكليوتيد أو 15-18 نوكليوتيد. مع ذلك يمكن أن يتدخل أي عدد صحيح من النوكليوتيدات أو أزواج النوكليوتيد بين موقعي استهداف (مثل، من 2 إلى 50 من أزواج النوكليوتيد أو يزيد). بشكل عام، يمتد موقع القطع بين المواقع المستهدفة.

توجد إنزيمات نوكلياز داخلية للتقييد (إنزيمات تقييد) في الكثير من الأنواع وتعد قادرة على الارتباط النوعي لمتوالية بـ DNA (في موقع التعرف)، وتقطع DNA في أو بالقرب من موقع الربط. تقطع إنزيمات تقييد عينة (مثل، النوع IIS) DNA في المواقع المزالة من موقع التعرف ولها نطاقات ارتباط وقطع قابلة للاستبدال. على سبيل المثال، يحفز إنزيم Fok I من النوع IIS قطع مزدوج الجديلة لـ DNA في 9 نوكليوتيدات من موقع التعرف الخاص به على إحدى الجدائل و13 من النوكليوتيدات من موقع التعرف الخاص به على الأخرى. انظر، على سبيل المثال، براءات الاختراع الأمريكية 5,356,802؛ 5,436,150 و5,487,994؛ كما Li et al.(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279؛ Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768؛ Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887؛ Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982. بالتالي، في أحد التجسيدات، تشتمل بروتينات الاندماج على نطاق القطع (أو نطاق نصفي للقطع) من إنزيم تقييد من النوع IIS واحد على الأقل وواحد أو أكثر من نطاقات ربط إصبع الزنك، والتي يمكن أن تتم معالجتها وراثياً أو لا يتم ذلك.

يتمثل إنزيم تقييد من النوع IIS توضيحي، له نطاق قطع قابل للاستبدال من نطاق الربط، في FokI. يعد الإنزيم المحدد نشطًا في صورة دايمر. Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575. وفقًا لذلك، لأغراض الكشف الحالي، يعتبر جزء من إنزيم Fok I المستخدم في بروتينات الاندماج التي تم الكشف عنها عبارة عن نطاق نصفي للقطع. بالتالي، بالنسبة للقطع مزدوج الجديلة المستهدف و/أو الاستبدال المستهدف للمتواليات الخلوية باستخدام اندماجات Fok I مع إصبع الزنك، بروتيني اندماج، يشتمل كل منها على نطاق نصفي لقطع من FokI، لإعادة تشكيل نطاق قطع نشط حفزياً. بشكل بديل، يمكن كذلك أن يتم استخدام جزيء ببتيد أحادي يحتوي على نطاق ربط إصبع زنك ونطاقي نصفيين للقطع من Fok I. تم توفير متغيرات للقطع مستهدفة وتغيير متوالية القطع باستخدام اندماجات إصبع زنك Fok I في موضع آخر من هذا الكشف.

يمكن أن يكون نطاق للقطع أو نطاق نصفي للقطع عبارة عن أي جزء من بروتين يحتفظ بنشاط القطع، أو الذي يحتفظ بالقدرة على التحويل لصورة متعددة الدايمرات (أي، يعالج دايمرياً) لتكوين نطاق قطع وظيفي.

يتم وصف إنزيمات التقييد من النوع IIS التوضيحية في براءة الاختراع الأمريكية رقم 7,888,121 التي تم تضمينها في هذا الطلب كمرجع بأكملها. تحتوي كذلك إنزيمات التقييد الإضافية على نطاقات للربط وللقطع، ويتم تناولها بواسطة الكشف الحالي. انظر، على سبيل المثال، Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420.

في تجسيدات معينة، يشتمل نطاق القطع على واحد أو أكثر من نطاق نصفي للقطع معالج وراثياً (المشار إليها كذلك في صورة طفرات نطاق الديمرة) الذي يقلص من الدايمرة المتجانسة أو يمنعها، كما هو موصوف، على سبيل المثال، انظر، مثل، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 7,914,796؛ 8,034,598 و8,623,618، والتي يتم تضمين جميع الكشوف الخاصة بها في هذا الطلب كمراجع بأكملها. تعد الوحدات البنائية للحمض النووي في المواضع 446، 447، 479، 483، 484، 486، 487، 490، 491، 496، 498، 499، 500، 531، 534، 537، و538 من FokI جميعها مستهدفات للتأثير في دايمرة نطاقات نصفية للقطع FokI.

تتضمن النطاقات النصفية للقطع المعالجة وراثياً التوضيحية من FokI التي تشكل دايمرات غير متجانسة ملزمة زوج يتضمن فيه نطاق نصفي للقطع أول طفرات في الوحدات البنائية من الحمض الأميني عند الموضعين 490 و538 من FokI ويتضمن نطاق نصفي للقطع ثانٍ طفرات عند الوحدات البنائية من الحمض الأميني 486 و499.

بالتالي، في أحد التجسيدات، تحل طفرة في 490 محل Glu (E) بـ Lys (K)؛ تحل الطفرة في 538 محل Iso (I) بـ Lys (K)؛ حلت الطفرة في 486 محل Gln (Q) بـ Glu (E)؛ وتحل الطفرة في الموضع 499 محل Iso (I) بـ Lys (K). تحديداً، تم تحضير النطاقات النصفية للقطع المعالجة وراثياً الموصوفة في هذا الطلب بواسطة مواضع تطفيرية 490 (E→K) و538 (I→K) في نطاق نصفي للقطع واحد لإنتاج نطاق نصفي للقطع معالج وراثياً محدد على أنه "I538K:E490K" وبواسطة مواضع تطفيرية 486 (Q→E) و499 (I→L) في نطاق نصفي للقطع آخر لإنتاج نطاق نصفي للقطع معالج وراثياً محدد على أنه "I499L:Q486E". تعد النطاقات النصفية للقطع المعالجة وراثياً الموصوفة في هذا الطلب طفرات من دايمر غير متجانس ملزمة يتم فيها تقليل القطع الشاذ أو

تلاشيه. انظر، مثل، منشور براءة الاختراع الأمريكية رقم 2008/0131962، يتم تضمين الكشف الخاص به كمرجع بأكمله لجميع الأغراض. في تجسيدات معينة، يشتمل النطاق النصفي للقطع المعالج وراثياً على طفرات في المواضع 486، 499 و496 (مرقمة بالنسبة إلى FokI من النوع غير المعالج)، لطفرات حالية تستبدل الوحدة البنائية (Q) Gln من النوع غير المعالج في الموضع 486 بالوحدة البنائية (E) Glu، الوحدة البنائية (I) Iso من النوع غير المعالج في الموضع 499 بالوحدة البنائية (L) Leu والوحدة البنائية (N) Asn من النوع غير المعالج في الموضع 496 بالوحدة البنائية (D) Asp أو (E) Glu (المشار إليها كذلك في صورة نطاقات "ELD" و"ELE"، على التوالي). في تجسيدات أخرى، يشتمل النطاق النصفي للقطع المعالج وراثياً على طفرات في المواضع 490، 538 و537 (مرقمة بالنسبة إلى FokI من النوع غير المعالج)، لطفرات حالية تستبدل الوحدة البنائية (E) Glu من النوع غير المعالج في الموضع 490 بالوحدة البنائية (K) Lys، الوحدة البنائية Iso (1) من النوع غير المعالج في الموضع 538 بالوحدة البنائية (K) Lys، والوحدة البنائية (H) His من النوع غير المعالج في الموضع 537 بالوحدة البنائية (K) Lys أو الوحدة البنائية (R) Arg (المشار إليها كذلك في صورة نطاقي "KKK" و"KKR"، على التوالي). في تجسيدات أخرى، يشتمل النطاق النصفي للقطع المعالج وراثياً على طفرات في المواضع 490 و537 (مرقمة بالنسبة إلى FokI من النوع غير المعالج)، لطفرات حالية تستبدل الوحدة البنائية (E) Glu من النوع غير المعالج في الموضع 490 بالوحدة البنائية (K) Lys والوحدة البنائية (H) His من النوع غير المعالج في الموضع 537 بالوحدة البنائية (K) Lys أو الوحدة البنائية (R) Arg (المشار إليها كذلك في صورة نطاقي "KIK" و"KIR"، على التوالي. انظر، مثل، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 7,914,796؛ 8,034,598 و8,623,618. في تجسيدات أخرى، يشتمل النطاق النصفي للقطع المعالج وراثياً على "Sharkey" و/أو طفرات "Sharkey" (انظر Guo et al, (2010) J. Mol. Biol. 400(1):96-107).

يمكن أن يتم تحضير نطاقات نصفية للقطع معالجة وراثياً الموصوفة في هذا الطلب باستخدام أي طريقة مناسبة، على سبيل المثال، بواسطة توليد طفرة موجهة للموقع لنطاقات نصفية للقطع من النوع غير المعالج (Fok I) كما هو موصوف في منشورات براءة الاختراع الأمريكية أرقام 7,888,121؛7,914,796؛ 8,034,598 و8,623,618.

بشكل بديل، يمكن أن يتم تجميع إنزيمات نوكلياز في الجسم الحي في موقع مستهدف من الحمض النووي باستخدام تقنية يطلق عليها "انقسام الإنزيم" (انظر، مثل منشور البراءة الأمريكية رقم

20090068164). يمكن أن يتم التعبير عن مكونات إنزيمات الانقسام المذكورة إما على بنيات التعبير الوراثي المنفصلة، أو يمكن أن يتم ربطها في أحد إطارات القراءة المفتوحة حيث يتم فصل المكونات المنفردة، على سبيل المثال، بواسطة ببتيد القطع الذاتي 2A أو متوالية IRES. يمكن أن تكون المكونات عبارة عن نطاقات ربط إصبع زنك منفردة أو نطاق من نطاق ربط حمض نووي من إنزيم نوكلياز ضخم.

يمكن أن تتم مراقبة إنزيمات النوكلياز من حيث النشاط قبل الاستخدام، على سبيل المثال في نظام كروموسومي قائم على الخميرة كما هو موصوف في WO 2009/042163 و20090068164. يمكن أن يكون التعبير الوراثي عن إنزيم النوكلياز تحت التحكم لمقوي تكويني أو مقوي حثي، على سبيل المثال، مقوي من جلاكتوكيناز يتم تنشيطه (إزالة كبحه) في وجود رافينوز و/أو جلاكتوز في وجود جلوكوز.

يمكن أن يشكل إنزيم (إنزيمات) النوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب قطع بالجديلة المزدوجة و/أو المنفردة في الموقع المستهدف. في تجسيدات معينة، يشتمل إنزيم النوكلياز على نطاق غير نشط حفزياً (مثل، بروتين FokI و/أو Cas). انظر، على سبيل المثال البراءة الأمريكية رقم 9,200,266؛ 8,703,489 و Guillinger et al. (2014) Nature Biotech. 32(6):577–582. يمكن لنطاق قطع غير نشط حفزياً، في توليفة مع نطاق نشط حفزياً أن يعمل في صورة نيكاز لتكوين قطع بجديلة منفرد. بالتالي، يمكن أن يتم استخدام اثنين من إنزيمات نيكاز في توليفة لتكوين قطع مزدوج الجديلة في منطقة معينة. تعد كذلك إنزيمات نيكاز الإضافية معروفة في المجال، على سبيل المثال، McCaffery et al. (2016) *Nucleic Acids Res.* 44(2):e11. doi: 10.1093/nar/gkv878. Epub 2015 Oct 19.

المواقع المستهدفة

كما هو موصوف بالتفصيل أدناه، يمكن أن تتم المعالجة الوراثية لنطاقات DNA لترتبط بأي متوالية مختارة. يمكن أن يكون لنطاق ربط DNA معالج وراثياً قدرة نوعية على الارتباط جديدة، بالمقارنة مع نطاق ربط DNA ناشئ طبيعياً. في تجسيدات معينة، ترتبط نطاقات ربط DNA بمتوالية داخل متوالية معززة من BCL11A، على سبيل المثال يقع موقع مستهدف (عادةً 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 21 أو حتى أكثر من أزواج القاعدة) بين الإكسون 2 و الإكسون 3 من BCL11A، متضمن نطاقات ربط DNA ترتبط بمتوالية داخل موقع فائق الحساسية

DNAseI في متوالية المعززة من BCL11A (مثل، 58+) كما هو موضح في الجدول 1. تتضمن الطرق، لكنها لا تنحصر في، تصميم عقلاني وأنواع مختلفة من الاختيار. يتضمن التصميم العقلاني، على سبيل المثال، استخدام قواعد بيانات تشتمل على متواليات النوكليوتيد الثلاثية (أو الرباعية) ومتواليات حمض أميني من إصبع زنك منفرد، ترتبط فيها كل متوالية نوكليوتيد ثلاثية أو رباعية مع واحدة أو أكثر من متواليات الحمض الأميني لأصابع الزنك التي ترتبط مع المتوالية الثلاثية أو الرباعية المحددة. انظر، على سبيل المثال، البراءات ذات الملكية المشتركة الأمريكية 6,453,242 و6,534,261، التي تم تضمينها في هذا الطلب بأكملها كمراجع. يمكن كذلك إجراء تصميم عقلاني لنطاقات مرسل TAL. انظر، مثل، المنشور الأمريكي رقم 20110301073.

يتم الكشف عن طرق اختيار توضيحية تنطبق على نطاقات ربط DNA، تتضمن أنظمة عرض الملتهمة وأنظمة ثنائية التهجين، في براءات الاختراع الأمريكية 5,789,538؛ 5,925,523؛ 6,007,988؛ 6,013,453؛ 6,410,248؛ 6,140,466؛ 6,200,759؛ و 6,242,568؛ كما WO 98/37186؛ WO 98/53057؛ WO 00/27878؛ WO 01/88197 و2,338,237 GB. بالإضافة إلى ذلك، تم وصف تعزيز القدرة النوعية على الربط لنطاقات ربط إصبع الزنك، على سبيل المثال، في الطلب الدولي الذي له ملكية مشتركة WO 02/077227.

يعد اختيار المواقع المستهدفة؛ إنزيمات النوكلياز وطرق لتصميم بروتينات الاندماج وإنشاؤها (وبولي نوكليوتيدات تشفرها) معروفاً لذوي الخبرة في المجال وموصوف بالتفصيل في منشورات طلبات براءتي الاختراع الأمريكيتين 20050064474 و20060188987، اللتان تم تضمينهما في هذا الطلب بكاملهما.

بالإضافة إلى ذلك، كما تم الكشف عنه في هذه المراجع وغيرها، يمكن أن يتم ربط نطاقات ربط DNA (مثل، بروتينات إصبع الزنك المتعددة) و/أو اندماجات نطاق (نطاقات) ربط DNA ونطاق (نطاقات) وظيفية معاً باستخدام أي متواليات رابطة مناسبة، تتضمن على سبيل المثال، روابط من 5 أو أكثر من الأحماض الأمينية في الطول. براءات الاختراع الأمريكية أرقام 8,772,453؛ 7,888,121 (مثل، رابط " ZC")؛ 6,479,626؛ 6,903,185 و7,153,949 ؛ المنشور الأمريكي رقم 20090305419) و20150064789. يمكن أن تتضمن البروتينات التي تم وصفها في هذا الطلب أي توليفة من الروابط المناسبة بين نطاقات ربط DNA المنفردة من البروتين. انظر، كذلك، البراءة الأمريكية رقم 8,586,526.

المانحات

في تجسيدات معينة، يتعلق الكشف الحالي بدمج مستهدف يتدخل فيه إنزيم نوكلياز لمتوالية خارجية المنشأ في جينوم خلية باستخدام جزيئات ربط منطقة معززة من BCL11A موصوفة في هذا الطلب. كما لوحظ أعلاه، إدخال متوالية خارجية المنشأ (يسمى كذلك "متوالية مانحة" أو "مانح" أو "جين ناقل")، على سبيل المثال لحذف منطقة معينة و/أو تصحيح جين طفري أو للتعبير الوراثي المتزايد عن جين من النوع غير المعالج. سيتضح بشكل سهل أن المتوالية المانحة لا تكون بشكل معتاد متطابقة مع المتوالية الجينومية حيث تم وضعها. يمكن أن تحتوي متوالية مانحة على متوالية غير متجانسة مجانحة بمنطقتي تجانس للسماح لـ HDR الفعال في الموقع المقصود أو يمكن أن يتم دمجها من خلال آليات إصلاح موجهة غير متجانسة. بشكل إضافي، يمكن أن تشتمل المتواليات المانحة على جزيء ناقل يحتوي على المتواليات التي تكون غير متجانسة مع المنطقة المقصودة من الكروماتين الخلوي. يمكن أن يحتوي جزيء مانح على العديد من المناطق، غير المتصلة من التجانس مع الكروماتين الخلوي، و، على سبيل المثال، يؤدي إلى حذف منطقة معززة لـ BCL11a (أو شظية منها) عند استخدامها في صورة ركيزة لإصلاح DBS مستحث بواحد من إنزيمات النوكلياز الموصوفة في هذا الطلب. كذلك، لإدخال مستهدف للمتواليات غير الموجودة بشكل طبيعي في منطقة مقصودة، يمكن أن توجد المتواليات المذكورة في جزيء حمض نووي مانح ومجانحة بواسطة مناطق تجانس مع متوالية في المنطقة المقصودة.

يمكن أن تتم الإشارة إلى البولي نوكليوتيدات للإدخال باسم بولي نوكليوتيدات "خارجية المنشأ"، بولي نوكليوتيدات "مانحة" أو جزيئات أو "جينات ناقلة". يمكن أن يكون بولي نوكليوتيد مانح عبارة عن DNA أو RNA، أحادي الجديلة و/أو مزدوج الجديلة ويمكن أن يتم إدخالها في خلية في صورة خطية أو دائرية. انظر، على سبيل المثال، منشورات البراءات الأمريكية أرقام 20100047805 و20110207221. يتم بشكل مفضل تضمين متوالية (متواليات) مانحة داخل DNA MC، يمكن أن يتم إدخالها في الخلية في صورة دائرية أو خطية. في حال إدخالها في الصورة الخطية، يمكن أن تتم حماية أطراف المتوالية المانحة (مثل، من تحلل ناتج تحلل نواة خارجية المنشأ) بواسطة الطرق المعروفة لذوي الخبرة في المجال. على سبيل المثال، تتم إضافة واحدة أو أكثر من وحدات بنائية من داي ديوكسي نوكليوتيد إلى الطرف 3' من جزيء خطي و/أو يتم ربط أوليجونوكليوتيدات ذاتية التتميم بأحد الطرفين أو كليهما. انظر، على سبيل المثال، Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA84:4959-4963؛ Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. تتضمن الطرق الإضافية لحماية البولي نوكليوتيدات خارجية المنشأ من التحلل، لكنها لا تنحصر في، إضافة مجموعة

(مجموعات) أمينية طرفية واستخدام روابط بين النوكليوتيد معدلة، مثل، على سبيل المثال، وحدات بنائية من فوسفوروثيوات، فوسفوراميدات، وريبوز O-ميثيل أو ديوكسي ريبوز. حال إدخالها في صورة مزدوجة الجديلة، يمكن أن يتضمن المانح واحد أو أكثر من مواقع استهداف إنزيم النوكلياز، على سبيل المثال، مواقع استهداف إنزيم النوكلياز مجانحة للجين الناقل المراد دمجه في جينوم الخلية. انظر، على سبيل المثال، منشور البراءة الأمريكية رقم 20130326645.

يمكن أن يتم إدخال بولي نوكليوتيد في خلية كجزء من جزيء ناقل له متواليات إضافية مثل، على سبيل المثال، أصول الاستنساخ، المقويات والجينات التي تشفر المقاومة المضادة الحيوية. علاوة على ذلك، يمكن أن يتم إدخال بولي نوكليوتيدات مانحة في صورة حمض نووي مجرد، بينما تم تكوين معقد من حمض نووي مع عامل مثل جسيم دهني أو بولوكسامير، أو يمكن أن يتم توصليها بواسطة الفيروسات (*مثل*، فيروس غدي، AAV، فيروس هربس، فيروس نسخ عكسي، فيروس بطئ وفيروس بطئ مختل الإنتيجراز .integrase defective lentivirus (IDLV)).

في تجسيدات معينة، يشتمل المانح مزدوج الجديلة على متواليات (مثل، متواليات التشفير، المُشار إليها أيضاً بالجين الناقل) أكبر من 1 كيلو قاعدة في الطول، على سبيل المثال بين 2 و200 كيلو قاعدة، بين 2 و10 كيلو قاعدة (أو أي قيمة بين ذلك). كذلك يشتمل المانح مزدوج الجديلة على الأقل على موقع استهداف إنزيم نوكلياز واحد، على سبيل المثال. في تجسيدات معينة، يشتمل المانح على 2 موقع استهداف على الأقل، على سبيل المثال لزوج من ZFNs أو TALENs. بشكل نمطي، تكون مواقع استهداف إنزيم نوكلياز خارج متواليات جين ناقل، على سبيل المثال، '5 و/أو '3 إلى متواليات جين ناقل، لقطع الجين الناقل. يمكن أن تكون مواقع قطع نوكلياز لأي إنزيم (إنزيمات) نوكلياز. في تجسيدات معينة، يكون موقع (مواقع) استهداف نوكلياز المتضمنة في المانح مزدوج الجديلة مخصصة لنفس إنزيم (إنزيمات) نوكلياز المستخدمة لقطع الهدف داخلي المنشأ الذي يتم بداخله دمج مانح القطع بواسطة طرق تعتمد على التجانس.

بصفة عامة يتم إدخال المانح بحيث يتم اشتقاق التعبير الوراثي عنه بواسطة مقوي داخلي المنشأ عند موقع الإدماج، تحديداً المقوي الذي يشتق التعبير الوراثي عن الجين داخلي المنشأ الذي يتم إدخال المانح بداخله (مثل، الجلوبين، AAVS1، إلى أخره). على الرغم من ذلك، سيتضح أن المانح يمكن أن يشتمل على مقوي و/أو معزز، على سبيل المثال مقوي تأسيسي أو معزز نوعي نسيجي أو قابل للحث.

ويمكن إدراج جزيء المانح في جين داخلي المنشأ بحيث يتم التعبير الوراثي عن كل أو بعض أو أي من الجينات داخلية المنشأ. في نماذج أخرى، يتم دمج الجين الناقل (على سبيل المثال، مع أو بدون متوالية تشفير جلوبين) في أي مرفأ داخلي المنشأ، على سبيل المثال مرفأ آمن. أنظر، منشورات براءات الاختراع الأمريكية رقم 20080299580؛20080159996؛و 201000218264.

وعلاوة على ذلك، على الرغم من كونها غير مطلوبة للتعبير الوراثي، يمكن أيضاً أن تشتمل المتوالية خارجية المنشأ على متواليات تنظيمية استنساخية أو انتقالية، على سبيل المثال، المقويات، والمعززات، والعوازل، مواقع الإدخال الريبوسومية الداخلية، والمتواليات المشفرة لببتيدات 2A و/أو إشارات معالجة لمجموعة البولي أدينيل.

ويمكن عزل الجينات الناقلة الموجودة على متواليات المانح الموصوفة هنا من البلازميدات أو الخلايا أو المصادر الأخرى باستخدام التقنيات القياسية المعروفة في المجال مثل PCR. يمكن أن تشتمل مانحات الاستخدام على أنواع مختلفة من البنية، بما في ذلك الدائرية فائقة الالتفاف، الدائرية المرتخية والخطية وما شابه ذلك. بدلا من ذلك، يمكن أن يتم تخليقها كيميائياً باستخدام تقنيات تخليق أوليجو نوكليوتيد القياسية. بالإضافة إلى ذلك، قد تتم معالجة المانحات بالميثيل أو بقلة الميثيل. يمكن أن تكون المانحات في صورة كروموسومات صناعية من الخميرة أو البكتريا bacterial or yeast artificial chromosomes (BACs or YACs).

يمكن أن تشتمل بولي نوكليوتيدات المانح مزدوج الجديلة الموصوفة في هذا الطلب على قاعدة واحدة أو أكثر غير طبيعية و/أو سلاسل رئيسية. تحديداً، يمكن أن يتم تنفيذ إدخال جزيء المانح مع مركبات سيتوزين معالجة بالميثيل باستخدام الطرق الموصوفة في هذا الطلب لتحقيق حالة من التكاثر الاستنساخي في المنطقة المقصودة.

يمكن أن يشتمل البولي نوكليوتيدات (المانح) الخارجي على أي متوالية خارجية (متوالية خارجية). تشتمل المتواليات الخارجية التوضيحية، ولكنها لا تقتصر على أي متوالية تشفير من البولي ببتيد (مثل، cDNAs)، متواليات معززة، متواليات مقوية، علامات قمة لاصقة، جينات مرقمة، مواقع تعرف إنزيم قطع وأنواع مختلفة من بنيات التعبير الوراثي. تشتمل الجينات المرقمة، ولكنها لا تقتصر على، بروتينات مشفرة للمتواليات التي تتدخل في مقاومة المضاد الحيوي (مثل، مقاومة الأمبيسلين، مقاومة النيومايسين، مقاومة G418، مقاومة البوروميسين)، البروتينات اللامعة أو الفلورية أو الملونة المشفرة للمتواليات (مثل، البروتين الفلوري الأخضر، البروتين الفلوري الأخضر المقوى، البروتين الفلوري

الأحمر، اللوسيفراز)، والبورتينات التي تتداخل في نمو الخلية التي تمت تقويتها و/أو تضخم الجين (مثل، داي هيدرو فولات ريدوكتاز). تتضمن علامات علامات القمة اللاصقة، على سبيل المثال، نسخة واحدة أو أكثر من FLAG، His، myc، Tap، HA أو أي متوالية حمض أميني قابلة للكشف عنها.

في تجسيد مفضل، تشتمل المتوالية الخارجية (الجين الناقل) على البولي نوكليوتيد المشفر لأي بولي ببتيد يُفضل وجود التعبير الوراثي عنه في الخلية، والذي يشتمل، ولكن لا ينحصر على الأجسام المضادة، الجينات المضادة، الإنزيمات، المستقبلات (سطح الخلية أو النواة)، الهرمونات، الليمفوكينات، السيتوكينات، بولي ببتيدات مرسلة، عوامل النمو، وشظايا وظيفية لأي مما ذكر أعلاه. يمكن أن تكون المتواليات المشفرة، على سبيل المثال، عبارة عن cDNAs.

على سبيل المثال، يمكن أن تشتمل المتوالية خارجية المنشأ على متوالية مشفرة للببتيد والتي تكون غير موجودة أو غير وظيفية في الخاضع الذي يحمل مرض وراثي، الذي يشتمل ولكن لا ينحصر على الأمراض الوراثية التالية: ورم غضروفي، عمى الألوان التام، نقص مالتاز الحمض، نقص إنزيم أدينوسين دي أميناز (OMIM رقم 102700)، سوء تغذية الكظرية وبيضاء الدماغ adrenoleukodystrophy، متلازمة إيكاردي aicardi syndrome، عوز ألفا1 أنتيتريبسين alpha-1 antitrypsin deficiency، ثلاسيميا ألفا alpha-thalassemia، متلازمة حساسية الاندروجين androgen insensitivity syndrome، متلازمة أبير apert syndrome، اعتلال البطين الأيمن اللانظامي arrhythmogenic right ventricular، رنج توسع الشعيرات ataxia telangictasia، متلازمة بارث barth syndrome، بيتا ثلاسيمية beta-thalassemia، متلازمة الوَحْمَةُ الزَرْقاءُ المَطَّاطِيَّةُ الفُقَّاعِيَّة blue rubber bleb nevus syndrome، مرض كانافان canavan disease، أمراض الورم الحبيبي المزمن chronic granulomatous diseases (CGD)، متلازمة المواء أو كري دو شا cri du chat syndrome، التليف الكيسي cystic fibrosis، داء ديركوم dercum's disease، خلل التنسج الأديمي الظاهر ناقص التعرق ectodermal dysplasia، فقر دم فانكوني fanconi anemia، خلل التنسج الليفي المعظم المترقي fibrodysplasiaossificans progressive، متلازمة كروموزوم إكس الهش fragile X syndrome،الجالاكتوز في الدم galactosemis، داء جوشيه Gaucher's disease، الدَّاءُ الجانْغجليوزِيدِيُّ المُتَعَمِّم generalized gangliosidoses (مثل، GM1)، الاصطباغ الدموى الوراثى hemochromatosis، طفرة C هيموجلوبين في الكودون 6 من بيتا-جلوبين the hemoglobin C mutation in the 6th codon of beta-globin (HbC)، نزف الدم الوراثي أو

الهيموفيليا hemophilia، داء هنتنجتون Huntington's disease، متلازمة هيرلر Hurler Syndrome، نقص الفسفاتازية hypophosphatasia، متلازمة كلاينفلتر Klinefleter syndrome، داء كرابه Krabbes Disease، متلازمة لانجر – جيديون Langer-Giedion Syndrome، نقص التصاق كريات الدم البيضاء leukocyte adhesion deficiency (LAD، OMIM رقم 116920)، حثل المادة البيضاء leukodystrophy، متلازمة كيو تي الطويلة long QT syndrome، متلازمة مارفان Marfan syndrome، متلازمة ميبيوس Moebius syndrome، متلازمة هنتر mucopolysaccharidosis (MPS)، متلازمة الظفر والرضفة nail patella syndrome، مرض السكري الكاذب nephrogenic diabetes insipdius، الورم العصبي الليفي من النوع الأول neurofibromatosis، مرض نيمان–بيك Neimann-Pick disease، تكوين العظم الناقص osteogenesis imperfecta، البورفيريا porphyria، متلازمة برادر ويلي Prader-Willi syndrome، متلازمة بروجيريا progeria، متلازمة بروتيوس Proteus syndrome، ورم أرومة الشبكية retinoblastoma، متلازمة رت Rett syndrome، متلازمة روبنشتاين تايبي Rubinstein-Taybi syndrome، متلازمة سانفيليبو Sanfilippo syndrome، نقص المناعة المشترك الشديد severe combined immunodeficiency (SCID)، متلازمة شواشمان Shwachman syndrome، مرض الخلايا المنجلية sickle cell disease (فقر الدم المنجلي)، متلازمة سميث ماجينيس Smith-Magenis syndrome، متلازمة ستيكلر Stickler syndrome، مرض تاي–ساكس Tay-Sachs disease، متلازمة غياب الكعبرة وقلة الصفيحات Thrombocytopenia Absent Radius (TAR)، متلازمة تريتشر كولينز syndrome, Treacher Collins syndrome، التثلث الصبغي trisomy، التصلب الدرني tuberous sclerosis، متلازمة تيرنر Turner's syndrome، اضطراب دورة اليوريا urea cycle disorder، مرض فون هيبل ليندو von Hippel-Landau disease، متلازمة واردنبورج Waardenburg syndrome، متلازمة ويليامز Williams syndrome، مرض ويلسون Wilson's disease، متلازمة ويسكوت–ألدريتش Wiskott-Aldrich syndrome، متلازمة التكاثر اللمفي X-linked lymphoproliferative syndrome المرتبط بـ X (XLP، OMIM رقم 308240).

تتضمن الأمراض التوضيحية الإضافية التي يمكن أن تتم معالجتها بواسطة الدمج المستهدف صور نقص المناعة المكتسبة، أمراض التخزين بالجسم الحال (*مثل*، مرض Gaucher، GM1، مرض Fabry ومرض Tay–Sachs)، أمراض عديدات السكريات المخاطية (*مثل* مرض Hunter، مرض

Hurler)، داء الاعتلال الهيموجلوبيني (مثل، داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة، HbC، α -ثَلاسيمِيَّة، β-ثَلاسيمِيَّة) وسيولة الدم.

في تجسيدات معينة، يمكن أن تشتمل متواليات خارجية المنشأ على جين مرقم (موصوف أعلاه)، بما يسمح باختيار الخلايا التي تعرضت إلى دمج مستهدف، ومتوالية مرتبطة تشفر وظائف إضافية. تتضمن أمثلة غير مقيدة من الجينات المرقمة GFP، مرقم (مرقمات) اختيار عقار وما شابه.

يمكن أن تتضمن متواليات جين إضافية يمكن أن يتم إدخالها، على سبيل المثال، جينات من النوع غير المعالج لتحل محل المتواليات المطفرة. على سبيل المثال، يمكن أن يتم إدخال متوالية جين من العامل IX من النوع غير المعالج في جنيوم خلية جذعية يتم فيها تطفير نسخة داخلية المنشأ من الجين. يمكن أن يتم إدخال نسخة من النوع غير المعالج في موقع داخلي المنشأ، أو يمكن بشكل بديل استهدافها لموقع مرفأ آمن.

تستخدم بناء سلسلة التعبير الوراثي المذكورة، بإتباع دراسات المواصفة الحالية، منهجيات معروفة جيداً في مجال الحيوية الجزيئية (انظر، على سبيل المثال، Ausubel أو Maniatis). قبل استخدام سلسلة التعبير الوراثي لتوليد حيوان محور وراثياً، يمكن أن يتم اختبار استجابة سلسلة التعبير الوراثي لمستحث إجهاد مرتبط بعناصر التحكم المختارة بواسطة إدخال سلسلة التعبير الوراثي في سلالة خلية مناسبة (مثل، الخلايا الأولية، الخلايا المحولة، أو سلالات خلايا غير مثبتة).

علاوة على ذلك، على الرغم من أنه ليس مطلوب للتعبير الوراثي، يمكن كذلك أن تكون متواليات خارجية المنشأ متواليات تنظيمية استنساخية أو انتقالية، على سبيل المثال، مقويات، معززات، عازلات، مواقع دخول ريبوسوم داخلية، متواليات تشفر ببتيدات 2A و/أو إشارات مجموعة معالجة ببولي إيدينيل. كذلك، يمكن أن يتم بشكل تشغيلي ربط عناصر التحكم بالجينات المقصودة بجينات مرسلة لتكوين جينات خيمرية (مثل، سلاسل التعبير الوراثي عن المرسل).

يمكن كذلك أن يتم تحقيق إدخال مستهدف لمتوالية الحمض النووي غير المشفرة. يمكن كذلك أن يتم استخدام متواليات تشفر RNAs، RNAi، shRNAs وRNAs دقيقة (miRNAs) مضادة لاتجاه النسخ للإدخالات المستهدفة.

في تجسيدات إضافية، يمكن أن يشتمل الحمض النووي المانح على متواليات غير مشفرة تعد نوعية لمواقع مستهدفة نوعية لتصميمات إنزيم نوكلياز إضافية. بالتالي، يمكن أن يتم التعبير عن إنزيمات

النوكلياز الإضافية في الخلايا بحيث أنه يتم قطع الجزيء المانح الأصلي وتعديله بواسطة إدخال جزيء مانح آخر مقصود. بهذه الطريقة، يمكن أن يتم توليد صور دمج متكررة لجزيئات المانح بما يسمح بوجود طابع رص لموقع محدد مقصود في موقع مرفأ آمن.

التوصيل

يمكن أن يتم توصيل إنزيمات النوكلياز كما هي موصوفة في هذا الطلب (الجدول 1)، البولي نوكليوتيدات التي تشفر إنزيمات النوكلياز المذكورة، البولي نوكليوتيدات المانحة والتركيبات التي تشتمل على البروتينات و/أو البولي نوكليوتيدات الموصوفة في هذه الطلب في الجسم الحي أو خارج الجسم الحي بواسطة أي وسيلة مناسبة في أي نوع من الخلية.

تتضمن الخلايا المناسبة حقيقية النواة (مثل، حيوان) والخلايا بدائية النواة و/أو سلالات الخلايا. تتضمن الأمثلة غير المقيدة من هذه الخلايا أو سلالات الخلايا المتولدة من مثل هذه الخلايا خلايا CHO (*مثل*، CHO-S، CHO-K1، CHO-DG44، CHO-DUXB11، CHO-DUKX، COS (CHOK1SV)، VERO، MDCK، WI38، V79، B14AF28-G3، BHK، HaK، NS0، SP2/0-Ag14، HeLa، HEK293 (*مثل*، HEK293-F، HEK293-H، HEK293-T)، وperC6 كما خلايا حشرية مثل Spodopterafugiperda (Sf)، أو خلايا فطرية مثل Saccharomyces، Pichia و*Schizosaccharomyces*. في تجسيدات معينة، سلالة الخلية تعد CHO، MDCK أو سلالة الخلية HEK293. تتضمن كذلك الخلايا المناسبة الخلايا الجذعية مثل، على سبيل المثال، الخلايا الجذعية الجنينية، الخلايا الجذعية متعددة القدرات المستحثة، الخلايا الجذعية المكونة للدم، الخلايا الجذعية العصبية والخلايا الجذعية من اللُّحْمَةِ المُتَوَسِّطَة.

يتم وصف طرق توصيل إنزيمات نوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب، على سبيل المثال، في براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,453,242، 6,503,717، 6,534,261، 6,599,692، 6,607,882، 6,689,558، 6,824,978، 6,933,113، 6,979,539، 7,013,219 و 7,163,824 والتي تم تضمينها جميعاً كمراجع في هذا الطلب بأكملها.

يمكن كذلك أن يتم توصيل بنيات إنزيمات نوكلياز و/أو المانح كما هو موصوف في هذا الطلب باستخدام نواقل تحتوي على المتواليات التي تشفر واحد أو أكثر من ZFN (مركبات ZFN)، الموصوفة في هذا الطلب. يمكن أن يتم استخدام أي من الأنظمة الناقلة المتضمنة، لكنها لا تنحصر في، نواقل

البلازميد، نواقل فيروسات النسخ العكسي، نواقل الفيروسات البطيئة، نواقل الفيروسات الغدية، نواقل فيروسات جدرية؛ نواقل فيروسات هربس ونواقل فيروس مرتبط بالغدد، وهكذا. انظر، كذلك، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 6,534,261؛ 6,607,882؛ 6,824,978؛ 6,933,113؛ 6,979,539؛ 7,013,219؛ و 7,163,824، والتي تم تضمينها جميعاً كمراجع في هذا الطلب بأكملها. علاوة على ذلك، سيتضح أن أي من هذه النواقل يمكن أن يشتمل على واحد أو أكثر من المتواليات المطلوبة للمعالجة. بالتالي، عندما يتم إدخال واحدة أو أكثر من بنية إنزيمات نوكلياز ومانح في الخلية، يمكن أن يتم حمل إنزيمات نوكلياز و/أو بولي نوكليوتيد مانح على الناقل ذاته أو على نواقل مختلفة (DNA MC(مجموعات منها)). عندما يتم استخدام نواقل متعددة، يمكن أن يشتمل كل ناقل على متوالية تشفر واحد أو متعدد من بنيات إنزيمات النوكلياز و/أو المانح. يمكن أن يتم استخدام طرق نقل جين تعتمد على الفيروسات وغير الفيروسات التقليدية لإدخال الأحماض النووية التي تشفر بنيات إنزيمات النوكلياز و/أو المانح في خلايا (مثل، الخلايا الثديية) والأنسجة المستهدفة. تتضمن أنظمة التوصيل للنواقل غير الفيروسية بلازميدات DNA أو RNA، DNA MCs، حمض نووي مجرد، وحمض نووي مشكل في صورة معقد مع مادة ناقلة للتوصيل في صورة جسيم دهني أو بولوكسامير. تتضمن النواقل غير الفيروسية المناسبة نواقل من نوع (نواقل التوصيل السريع التي بحجم النانو nanotaxis)، المتضمنة نواقل متاحة تجارياً من InCellArt (فرنسا). تتضمن أنظمة توصيل الناقل الفيروسية فيروسات DNA وRNA، والتي لها إما جينومات جسيمية ملحقة بالكروموسومات أو مدمجة بعد التوصيل إلى الخلية. للمراجعة للتوصيل في الجسم الحي لبروتينات ربط DNA معالجة بالهندسة الوراثية وبروتينات اندماج تشتمل على بروتينات الربط المذكورة، انظر، مثل، Rossi et al. (2007) ؛Rebar (2004) Expert Opinion Invest. Drugs 13(7):829-839 Nature Biotech. 25(12):1444-1454 كما مراجع توصيل الجين العامة مثل Anderson, Science (1992) 256:808-813؛ Mitani & Caskey, ؛Nabel & Felgner, TIBTECH 11:211-217 (1993) Miller, Nature ؛Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993) ؛TIBTECH 11:162-166 (1993) Vigne, ؛Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988) ؛357:455-460 (1992) Kremer & Perricaudet, British ؛Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995) Haddada et al., in Current Topics in Microbiology ؛Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995) Yu et al., Gene Therapy 1:13-26 و ؛and Immunology Doerfler and Böhm (eds.) (1995) .(1994)

تتضمن طرق التوصيل غير الفيروسية للأحماض النووية النقل الكهربي، نقل العدوى بجسيم دهني، الحقن الدقيق، المقذوفات الحيوية، الأجسام الفيروسية، الأجسام الدهنية، الأجسام الدهنية المناعية، عديد الكاتيون أو مترافقات من شحم: حمض نووي، DNA مجرد، فيرونات صناعية، وامتصاص معزز للعامل لـ DNA. يمكن كذلك أن يتم استخدام المعالجة بالموجات الصوتية باستخدام، مثل، جهاز Sonitron 2000 system (Rich-Mar) لتوصيل الأحماض النووية.

تتضمن أنظمة توصيل الحمض النووي التوضيحية الإضافية تلك التي تم توفيرها بواسطة Amaxa Biosystems (Cologne، ألمانيا)، Maxcyte, Inc. (Rockville، ميريلاند)، BTX Molecular Delivery Systems (Holliston، MA) و Copernicus Therapeutics Inc.، (انظر على سبيل المثال US6008336). يتم وصف ليبوفكتين في على سبيل المثال، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 5,049,386؛ 4,946,787؛ و4,897,355) ويتم بيع العوامل الكاشفة من الليبوفكتين تجارياً (مثل، Transfectam™ و Lipofectin™). تتضمن الشحوم الكاتيونية والمتعادلة التي تعد مناسبة لليبوفكتين التعرف على المستقبل الفعال من البولي نوكليوتيدات تلك من Felgner، WO 91/17424، WO 91/16024.

يعد تحضير معقدات من الشحم: الحمض النووي، المتضمنة الجسيمات الدهنية المستهدفة مثل معقدات شحمية مناعية، معروفاً لذوي الخبرة في المجال (انظر، على سبيل المثال، Crystal, Science 270:404-410 (1995)؛ Blaese et al., Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995)؛ Behr et al., Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994)؛ Remy et al., Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994)؛ Gao et al., Gene Therapy 2:710-722 (1995)؛ Ahmad et al., Cancer Res. 52:4817-4820 (1992)؛ براءات الاختراع الأمريكية أرقام 4,186,183، 4,217,344، 4,235,871، 4,261,975، 4,485,054، 4,774,085، 4,837,028، و4,946,787).

تتضمن الطرق الإضافية للتوصيل استخدام التعبئة للأحماض النووية المراد توصيلها إلى المواد الناقلة للتوصيل EnGeneIC delivery vehicles (EDVs). يتم بشكل نوعي توصيل EDVs إلى الأنسجة المستهدفة باستخدام الأجسام المضادة ثنائية النوعية حيث يكون للطرف الواحد من الجسم المضاد قدرة نوعية للنسيج المستهدف ويكون للآخر قدرة نوعية لـ المواد الناقلة للتوصيل EDV. يحضر الجسم المضاد المواد الناقلة للتوصيل EDVs إلى سطح الخلية المستهدفة وبعدها يتم جلب

المواد الناقلة للتوصيل EDV في الخلية بواسطة الالتقام الخلوي. بمجرد وجودها في الخلية، يتم إطلاق المحتويات (انظر MacDiarmid et al (2009) Nature Biotechnology 27(7):643).

يستفد استخدام أنظمة تعتمد على فيروسات RNA أو DNA لتوصيل الأحماض النووية المشفرة لـ ZFPs المعالجة وراثياً، TALEs و/أو Cas/CRISPR من العمليات المتطورة بشكل كبير الخاصة باستخدام فيروس لخلايا نوعية في الجسم وتنظيم المرور للحمل الفيروسي إلى النوية. يمكن أن يتم إعطاء النواقل الفيروسية مباشرةً إلى المرضى (في الجسم الحي) أو يمكن أن يتم استخدامها لمعالجة الخلايا في المعمل ويتم إعطاء الخلايا المعدلة إلى المرضى (خارج الجسم الحي). تتضمن الأنظمة المعتمدة على الفيروسات التقليدية لتوصيل ZFPs، لكنها لا تنحصر في، نواقل فيروس النسخ العكسي، الفيروس البطئ، الفيروس الغدي، الفيروس المرتبط بالغدة، جدري البقر وفيروس بسيط من هربس لنقل الجين. يمكن دمج الجينوم العائل مع طرق نقل جين فيروس النسخ العكسي، الفيروس البطئ، الفيروس المرتبط بالغدة، والتي تحقق عادةً تعبير وراثي طويل الأمد للجين الناقل الذي تم إدخاله. بشكل إضافي، تمت ملاحظة صور فعالية التحويل المرتفعة في الكثير من أنواع الخلية المختلفة والأنسجة المستهدفة.

يمكن أن يتم تغيير انتحاء فيروس نسخ عكس بواسطة تضمين بروتينات غلافية غريبة، تمديد المجموعة المستهدفة المحتملة للخلايا المستهدفة. تعد نواقل الفيروسات البطيئة عبارة عن نواقل فيروس نسخ عكسي قادرة على تحويل خلايا غير منقسمة أو إصابتها بالعدوى وعادةً إنتاج عيارات فيروسية مرتفعة. يعتمد اختيار نظام نقل جين نسخ عكسي على النسيج المستهدف. تتكون نواقل النسخ العكسي من تكرارات طرفية طويلة تؤثر بالطرف سيس مع قدرة تعبئة تصل حتى 6-10 كيلو قاعدة من المتوالية الغريبة. تعد LTRs المؤثرة على سيس الدنيا كافية للنسخ والتعبئة للنواقل، والتي يتم استخدامها لدمج الجين العلاجي في الخلية المستهدفة للحصول على تعبير وراثي عن الجين الناقل دائم. تتضمن نواقل فيروس النسخ العكسي المستخدمة بشكل واسع تلك المعتمدة على فيروس سرطان دم فأري murine leukemia virus (MuLV)، فيروس سرطان دم من قرد جيبون gibbon ape leukemia virus (GaLV)، فيروس نقص المناعة القردي Simian Immunodeficiency virus (SIV)، فيروس نقص المناعة البشري human immunodeficiency virus (HIV)، وتوليفات منها (انظر، على سبيل المثال، Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992)؛ Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992)؛ Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990)؛ Wilson et al.,

Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991)P ؛J. Virol.63:2374-2378 (1989) .(PCT/US94/05700)

في التطبيقات التي يكون فيها التعبير الوراثي الانتقالي مفضلاً، يمكن أن يتم استخدام الأنظمة المعتمدة على الفيروس الغدي. يكون بمقدور النواقل التي تعتمد على الفيروس الغدي التحويل بشكل فعال للغاية في الكثير من أنواع الخلايا ولا تتطلب تقسيم الخلية. بهذه النواقل، تم الحصول على معيار مرتفع ومستويات مرتفعة من التعبير الوراثي. يمكن أن يتم إنتاج هذا الناقل بكميات كبيرة في نظام بسيط نسبياً. يتم كذلك استخدام نواقل ("AAV") لفيروس مرتبط بالغدة لتحويل الخلايا بأحماض نووية، مثل، في الإنتاج في المعمل للأحماض النووية والببتيدات، ولإجراءات العلاج الجيني في الجسم الحي وخارج الجسم الحي (انظر، مثل، West et al., Virology 160:38-47 (1987)؛ البراءة الأمريكية رقم 4,797,368؛ WO 93/24641؛ Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994)؛ Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994). يتم وصف بنية نواقل AAV الناتجة عن عودة الارتباط الجيني في عدد من المنشورات، التي تتضمن براءة الاختراع الأمريكية رقم 5,173,414؛ Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)؛ Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984)؛ Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984)؛ و Samulski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989).

يعد من المتاح حالياً ستة على الأقل من أساليب استخدام النواقل الفيروسية لنقل الجين في التجارب المعملية، والتي تستخدم أساليب تنطو على تتميم النواقل المختلة بواسطة الجينات التي تم إدخالها في سلالات الخلايا المساعدة لتوليد عامل تحويل.

تعد pLASN وMFG-S عبارة عن أمثلة من نواقل فيروسات النسخ العكسي التي تم استخدامها في التجارب المعملية ((Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995)؛ Kohn et al., Nat. Med. 1:1017-102 (1995)؛ Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)). كان الناقل PA317/pLASN العلاجي الأول المستخدم في تجربة علاج جيني (Blaese et al., Science 270:475-480 (1995)). تمت ملاحظة صور كفاءة تحويل بنسبة 50% أو يزيد بالنسبة للنواقل المعبأة MFG-S. (Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997)؛ Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997)).

تعد نواقل الفيروس المرتبطة بالغدة الناتجة عن عودة الارتباط الجيني (rAAV) عبارة عن أنظمة توصيل جيني بديلة واعدة تعتمد على فيروس من النوع 2 مرتبط بالغدة الصغير الناقص وغير الممرض. يتم اشتقاق جميع النواقل من بلازميد والذي يحتفظ فقط بـ AAV له 145 زوج قاعدة من التكرارات النهائية المعكوسة المجانحة لسلسلة التعبير الوراثي للجين الناقل. يعد نقل الجين الفعال وتوصيل الجين الناقل الثابت نتيجة الدمج في الجينومات من الخلية المحولة من السمات الرئيسية لهذا النظام الناقل. (Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1998), Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1996)). يمكن كذلك أن يتم استخدام أنماط مصلية أخرى من AAV، تتضمن AAV1، AAV2، AAV3، AAV4، AAV5، AAV6، AAV7، AAV8، AAV9 و AAVrh.10 وأي نمط مصلي جديد من AAV وفقاً للاختراع الحالي.

يمكن أن يتم إنتاج النواقل (Ad) بعيار مرتفع ونقل العدوى بشكل سلس إلى عدد من أنواع الخلية المختلفة. تتم المعالجة الوراثية لأغلب النواقل الفيروسية الغدية بحيث أنه يحل الجين الناقل محل جينات Ad E1a، E1b، و/أو E3 ؛ لاحقاً يتم نشر الناقل المنقوص النسخ في خلايا 293 البشرية التي تعطي وظيفة جين محذوفة في موقع ترانس. يمكن أن تحول نواقل Ad أنواع متعددة من الأنسجة في الجسم الحي، المتضمنة الخلايا المتمايزة، غير المقسمة مثل تلك الموجودة في الكبد، الكلى والعضل. يكون لنواقل Ad التقليدية قدرة حمل كبيرة. ينطوي مثال على استخدام ناقل Ad في تجربة معملية على العلاج ببولي نوكليوتيد لتحصين مضاد للورم مع حقن داخل العضلات (Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)). تتضمن أمثلة إضافية لاستخدام النواقل الفيروسية الغدية لنقل الجين في التجارب المعملية Rosenecker et al., Infection 24:1 5-10 (1996)؛ Sterman et al., Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089 (1998)؛ Welsh et al., Hum. Gene Ther. 2:205-18 (1995)؛ Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613 (1997)؛ Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998)؛ Sterman et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-1089 (1998).

يتم استخدام خلايا التعبئة لتكوين جسيمات فيروس قادرة على إصابة خلية عائل بالعدوى. تتضمن هذه الخلايا خلايا 293، وخلايا ψ2 أو خلايا PA317، والتي تعبأ فيروس نسخ عكسي. يتم عادةً توليد النواقل الفيروسية المستخدمة في العلاج الجيني بواسطة سلالة خلايا منتجة تعبأ ناقل حمض نووي في جسيم فيروسي. تحتوي بشكل معتاد النواقل المتواليات الفيروسية الدنيا المطلوبة للتعبئة والدمج في عائل (حال إمكانها)، يتم استبدال المتواليات الفيروسية الأخرى بواسطة سلسلة التعبير الوراثي التي تشفر البروتين المراد التعبير عنه. يتم الإمداد بالوظائف الفيروسية المفقودة في الموقع

ترانس بواسطة تعبئة سلالة الخلية. على سبيل المثال، تمتلك النواقل AAV المستخدمة في العلاج الجيني عادةً متوالية تكرارية طرفية معكوسة فقط inverted terminal repeat (ITR) من جينوم AAV والذي يعد مطلوباً للتعبئة والدمج في جينوم العائل. تتم تعبئة DNA الفيروسي في سلالة خلية، والتي تحتوي على بلازميد مساعد يشفر جينات AAV الأخرى، أي التكرارية والغلافية، لكن يفتقر إلى متواليات تكرارية طرفية معكوسة ITR. يتم كذلك إصابة سلالة الخلية بالعدوى بفيروسي غدي في صورة مساعد. يعزز الفيروس المساعد من تناسخ ناقل AAV والتعبير الوراثي عن جينات AAV من بلازميد المساعد. لا تتم تعبئة بلازميد المساعد بمقادير كبيرة نتيجة الافتقار إلى متواليات ITR. يمكن أن يتم خفض التلويث بالفيروس الغدي، بواسطة، على سبيل المثال، المعالجة بالحرارة لأي من الفيروسات الغدية الأكثر حساسية بالمقارنة بـ AAV.

في الكثير من تطبيقات العلاج الجيني، من المرغوب أن يمكن أن يتم توصيل ناقل العلاج الجيني بدرجة كبيرة من النوعية إلى نوع نسيج محدد. وفقًا لذلك، يمكن أن يتم تعديل ناقل فيروسي ليكون له قدرة نوعية لنوع خلية محدد بواسطة التعبير الوراثي عن جزيء ترابطي في صورة بروتين اندماج مع بروتين غطائي فيروسي على السطح الخارجي للفيروس. يتم اختيار الجزيء الترابطي ليكون له آلفة لمستقبل معروف بوجوده على نوع الخلية المقصودة. على سبيل المثال، أورد Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751 (1995)، أن فيروس سرطان الدم الفأري Moloney يمكن تعديله ليعبر عن هيرجولين بشري مندمج مع gp70، ويصيب فيروس ناتج عودة الارتباط الجيني خلايا سرطان ثدي بشرية معينة تعبر عن مستقبل لعامل النمو البشراوي البشري. يمكن أن يمتد هذا المبدأ إلى أزواج خلية إلى مستهدف أخرى، تعبر فيها الخلية المستهدفة عن مستقبل ويعبر الفيروس عن بروتين اندماج يشتمل على جزيء ترابطي لمستقبل خلية سطح. على سبيل المثال، يمكن أن تتم المعالجة الوراثية للملتهمة الفتيلية لعرض شظايا الجسم المضاد (مثل، FAB أو Fv) لها آلفة ارتباط نوعية لنظرياً أي مستقبل خلوي مختار. على الرغم من أن الوصف أعلاه ينطبق بشكل أولي على النواقل الفيروسية، يمكن أن يتم تطبيق المبادئ ذاتها على النواقل غير الفيروسية. يمكن أن تتم المعالجة الوراثية لهذه النواقل لتحتوي على متواليات امتصاص نوعية تحبذ على الامتصاص بواسطة خلايا مستهدفة نوعية.

يمكن أن يتم توصيل نواقل العلاج الجيني في الجسم الحي بواسطة الإعطاء إلى مريض منفرد، عادةً بواسطة الإعطاء الجهازي (مثل، الإعطاء في الوريد، في البريتوني، داخل العضل، تحت الجلد، أو بالتسريب في داخل الجمجمة) أو الاستخدام الموضعي، كما هو موصوف أدناه. بشكل بديل، يمكن

أن يتم توصيل النواقل إلى الخلايا خارج الجسم الحي، مثل الخلايا المغروسة من مريض منفرد (مثل، الخلايا اللمفاوية، نواتج شفط نخاع العظم، خزعة النسيج) أو خلايا جذعية مكونة للدم من حامل مشتركة، متبوع بإعادة غرس الخلايا في مريض، عادةً بعد اختيار الخلايا التي تضمنت الناقل.

يمكن كذلك أن يتم إعطاء النواقل (مثل، فيروسات النسخ العكسي، الفيروسات الغدية، الجسيمات الدهنية، وهكذا) المحتوية على إنزيمات النوكلياز و/أو بنيات المانح مباشرة إلى كائن حي لتحويل الخلايا في الجسم الحي. بشكل بديل، يمكن أن يتم إعطاء DNA مجرد. يتم الإعطاء بواسطة أي أسلوب من الأساليب المعتادة المستخدمة لإدخال جزيء في تلامس كلي مع الدم أو الخلايا النسيجية المتضمنة، لكنها لا تنحصر في، الحقن، التسريب، الإعطاء الموضعي والنقل الكهربي. تعد الطرق المناسبة للإعطاء لتلك الأحماض النووية متاحة ومعروفة لذوي الخبرة في المجال، و، على الرغم من إمكانية استخدام أكثر من أسلوب لإعطاء تركيبة محددة، يمكن عادةً أن يوفر أسلوب محدد تفاعل أكثر فورية وأكثر فعالية بالمقارنة بأسلوب آخر.

تتضمن النواقل المناسبة لإدخال البولي نوكليوتيدات (مثل، مانحات تشفر إنزيم نوكلياز و/أو مانحات ذات جديلة مزدوجة) الموصوفة في هذا الطلب نواقل فيروس بطئ مدمجة integrase defective lentivirus (IDLV). انظر، على سبيل المثال، Ory et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388؛ Dull et al. (1998) J. Virol.72:8463-8471؛ Zuffery et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880؛ Follenzi et al. (2000) Nature Genetics 25:217-222؛ منشور براءة الاختراع الأمريكية رقم 2009/0117617.

يتم تحديد المواد الحاملة المقبولة صيدلياً جزئياً بواسطة التركيبة المحددة التي يتم إعطاؤها، كما بواسطة الطريقة المحددة المستخدمة لإعطاء التركيبة. وفقًا لذلك، توجد أنواع مختلفة كثيرة من الصيغ المناسبة للتركيبات الصيدلية المتاحة، كما هو موصوف أدناه (انظر، مثل، Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989).

يتضح أن المتواليات المشفرة لإنزيم النوكلياز وبنيات المانح يمكن أن يتم توصيلها باستخدام أنظمة متشابهة أو مختلفة. على سبيل المثال، يمكن أن يتم إنزيمات النوكلياز والمانحات بواسطة DNA MC المتشابهة. بشكل بديل، يمكن أن يتم حمل بولي نوكليوتيد مانح بواسطة MC، بينما يمكن أن يتم حمل الواحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز بواسطة بلازميد قياسي أو ناقل AAV. علاوة على ذلك، يمكن أن يتم إعطاء النواقل المختلفة بواسطة أساليب مشابهة أو مختلفة (الحقن داخل العضلة،

حقن الوريد الذيلي، الحقن داخل الوريد الآخر، الإعطاء داخل البريتوني و/أو الحقن داخل العضل. يمكن أن يتم توصيل النواقل بشكل متزامن أو بأي ترتيب متتابع.

بالتالي، يتضمن الكشف الحالي معالجة في الجسم الحي أو خارج الجسم الحي للأمراض والحالات التي تعد قابلة لإدخال جينات ناقلة تشفر بروتين علاجي. يتم إعطاء التركيبات إلى مريض من البشر بمقدار فعال للحصول على التركيز المرغوب من البولي ببتيد العلاجي في مصل أو العضو المستهدف أو الخلايا. يمكن أن يتم الإعطاء بواسطة أي طريقة يتم فيها توصيل البولي نوكليوتيدات إلى الخلايا المستهدفة المرغوبة. على سبيل المثال، يتم تناول كل من الطرق في الجسم الحي وخارج الجسم الحي. يعد الحقن داخل الوريد إلى الوريد البابي هو الطريقة المفضلة للإعطاء. تتضمن أساليب الإعطاء في الجسم الحي الأخرى، على سبيل المثال، الحقن المباشر في فصوص الكبد أو القناة الصفراوية والحقن في الوريد البعيد إلى الكبد، المتضمن الإعطاء خلال الشريان الكبدي، الحقن المباشر في بارنشيمي الكبد، الحقن من خلال الشريان الكبدي، و/أو الحقن العكسي للفئة من خلال الشجرة الصفراوية. تتضمن أساليب الإعطاء خارج الجسم التحويل في المعمل للخلايا الكبدية المستأصلة أو الخلايا الأخرى من الكبد، متبوع بتسريب الخلايا الكبدية المحولة، المستأصلة مرة أخرى في شبكة الأوعية البابية، بارنشيمي الكبد أو الشجرة الصفراوية للمريض من البشر، انظر، على سبيل المثال، Grossman et al., (1994)Nature Genetics, 6:335-341.

سيختلف المقدار الفعال من إنزيم (إنزيمات) النوكلياز والمانح المراد إعطاؤه من مريض إلى مريض ووفقاً للبولي ببتيد العلاجي المقصود. وفقاً لذلك، يتم على النحو الأفضل تحديد المقادير الفعالة من قبل المعالج لإعطاء التركيبات والجرعات المناسبة بشكل سهل من قبل الشخص الماهر بالمجال. يعد السماح بوقت كافٍ للدمج والتعبير الوراثي (عادةً 4-15 يوم، على سبيل المثال)، سيحدد تحليل المصل أو مستويات النسيج الأخرى من البولي ببتيد العلاجي والمقارنة مع المستوى الأولي قبل الإعطاء ما إن كان المقدار الذي تم إعطاؤه منخفض للغاية، ضمن النطاق الدقيق أو مرتفع للغاية. تعد كذلك الأنظمة المناسبة لصور الإعطاء الأولية والمتعاقبة متغيرة، لكن يتم تنميطها بواسطة إعطاء أولي متبوع بمرات الإعطاء اللاحقة حسب الضرورة. يمكن أن يتم إعطاء مرات الإعطاء المتعاقبة عند فواصل زمنية متغيرة، تتراوح من يومياً إلى سنوياً إلى كل سنوات عديدة. سيقدر الشخص الماهر بالمجال أن التقنيات الكابحة للمناعة المناسبة يمكن التوصية بها من أجل تجنب التثبيط أو الإعاقة للتحويل بواسطة الكبح المناعي لنواقل التوصيل، انظر مثل، Vilquin et al., (1995) Human Gene Ther., 6:1391-1401.

تتضمن الصيغ لكل من صور الإعطاء خارج الجسم الحي وفي الجسم الحي المعلقات في السائل أو السوائل المستحلبة. يتم عادةً خلط المكونات الفعالة مع السواغات التي تعد مقبولة صيدلياً ومتوافقة مع المكون الفعال. تتضمن السواغات المناسبة، على سبيل المثال، الماء، محلول ملحي، ديكستروز، جليسرول، الإيثانول أو ما شابه، وتوليفات منها. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تحتوي التركيبة على مقادير صغيرة من المواد الإضافية، مثل، عوامل الترطيب أو الاستحلاب، العوامل المنظمة للرقم الهيدروجيني، عوامل التثبيت أو المواد الكاشفة الأخرى التي تعزز من فعالية التركيبة الصيدلية.

الخلايا

يتم كذلك وصف الخلايا و/أو سلالات الخلايا التي يتم فيها تعديل متوالية معززة من BCL11A ذاتية المنشأ بواسطة إنزيمات النوكلياز الموصوف في هذا الطلب (الجدول 1). يمكن أن يكون التعديل، على سبيل المثال، مقارن مع متوالية النوع غير المعالج من الخلية. يمكن أن تكون الخلايا أو سلالات الخلايا غير متجانسة الزيجوت أو متجانسة الزيجوت للتعديل. يمكن أن تشتمل التعديلات على متوالية BCL11A على إدخالات، صور حذف و/أو توليفات منها.

يعد التعديل بشكل مفضل في أو بالقرب من موقع (مواقع) الربط و/أو القطع من إنزيم (إنزيمات) النوكلياز، على سبيل المثال، داخل 1-300 (أو أي قيمة بينها) من أزواج القاعدة بشكل قبلي أو بعدي من موقع (مواقع) القطع، بشكل مفضل أكثر داخل 1-100 من أزواج القاعدة (أو أي قيمة بينها) من أي جانب من موقع (مواقع) الربط و/أو القطع، حتى بشكل مفضل أكثر داخل 1 إلى 50 من أزواج القاعدة (أو أي قيمة بينها) على أي جانب من موقع (مواقع) الربط و/أو القطع. في تجسيدات معينة، يعد التعديل عند أو بالقرب من منطقة "58+" من معزز BCL11A، على سبيل المثال، عند أو بالقرب من موقع ربط إنزيم النوكلياز الموضح في أي من العمود الأول بالجدول 1.

يمكن أن يتم تعديل أي خلية أو سلالة خلية، على سبيل المثال خلية جذعية، على سبيل المثال خلية جذعية جنينية، خلية جذعية متعددة القدرات مستحثة، خلية جذعية مكونة للدم، خلية جذعية عصبية وخلية جذعية من اللُّحْمَةِ المُتَوَسِّطَة. تتضمن أمثلة غير مقيدة أخرى من الخلايا كما هو موصوف في هذا الطلب خلايا T (مثل، CD4+، CD3+، CD8+، وهكذا)؛ الخلايا الشجرية؛ خلايا B. يتم كذلك توفير ناتج خلية جذعية، تتضمن خلية متمايزة جزئياً أو كلياً، (مثل، خلية منتجة لغيرها RBC أو RBC). تتضمن الأمثلة غير المقيدة سلالات الخلايا الأخرى المتضمنة متوالية BCL11A المعدلة CHO (مثل، CHO-S، CHO-K1، CHO-DG44، CHO-DUXB11، CHO-DUKX، COS،

SP2/0- ،NS0 ،HaK ،BHK ،B14AF28-G3 ،V79 ،WI38 ،MDCK ،VERO ،(CHOK1SV
Ag14، HeLa، HEK293 (مثل، HEK293-F، HEK293-H، HEK293-T)، وخلايا perC6 كما
خلايا حشرية مثل Spodopterafugiperda (Sf)، أو خلايا فطريات مثل *Saccharomyces*، *Pichia*
و *Schizosaccharomyces*.

تعد الخلايا كما هو موصوف في هذا الطلب مفيدة في معالجة اضطراب و/أو الوقاية منه، على سبيل المثال، بواسطة العلاجات خارج الجسم الحي. يمكن أن يتم تمديد الخلايا المعدلة بإنزيم النوكلياز وبعد ذلك إعادة إدخالها في المريض باستخدام التقنيات القياسية. انظر، مثل، Tebas et al (2014) New Eng J Med 370(10):901. في حالة الخلايا الجذعية، بعد التسريب في الخاضع، يحدث كذلك تمايز هذه المواد المنتجة لغيرها في الجسم الحي في خلايا تعبر عن الجين الناقل الوظيفي. يتم كذلك توفير التركيبات الصيدلية التي تشتمل على الخلايا كما هو موصوف في هذا الطلب. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يتم الحفظ بالتبريد للخلايا قبل الإعطاء لمريض.

يمكن أن تظهر أي من الخلايا المعدلة أو سلالات الخلايا المعدلة التي تم الكشف عنها في هذا الطلب التعبير الوراثي المتزايد عن جلوبين جاما. يتم كذلك توفير التركيبات مثل التركيبات الصيدلية التي تشتمل على الخلايا المعدلة وراثياً كما هو موصوف في هذا الطلب.

التطبيقات

تعد الطرق والتركيبات التي تم الكشف عنها في هذا الطلب لتعديل التعبير الوراثي عن بروتين، أو تصحح متوالية جين زائغة تشفر بروتين تم التعبير عنه في مرض، مثل داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة أو ثَلاسيمِيَّة. بالتالي، توفر الطرق والتركيبات معالجة و/أو وقاية من هذه الأمراض الوراثية. يمكن أن يتم استخدام التنقيح الجينومي، على سبيل المثال لخلايا جذعية، لتصحيح جين زائغ، إدخال جين من النوع غير المعالج، أو تغيير التعبير الوراثي عن الجين ذاتي المنشأ. على سبيل المثال غير المقيد، يمكن أن يتم إدخال جين من النوع غير المعالج، مثل يشفر جلوبين واحد على الأقل (مثل، جلوبين α و/أو β)، في خلية (مثل، في متوالية معززة من BCL11A داخلية المنشأ باستخدام واحد أو أكثر من إنزيمات النوكلياز كما هو موصوف في هذا الطلب) للحصول على بروتينات الجلوبين الناقصة و/أو المفتقرة بالخلية وبذلك يعالج مرض وراثي، مثل، اعْتِلاَل هيموجلوبيني، ناجم عن تعبير وراثي عن جلوبين خاطئ. بشكل بديل أو بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يصحح التنقيح الجينومي مع أو دون إعطاء المانح المناسب، من الجين ذاتي المنشأ الخاطئ، مثل، تصحيح الطفرة النقطية في

α- أو β-خضاب الدم، لاستعادة التعبير الوراثي عن الجين و/أو معالجة مرض وراثي، مثل داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة و/أو تعطيل أو تغيير (التعبير المفرط أو الكبح) لأي جين تنظيمي للجلوبين مباشر أو غير مباشر (مثل إخماد جين تنظيمي من جلوبين γ من نوع BCL11A أو KLF1 منظم لـ BCL11A). تحديداً، يتم استخدام الطرق والتركيبات من الاختراع في معالجة أو الوقاية من أمراض الاعْتِلاَل الهيموجلوبيني.

يتم توجيه استهداف إنزيمات النوكلياز وفق الاختراع إلى منطقة المعزز من BCL11A، المعروفة بأنها تتطلب التعبير الوراثي عن BCL11A، وبالتالي النقص المتحكم فيه للتعبير الوراثي عن جلوبين جاما. يمكن أن يتسبب تعديل منطقة المعزز المذكورة في الكريات الدموية الحمراء ذات التعبير الوراثي المتزايد عن جلوبين جاما، وبالتالي سيكون من المفيد معالجة داء كُرَيَّات خلية مِنْجَلِيَّة أو ثَلاسيمِيَّة بيتا.

تتعلق الأمثلة التالية بالتجسيدات التوضيحية من الكشف الحالي والذي يشتمل فيه إنزيم النوكلياز على إنزيم نوكلياز إصبع الزنك zinc finger nuclease (ZFN). سيتم إدراك أن يعد ذلك لأغراض التوضيح فقط وأن إنزيمات النوكلياز الأخرى يمكن أن يتم استخدامها، على سبيل المثال أنظمة TtAgo وCas/CRISPR، إنزيمات النوكلياز الداخلية المستضيفة (إنزيمات النوكلياز الضخمة) ذات نطاقات ربط DNA المعالجة وراثياً و/أو صور اندماج ناشئة بشكل طبيعي من إنزيمات النوكلياز الداخلية المستضيفة (إنزيمات النوكلياز الضخمة) ذات نطاقات ربط DNA المعالجة وراثياً ونطاقات قطع غير متجانسة و/أو صور اندماج إنزيمات النوكلياز الضخمة وبروتينات TALE.

الأمثلة

المثال 1: تجميع إنزيمات نوكلياز إصبع الزنك

تم تجميع ZFNs إزاء جين BCL11A البشري وتم اختبارها بواسطة اختبارات CEL1 كما هو موصوف في Miller et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:778-785. تم تصنيع ZFNs نوعية لمنطقة +58 من منطقة المعزز كما هو موصوف. يتم توضيح إنزيمات نوكلياز أدناه في الجدول 1:

الجدول 1: أزواج ZFN نوعية لمنطقة معززة من BCL11A +58

SBS #	التصميم

(الموقع المستهدف، 5'-3')						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
الشريك الأيسر						
46801 aaAGCAACt GTTAGCTT GCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	RPYTL RL (المتوالية رقم: 3)	SGYNLE N (المتوالية رقم: 4)	TSGSLT R (المتوالية رقم: 5)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLF H (المتوالية رقم: 6)
51446 aaAGCAACt GTTAGCttgc actagacta (المتوالية رقم: 1)	STGNL TN (المتوالية رقم: 7)	TSGSL TR (المتوالية رقم: 5)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLF H (المتوالية رقم: 6)	غير معرف	غير معرف
51463 aaAGCAACt GTTAGCttgc actagacta	STGNL TN (المتوالية رقم: 7)	TSGSL TR (المتوالية رقم: 5)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLF H (المتوالية رقم: 6)	غير معرف	غير معرف

(المتوالية ذات رقم الهوية: 1)						
51484 aaAGCAACt GTTAGCTT GCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	RPYTL RL (المتوالية رقم: 3)	SRGAL KT (المتوالية رقم: 8)	TSGSLT R (المتوالية رقم: 5)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLF H (المتوالية رقم: 6)
51856 aaAGCAACt GTTAGCTT GCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	RNFSL TM (المتوالية رقم: 9)	SNGNL RN (المتوالية رقم: 10)	TSGSLT R (المتوالية رقم: 5)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLF H (المتوالية رقم: 6)
51857 aaAGCAACt GTTAGCTT GCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	RNFSL TM (المتوالية رقم: 9)	STGNLT N (المتوالية رقم: 7)	TSGSLT R (المتوالية رقم: 5)	DQSNL RA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLF H (المتوالية رقم: 6)

51862 aaAGCAACtGTTAGCTTGCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)	RNFSLTM (المتوالية رقم: 9)	SSYNLAN (المتوالية رقم: 11)	TSGSLTR (المتوالية رقم: 5)	DQSNLRA (المتوالية رقم: 2)	AQCCLFH (المتوالية رقم: 6)
51477 aaAGCAACtGTTAGCTTGCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNLRA(المتوالية رقم: 2)	RPYTLRL(المتوالية رقم: 3)	SSSNLTN(المتوالية رقم: 26)	TSGSLTR(المتوالية رقم: 5)	DQSNLRA(المتوالية رقم: 2)	AQCCLFH(المتوالية رقم: 6)
51478 aaAGCAACtGTTAGCTTGCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	DQSNLRA(المتوالية رقم: 2)	RPYTLRL(المتوالية رقم: 3)	SSSNLGN(المتوالية رقم: 27)	TSGSLTR(المتوالية رقم: 5)	DQSNLRA(المتوالية رقم: 2)	AQCCLFH(المتوالية رقم: 6)
51487	DQSNLRA(المتوالية	RPYTLRL(المتوالية	SRSALRV(المتوالية رقم: 28)	TSGSLTR(المتوالية رقم: 5)	DQSNLRA(المتوالية	AQCCLFH(المتوالية رقم: 6)

aaAGCAACt GTTAGCTT GCACtagacta (المتوالية رقم: 1)	لية رقم: 2)	لية رقم: 3)			لية رقم: 2)	
الشريك الأيمن						
47923 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QSGHL AR (المتوالية رقم: 14)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	QSSDLS R (المتوالية رقم: 16)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
51536 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QSGHL AR (المتوالية رقم: 14)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	RHRDLS R (المتوالية رقم: 18)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
51949 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct	RNDHR TT (المتوالية رقم: 19)	QKAHL IR (المتوالية رقم: 20)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	RGRDLS R (المتوالية رقم: 21)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف

(المتوالية رقم: 12)						
51990 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QRAHL TR (المتوالية رقم: 22)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	HRNTL VR (المتوالية رقم: 23)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
51993 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QRAHL TR (المتوالية رقم: 22)	QSGTR NH (المتوالية رقم: 24)	HRNTL VR (المتوالية رقم: 23)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
51979 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QKAHL IR (المتوالية رقم: 20)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	RGRDLS R (المتوالية رقم: 21)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
51982	RSDHL TQ(المتوا	QKAHL IR	QSGTR NH	RGRDLS R	RRDNL HS	غير معرف

caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	لية رقم: 13)	(المتوالية رقم: 20)	(المتوالية رقم: 24)	(المتوالية رقم: 21)	(المتوالية رقم: 17)	
52015 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RNDHR TT (المتوالية رقم: 19)	QKAHL IR (المتوالية رقم: 20)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	LKRTLK R (المتوالية رقم: 25)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
52032 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QSGHL AR (المتوالية رقم: 14)	QSGTR NH (المتوالية رقم: 24)	QSSDLS R (المتوالية رقم: 16)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف
51541 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct	RSDHL TQ(المتوا لية رقم: 13)	QSGHL AR(المتوا لية رقم: 14)	QKGTL GE(المتوا لية رقم: 15)	RHRDLS R(المتوالية رقم: 18)	RRDNL HS(المتوا لية رقم: 17)	غير معرف

(المتوالية رقم: 12)						
51519 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ(المتوا لية رقم: 13)	QSGHL AR(المتوا لية رقم: 14)	QSGTR NH(المتوا لية رقم: 24)	QSSDLS R(المتوالية رقم: 16)	RRDNL HS(المتوا لية رقم: 17)	غير معرف
51534 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ(المتوا لية رقم: 13)	QSGHL AR(المتوا لية رقم: 14)	QKGTL GE(المتوا لية رقم: 15)	RGRDLS R(المتوالية رقم: 21)	RRDNL HS(المتوا لية رقم: 17)	غير معرف
51535 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ(المتوا لية رقم: 13)	QSGHL AR(المتوا لية رقم: 14)	QKGTL GE(المتوا لية رقم: 15)	RSRDLT R(المتوالية رقم: 29)	RRDNL HS(المتوا لية رقم: 17)	غير معرف

51556 caCAGGCTC CAGGAAGG gtttggcctct (المتوالية رقم: 12)	RSDHL TQ (المتوالية رقم: 13)	QSGHL AR (المتوالية رقم: 14)	QKGTL GE (المتوالية رقم: 15)	FRQTRA R (المتوالية رقم: 30)	RRDNL HS (المتوالية رقم: 17)	غير معرف

* 51446 و51463 تختلف في متواليات رابطة

تم اختبار جميع ZFNs من حيث الوظائف (نشاط القطع) ووجد أنها نشطة.

المثال 2: نشاط ZFN في خلايا K562 البشرية

بشكل مختصر، تمت زراعة خلايا K562 بشرية في RPMI مكمل بـ10% FBS وتم نقل العدوى إلى 200.000 من الخلايا بتركيز أقل من الأمثل من 25 نانو جرام من كل من DNA بلازميد يشفر شركاء ZFN باليسار واليمين بواسطة Amaxa Nucleofector® بإتباع تعليمات الصانع (الجدول 2أ). بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء التجارب باستخدام 25 نانو جرام من ZFN الأيسر و5 نانو جرام من ZFN الأيمن (الجدول 2ب). تم استخدام اختبار Cel-I (Surveyor™، Transgenomics) كما هو موصوف في Perez et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26: 808-816 and Guschin et al. (2010) Methods Mol Biol. 649:247-56)، للكشف عن تعديلات مستحثة بـ ZFN للجين المستهدف بعد يومين أو ثلاثة من الإصابة بالعدوى. في هذا الاختبار، تلى تضخيم PCR لموقع المستهدف التحديد الكمي لإدخالات و/أو صور حذف ("مركبات الإنديل") بواسطة عمل المتواليات. تم استخدام عمل المتواليات العميق على منصة Illumina ("miSEQ") وفقاً لتعليمات الصانع لقياس فعالية التنقيح كما طبيعة الأليلات المتولدة بالتنقيح. يتم توضيح النتائج أدناه في الجدول 2، حيث تشير الأرقام إلى نسبة نشاط NHEJ المئوية الملحوظة:

الجدول 2أ: مصفاة الكتلة في خلايا K562 (25 نانو جرام لكل ZFN)

	51949	51977	51979	51982	51990	51993	52015	52032		متوسط
51856	22.2	21.0	27.7	23.2	21.0	23.9	17.0	26.7		22.8
51857	28.5	24.4	29.4	28.1	26.7	23.9	19.2	32.8		26.6
51862	15.9	16.3	15.5	15.3	11.7	20.8	13.9	22.4		16.5
51877	12.0	13.2	12.4	13.9	10.7	11.3	9.1	13.8		12.1
51879	14.2	15.1	14.9	13.8	12.0	14.4	10.8	16.8		14.0
متوسط	18.6	18.0	20.0	18.8	16.4	18.9	14.0	22.5		
46801:47923	9.3									

الجدول 2ب: مصفاة الكتلة في خلايا K562 (25 نانو جرام لكل ZFN أيسر، 5 نانوجرام لكل ZFN أيمن)

		51949	51977	51979	51982	51990	51993	52015	52032	متوسط
51856		10.9	12.6	16.9	13.4	11.0	12.4	8.5	15.5	12.7
51857		15.7	12.8	15.2	14.1	12.5	14.4	11.8	14.5	13.9
51862		13.0	11.4	13.9	10.4	14.3	12.2	12.2	14.3	12.7
51877		8.2	7.2	8.8	6.7	8.2	7.1	7.0	6.9	7.5
51879		8.5	7.9	11.5	8.3	8.4	7.1	4.9	11.2	8.5
متوسط		11.3	10.4	13.3	10.6	10.9	10.6	8.9	12.5	
46801:47923		7.3								

تم كذلك إنشاء ZFNs باستخدام أربعة من الروابط المختلفة بين نطاق ربط DNA ونطاق إنزيم النوكلياز (انظر منشور براءة اختراع الولايات المتحدة رقم 20150064789). يتم توضيح المتواليات الرابطة المختبرة أدناه، حيث جزء 'HTKIH' من المتوالية يكون عبارة عن جزء طرف الكربوكسي من نطاق ربط DNA ويكون جزء 'ELEEK' عبارة عن جزء طرف الأمينو من نطاق إنزيم النوكلياز.

يكون الجزء الموضوع أسفله خط هو المتوالية الرابطة بين نطاقين:

المتواليات الرابطة L7a: HTKIH LRGSQLVKSKSEAAAR ELEEK (المتوالية رقم: 31)

L7c5: HTKIH LRGSISRARPLNPHP ELEEK (المتوالية رقم: 32)

L0: HTKIH LRGSISRARPLNPHP ELEEK (المتوالية رقم: 33)

L8c4: HTKIH LRGSYAPMPPLALASP ELEEK (المتوالية رقم: 34)

في هذه التجارب، تم اختبار الروابط L0 أو L8c4 على شريك الجانب الأيمن في توليفة مع الروابط L7c5 أو L7a على شريك الجانب الأيسر. تم اختبار توليفات من ZFNs لنشاط القطع في خلايا K562، ويتم توضيح النتائج (نشاط NHEJ المئوي) في الجدول 3 أدناه.

الجدول 3: روابط نطاق متغير لنشاط ZFN

	L7a	L7a	L7c5	L7c5	L7c5		
متوسط	51446	46801	51862	51857	51856	SBS	
7.66	10.6	4.8	7.3	9.2	6.4	51949	L0
7.41	8.7	5.0	5.6	8.9	8.8	51977	L0
9.70	11.3	4.5	10.8	10.5	11.4	51979	L0
8.56	10.5	4.9	9.3	9.7	8.3	51982	L0
8.86	10.2	5.3	7.5	11.0	10.3	51990	L0
9.52	10.9	5.1	7.3	13.5	10.7	51993	L0
7.34	6.7	5.7	7.2	8.6	8.5	52015	L0

L0	52032	11.5	11.3	7.0	5.0	14.8	9.91
L0	47923	7.6	7.6	5.0	4.0	11.5	7.14
L8c4	52075	10.9	10.9	7.2	5.6	11.7	9.27
L8c4	52103	9.9	8.9	8.5	3.8	10.9	8.37
L8c4	52105	16.7	13.0	16.3	6.3	15.2	13.49
L8c4	52108	9.7	7.5	6.5	4.2	12.0	7.99
L8c4	52116	12.0	15.7	9.8	4.0	13.4	10.99
L8c4	52119	13.1	9.8	8.3	4.5	10.3	9.19
L8c4	52141	15.2	7.2	6.9	3.4	13.2	9.17
L8c4	52158	9.3	10.3	7.4	3.6	12.5	8.64
L8c4	51536	13.3	12.1	11.3	8.0	15.4	12.04
	متوسط- <	10.76	10.32	8.28	4.88	11.65	

المثال 3: نشاط ZFNs في خلايا +CD34

تم كذلك اختبار ZFNs كما هو موصوف في هذا الطلب في خلايا +CD34 بشرية. بالنسبة إلى تحويل +CD34، تم استخدام وسيلة BTX ECM830 لوعاء مخبري فجوي من 2 مم. تم إنماء خلايا

CD34+ بشرية في وسط x-vivo10 (Lonza) بمقدار 1 × CC110 (تقنية خلية جذعية) في أطباق معالجة بمزرعة غير نسيجية. تم إحصاء الخلايا وتجميعها بواسطة الطرد المركزي عند 1200 دورة لكل دقيقة لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة. تم غسل الخلايا 1-2 ضعف بـ PBS في درجة حرارة الغرفة. تم استخدام 200000 خلية لكل نقل عدوى، وتمت إعادة تعليقها في محلول من 100 ميكرولتر BTexpress. بالنسبة إلى تجارب CD34+، تم استخدام RNAs تشفر ZFNs بدلاً من DNA. تم توليد RNA باستخدام طقم mMessageMachine T7 Ultr (Ambion). تمت إضافة 500 نانوجرام من RNA يشفر كل ZFN لكل نقل عدوى وتم نقل الخليط إلى وعاء مخبري. ومباشرةً عقب النقل، تمت المعالجة بالنقل الكهربي للخليط عند 250 فولت لمدة 5 مللي ثانية. تمت إضافة أوساط مسخنة مسبقاً إلى الوعاء المخبري وتم نقل الأوساط بجانب الخلايا إلى أطباق معالجة لمزرعة من غير نسيج ذات 48 عين وبعد ذلك حضانتها في 37 درجة مئوية.

بعد يومين أو ثلاثة، تم بعد ذلك تعريض الخلايا إلى تحليل الجينوم باستخدام Illumina MiSeq. للتحديد الكمي للنسبة المئوية من الأليلات المنقحة، كانت المنطقة الجينومية المقصودة مضخمة في PCR باستخدام البادئات التي تضيف متواليات مهائية لعمل المتواليات Illumina القياسية. تم إجراء مجموعة ثاني ن 13 من دورات PCR لإضافة شفرة عمودية ومتواليات مهايئ قنطرية إلى كلا الطرفين. تم إجراء عمل المتواليات على Illumina MiSeq وفقاً لبروتوكولات الصانع لعمل متواليات من وحدة التضخيم. يولد MiSeq قراءات مقترنة الطرف، والتي يتم دمجها وضبطها بمهايئ باستخدام برنامج محاذاة قياسي. تمت إزالة تجميع الإشارات للقراءات بواسطة عينة من خلال أزواج متوالية الشفرة العمودية باستخدام نصوص قياسية. ثم تم بشكل مشترك محاذاة متواليات وحدة التضخيم مع متوالية مرجعية من خلال تنفيذ خوارزم Needleman–Wunsch (Needlemanand Wunsch(1970). Jour Mol Bio 48 (3): 443–53). تم إحصاء الفجوات أو الإدخالات في المحاذاة في صورة حالات NHEJ %، ومقارنتها مع عينة مقارنة غير معالجة لتحديد معدلات الركيزة النوعية لمتوالية. يتم توضيح النتائج أدناه في الجدول 4.

الجدول 4: نشاط ZFN في خلايا CD34+

	519	519	519	519	519	519	519	520	520	515
	49	77	79	82	90	93	15	32	36	مت وسط

29.2	nd	32،1	26.4	37.0	37.3	23.9	26.9	11.9	38.4	51856
40.4	40.0	53،9	35.2	43.9	51.0	30.9	39.8	17.2	52.1	51857
16.0	17.7	16،2	13.7	20.7	26.6	12.4	13.0	5.2	18.4	51862
14.6	13.7	19،4	11.6	18.3	24.0	9.6	8.9	6.0	19.6	51877
26.4	22.7	34،4	21.8	30.7	39.2	19.5	21.8	10.6	36.4	51879
45.4	nd	47،6	39.7	50.4	57.8	43.6	41.2	22.6	60.1	51446
										متوسط
	23.5	33،9	24.7	33.5	39.3	23.3	25.3	12.3	37.5	

عندما تم استخدام مقدار متزايد من mRNA المدخل لمجموعة مختارة من الأزواج التمثيلية (1 ميكروجرام لكل ZFN)، تمت ملاحظة مقادير إضافية من القطع، كما هو موضح في الجدول 5.

الجدول 5أ و5ب: تركيز ZFN المتزايد يؤدي إلى نشاط متزايد

الجدول 5أ

0.5 ميكروجرام: 0.5 ميكروجرام	
46801:47923	1.6
51556:51484	17.6
1 ميكروجرام: 1 ميكروجرام	
46801:47923	1.5
51536:51446	49.0
52032:51446	65.7
52032:51857	60.8
51979:51446	60.0
51979:51857	47.5
51536:51857	55.7
GFP	لا توجد متوالية

الجدول 5ب

	51536	51541	51556	51519	51534	51535

82.22	84.21	81.52	74.11	87.79	83.72	51446
74.22	79.50	67.88	64.20	84.34	75.21	51484
nd	85.53	78.81	74.00	85.24	82.71	51463
78.30	80.96	70.42	63.74	85.11	72.02	51477
70.90	75.20	66.22	58.17	82.38	72.33	51478
70.42	68.99	61.97	64.11	83.26	66.27	51487

تم في الأغلب إجراء صور نقل العدوى أعلاه في ظل ظروف مدخلات mRNA غير مشبعة للسماح لنا بأفضل مقارنة للنشاط الخاص بالتوليفات المختلفة ZFN. لاختبار المقدار الأقصى من التعديل الذي يمكن الحصول عليه في أو بالقرب من مدخلات التشبع لـ mRNAs قمنا بنقل العدوى لمقادير متزايدة من بنيات 2a أو المزج بين اثنين من ZFNs في mRNA واحدة في خلايا +CD34 باستخدام النقل الكهربي لـ BTX، ويتم توضيح النتائج أدناه في الجدول 6.

الجدول 6: تعديل معزز Bcl11a بمدخل mRNA متزايد

2a:	2000 نانو جرام	4000 نانو جرام	8000 نانو جرام
51949_2a_51463	59.60	79.83	82.69
51990_2a_51463	67.98	80.17	77.30
52032_2a_51463	58.58	80.36	83.26
51949_2a_51857	61.22	73.89	78.26

51990_2a_51857	60.63	70.55	74.40
52032 _2a_51857	55.84	71.17	74.29
51536_2a_51446_euf	56.36	66.69	74.85
47923_2a_46801_euf	51.15	72.20	75.97

تظهر البيانات في الجدول 6 تعديل مرتفع للغاية لمنطقة مستهدفة من ZFN بمدخل mRNA متزايد لجميع التوليفات المختبرة.

بالمثل للتجارب التي تم القيام بها في 2 التي تحلل النشاط مع ZFNs تشتمل على الروابط المختلفة، تم كذلك اختبار تأثير الروابط في خلايا +CD34. كما ورد أعلاه، تم استخدام مقادير مختلفة من mRNA (إما 500، 1000 أو 2000 نانوجرام لكل منها) لتوصيل ZFNs في هذه التجارب. يوضح الجدول 7 تأثير تطابق الرابط على نشاط أزواج ZFN.

الجدول 7: تأثير تطابق الرابط على نشاط ZFN في خلايا +CD34

500 نانوجرام			1000 نانوجرام			2000نانوجرام		
	51463	51857		51463	51857		51463	51857
51949	29.9	31.0	51949	48.8	46.7	51949	44.5	43.5
51979	26.3	23.8	51979	39.2	40.0	51979	36.3	35.1
51990	28.6	28.1	51990	39.8	41.8	51990	36.1	36.3
52032	24.7	25.5	52032	39.6	39.7	52032	37.2	33.6
51536	23.0	19.1	51536	36.0	31.0	51536	35.7	30.6

27.5	35.2	52075	32.0	34.7	52075	21.2	22.1	52075
31.6	36.2	52105	32.8	37.2	52105	19.1	21.9	52105
28.9	28.4	52116	28.8	27.6	52116	13.9	14.7	52116
38.2	41.7	52158	34.9	36.3	52158	21.1	22.2	52158
	51446	2000نانوجرام		51446	1000نانوجرام		51446	500نانوجرام
	28.7	51536		35.5	51536		19.8	51536

المثال 4: تمايز خلايا +CD34 المنقحة والتعبير الوراثي عن خضاب الدم

لاختبار تأثير التعبير الوراثي على جلوبين جاما النسبي، تم إدخال mRNAs تشفر عينة تمثيلية من أزواج ZFN في خلايا +CD34 (تم الحصول عليها من متطوعين مانحين أصحاء) بواسطة نقل العدوى للنواة BTX وفقاً لإرشادات الصانع. تم بعد ذلك تمايز الخلايا في الكريات الحمراء. بشكل مختصر، تمت تنقية خلايا $CD34^+$ باستخدام Ficoll-Paque (GE Healthcare) وكريات بحجم الميكرو من $CD34^+$ (Miltenyi Biotec) وفقاً لتعليمات الصانع. تمت زراعة خلايا $CD34^+$ في Iscove's MDM مع BIT 95000 (StemCell Technologies) في وجود عوامل النمو. تم تمايز الخلايا إزاء السلالات من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر باستخدام نموذج زراعة من 3 خطوات. أثناء الـ6 أيام الأولى (الطور الأول)، تم تمديد خلايا $CD34^+$ مع SCF (100نانوجرام/ملليلتر)، Flt3-L (100نانوجرام/ملليلتر)، و IL-3 (100نانوجرام/ملليلتر). تم بعد ذلك تقييد الخلايا المتمددة وتمايزه إزاء السلالات من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر (الطور الثاني) مع Epo (2 وحدة/ملليلتر) و SCF (50 نانوجرام/ملليلتر). انظر، *See,* Giarratana *et al.* (2011) *Blood*118(19):5071-9.

لتحليل التعبير الوراثي عن جلوبين جاما النسبي، تم تحديد نسب mRNAs تشفر جلوبين جاما، جلوبين ألفا وجلوبين بيتا بعد المعالجة بـ ZFN في 14 يوم بعد بداية التمايز بواسطة تحليل RT-

PCR. تم القيام بهذا التحليل بواسطة تحليل Taqman® القياسي، بإتباع البروتوكول واستخدام اختبارات نوعية للجين تم توفيرها بواسطة الصانع (Applied Biosystems). تم قياس المستويات النسبية من جلوبين جاما relative levels of gamma globin (HBG) بواسطة مستوى التعبير الوراثي عن جلوبين ألفا level of alpha (HBA) أو بيتا beta globin (HBB) حيث تمت مقارنة النسبة مع نسبة جاما/ألفا أو جاما/بيتا في خلايا المقارنة.

يتم تقديم البيانات أدناه في الجدول 8، وتوضح أنه بالمقارنة مع الخلايا التي تمت معالجتها بـ GFP المشفر للبلازميد، كانت هناك زيادة في التعبير الوراثي عن جلوبين جاما في الخلايا المعالجة بـ ZFN.

الجدول 8: التغير في التعبير الوراثي عن جلوبين جاما بالنسبة إلى جلوبين ألفا أو بيتا في خلايا CD34+ المنقحة

زوج ZFN	HBA/HBG	HBB/HBG
47293/46801	2.7	4.4
51536/51446	5.0	8.1
51536/51463	8.0	10.5
51536/51484	3.8	6.4
GFP	1.6	2.8

يوضح تمايز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر في المعمل لخلايا CD34+ المنقول إليها العدوى عند أو بالقرب من تركيزات mRNA المشبع المتبوع بتحليل RT-PCR للتعبير الوراثي عن الجلوبين كما هو موصوف أعلاه تنشيط جاما-جلوبين فعال للغاية بواسطة جميع أزواج ZFN المختارة التي تستهدف معزز Bcl11a عند مقارنته مع عينة المقارنة المنقول إليها العدوى بواسطة GFP mRNA (الشكل 1). يتم تقديم البيانات أدناه في الجدول 9.

الجدول 9: نسبة متزايدة من التعبير الوراثي عن جلوبين جاما البشري

	HBB/HBG		
mRNA المستخدم	2 ميكروجرام	4 ميكروجرام	8 ميكروجرام
51949-2a-51463	10.33	17.56	21.84
51990-2a-51463	12.75	16.05	16.96
52032-2a-51463	9.94	17.91	18.97
51949-2a-51857	10.12	14.16	12.21
51990-2a-51857	10.36	12.37	16.47
52032-2a-51857	8.57	15.18	19.01
51536-2a-51446	9.45	10.43	14.76
47923-2a-46801	8.86	12.15	13.10
GFP	1.65		

المثال 5: نشاط ZFN في خلايا +CD34 باستخدام وسيلة نقل كهربي BTX، mRNAs منفصلة و mRNAs أحادية

تم استخدام نشاط زوجي ZFN في خلايا +CD34 بشرية مثبتة معزولة عن دم محيطي بشري وفي الخلايا +CD34 المعزولة من نخاع العظم. بشكل مختصر، تم عزل خلايا +CD34 من المانحين الأصحاء كالتالي. تم استنفاذ الصفيحات لتجميعات فِصادَة كُرَيَّات بِيْض من خلال الطرد المركزي منخفض السرعة والإزالة للسائل الطافي. عقب استنفاذ الصفيحات، تم ترقيم الخلايا بكريات ميكرووية مغناطيسية مضادة لـ CD34 (Miltenyi Biotec، ألمانيا) واختيارها بشكل موجب باستخدام نظام فصل خلية Miltenyi CliniMACS Plus. عقب الاختيار، تم غسل الجزء الموجب (CD34+ HSPC المخصبة) وإعادة تعليقها في وسط مزرعة (أي، وسط X-VIVO 10 مكمل بـ 2 مللي مولار من L-جلوتامين، 100 نانوجرام/ملليلتر من كل من جزيء ترابطي-3 من كيناز تيروسين شبيه بـ FMS

(Flt-3L)، عامل خلية جذعية (stem cell factor (SCF، وثرومبوبويتين (thrombopoietin (TPO)) في 1 × 106 خلايا/ملليلتر، ونقلها في أكياس مزرعة VueLife (Saint-Gobain، Gaithersburg، MD) وحضانتها في 37 درجة مئوية/ 5% من CO2. لتنقية خلايا +CD34 من نخاع العظم، تم استنفاذ التجميعات من خلايا الدم الحمراء red blood cells (RBC) بواسطة ترسيب نشا هيدروكسي إيثيل. بعد استنفاذ خلايا الدم الحمراء RBC، تم ترقيم الخلايا بكريات ميكروية مغناطيسية مضادة لـ CD34 (Miltenyi Biotec، ألمانيا) واختيارها بشكل موجب باستخدام Miltenyi CliniMACS Prodigy. بعد الاختيار، تم غسل الجزء الموجب (CD34+ HSPC المخصبة) وإعادة تعليقها في وسط مزرعة (أي، وسط X-VIVO 10 مكمل بـ 2 مللي مولار من L-جلوتامين، 100 نانوجرام/ملليلتر من كل من جزيء ترابطي-3 من كيناز تيروسين شبيه بـ FMS (Flt-3L)، عامل خلية جذعية (SCF)، وثرومبوبويتين (TPO)) في 1 × 106 خلايا/ملليلتر، ونقلها في أكياس مزرعة VueLife (Saint-Gobain، Gaithersburg، MD) وحضانتها في 37 درجة مئوية/ 5% من CO2.

كانت الأزواج المستخدمة 51536/51446 (الزوج (أ)) و SBS51857/51949 (الزوج (ب)). تم اختبار ZFNs في صورة mRNA تم إدخالها في الخلايا. لنقل العدوى، تم استخدام وسيلة BTX. بشكل مختصر، تم تعليق 200000 خلايا لكل عينة في محلول نقل كهربي BTXpress Electroporation solution (BTX) وخلطه مع RNA. ثم تم تعريض الخليط لنبضة لمدة 4 مللي ثانية في 250 فولت وتعريضها إلى ظروف صدمية باردة (30 درجة مئوية طوال الليل) قبل ترك الخلايا تتعافى في 37 درجة مئوية. تم إجراء تحليل لنشاط ZFN يومين أو ثلاثة بعد نقل العدوى. تم اختبار ZFNs في صورة أنواع mRNA منفردة، حيث تم استخدام متوالية ببتيد ذات قطع ذاتي 2a بين اثنتين من متواليات تشفير ZFN، ويتم تقديم البيانات في الشكل 2. بالإضافة إلى ذلك، تم استخدام الظروف ذاتها لاختبار 1 زوج من ZFN حيث توفير mRNAs كان في صورة نوعين منفصلين، حيث كل mRNA قام بتشفير ZFN أحادي. يوضح الجدول 10أ والجدول 10ب نتائج النشاط (% من NHEJ أو مركبات إنديل) لنهج mRNA أحادي مقابل اثنين من mRNAs (البيانات الموصوفة تعد من التجارب المتعددة).

الجدول 10أ: مقارنة أنواع mRNA أحادية مقابل مزدوجة (% من مركبات إنديل)

mRNA **مستخدم**	**2.0 ميكروجرام**	**4.0 ميكروجرام**
51857_2a_51949، التجربة رقم 1	56.0	64.7

51857_2a_51949، التجربة رقم 2	61.2	73.9
51857 + 51949	83.1	80.5

الجدول ب: مقارنة أنواع **mRNA** أحادية مقابل مزدوجة (% من مركبات إنديل)

mRNA مستخدم	0.5 ميكروجرام	2.0 ميكروجرام	4.0 ميكروجرام
51857_2a_51949، التجربة رقم 3	32.0	51.5	58.7
51857 + 51949، التجربة رقم 3	40.0	58.4	63.1

قمنا كذلك باختبار التعبير الوراثي عن جلوبين جاما البشري وجلوبين بيتا البشري باستخدام TaqMan® وفقاً للبروتوكولات القياسية. تم بعد ذلك قياس النتائج في صورة حصة من HBG (جاما) بالمقارنة مع HBB (بيتا)، ويتم وصفها في الشكل 3، مرة أخرى مقارنة زوجين من ZFN: 51536/51446 (الزوج (أ)) وSBS51857/51949 (الزوج (ب)). بالإضافة إلى ذلك، تم كذلك قياس التعبير الوراثي عن HBG وHBB بمقارنة توفير زوج ZFN في صورة mRNA أحادي، حيث يتم فصل المتواليات التي تشفر كل ZFN في الزوج بواسطة متوالية ببتيد ذاتية القطع 2a، b بظروف حيث تم توفير mRNA التي تشفر كل ZFN بشكل منفصل. أظهرت البيانات أنه في ظل هذه الظروف، كان الزوج (ب)، SBS51857/51949، أكثر نشاطاً في قطع مستهدف BCL11a وفي إحداث زيادة في التعبير الوراثي عن HBG.

تم اختبار أزواج ZFN في خلايا +CD34 مشتقة من نخاع العظم ووجد مرة أخرى أن كلا الزوجين يعدا نشطين (انظر الشكل 4أ). تم كذلك اختبار نشاط زوج SBS51857/51949 حيث تم توفير ZFNs على mRNA أحادي بـ 2a أو اثنين من mRNAs منفصلة كما هو موصوف أعلاه (الشكل 4ب). أظهر الزوج SBS51857/51949 نشاط مرتفع بالمقارنة بزوج 51536/51446.

المثال 7: تحليل القدرة النوعية

تحليل احتجاز غير متحيز:

يعتمد اختبار الاحتجاز على الملاحظة بأن الإدخال المشترك للإنزيم النوكلياز ومانح DNA مزدوج في خلية مستهدفة يعطي "احتجاز" للمانح في جزء من مواقع الكسر الجينومية الناتجة من خلال مسار إصلاح NHEJ DNA (Orlando et al, (2010) Nucleic Acids Res. 38(15) e152؛ Gabriel, R. et al. (2011). Nat Biotechnol. 29: 816-23.). نلاحظ أن هذا الاحتجاز لا يتم تحريكه من خلال التجانس (في حقيقة الأمر لا يحتوي مانح DNA المزدوج على أي من التجانس مع الجينوم البشري). نلاحظ كذلك أنه لا يمكن احتجاز mRNA تشفر ZFNs في كسر DNA، فقط يمكن لمانح DNA المزدوج ذلك. بمجرد الحجز يمثل الجينوم المزدوج علامة دائمة لحالة القطع. بعد عزل DNA الجينومي، يمكن أن يتم تحديد مواقع الاحتجاز من خلال تمدد البادئ من المانح في متوالية الجينوم المجانحة، متبوع بربط المهايئ، PCR، وعمل متواليات من وصلات المانح والجينوم الناتج.

بشكل مختصر، تم إجراء دراسات تحليل الاحتجاز في سلالة خلية K562 لتعظيم توصيل المانح، التعبير الوراثي عن ZFN، واحتجاز مانح في مواقع DSB ؛ تم النقل الكهربي للخلايا مع mRNA مشفر لـ ZFN والمانح المزدوج من الأوليجونوكليوتيد. بشكل منفصل، تم النقل الكهربي لخلايا +CD34 المشتقة من BM وPB باستخدام وسيلة Maxcyte كما هو موصوف مع mRNA مشفر لـ ZFN. يتم توضيح الأوليجونوكليوتيد من المانح المزدوج المستخدم أدناه (المتواليات أرقام: 30 و31):

'5

NNNNAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCT

'3 '3 CAGACCCTTTTAGTCNNNNNAGTGTGGAAAATCTCTAGCAG

TCATCACACACGGGCAGACAACACACTGAGACCATTGATCTCTAGGGAGTC

'5 TGGGAAAATCAGNNNNNTCACACCTTTTAGAGATCGTCNNNN

يشير NNNN في الطرف 5' من كل جديلة إلى تدلي رباعي الوحدات عشوائي، منفرد الجديلة، بينما يشير NNNN الموضوع أسفله خطاً إلى متوالية مزدوجة عشوائية تعمل في صورة شفرة عمودية لتمايز بين حالات الدمج المتطابقة الأخرى. تم تحضير العينات ثلاثية الأضعاف لكل توليفة من أوليجو وmRNA. في اليوم 7 و14 بعد نقل العدوى تم عزل DNA الجينومي (باستخدام طقم الدم والنسيج Qiagen DNeasy)، وتم استخدام 1 ميكروجرام (330000 جينوم/نسخة) في صورة مدخل لبروتوكول التضخيم. تمت بعد ذلك معالجة العينات بشكل أساسي كما هو موصوف (Paruzynski, A. et al. (2010). Nat. Protocols. 5:1379-1395). تمت تنقية وحدات التضخيم باستخدام طقم تنقية

QIAquick PCR (Qiagen)، وتضخيمها بواسطة PCR لإدخال الشفرات العمودية والمهايئات لعمل المتواليات العميقة على منصة Illumina. تم التحديد الكمي للمنتجات النهائية، تجميعها معمل متواليات منها على جهاز MiSeq (Illumina) باستخدام طقم عمل متواليات من 300 دورة من نوع v2 بطرف مقترن له قراءات 150 زوج قاعدي وقراءات مؤشر مزدوج من 8 زوج قاعدي للكشف عن الشفرات العمودية على كل طرف من وحدة التضخيم. أنتجت تلك الجهود مجموعة من المواقع خارج الهدف المرشحة التي تم تنميطها وراثياً في خلايا CD34 مشتقة من BM أو PB. يتم توضيح النتائج التي تم تحديدها للزوج (أ) (SBS رقم 51536/51446) في الشكل 10أ، بينما يتم توضيح النتائج للزوج (ب) (SBS رقم 51949/51857) في الشكل 10ب. يتم كذلك تلخيص البيانات أدناه في الجدول 11.

الجدول 11: تحليل خارج الهدف لزوج (أ) والزوج (ب)، +CD34 من نخاع العظم

أ	250 ميكروجرام/ملليلتر	%63	21	%9
ب	125 ميكروجرام/ملليلتر	%63	9	%3
ب	250 ميكروجرام/ملليلتر	%74	20	%17

تم إجراء دراسات مماثلة على خلايا +CD34 مشتقة من PB، ولخص الجدول 12 أدناه النتائج المكتشفة.

الجدول 12: تحليل خارج الهدف لزوج (أ) والزوج (ب)، +CD34 من الدم المحيطي

ZFNs	الجرعة	في الهدف	أعداد خارج الهدف	نشاط تراكمي
الخطوة 4	120 ميكروجرام/ملليلتر	%60	11	%4

الخطوة 5	120 ميكروجرام/ملليلتر	%56	10	%3

المثال 6: نشاط ZFN في خلايا +CD34 باستخدام وسيلة نقل كهربي Maxcyte، mRNAs منفصلة و mRNAsأحادية

قمنا بعد ذلك بإجراء التجارب على النطاق الكبير باستخدام أزواج ZFN في خلايا +CD34 باستخدام وسيلة نقل كهربي Maxcyte GT. تم اختبار خلايا +CD34 المثبتة المعزولة من الدم المحيطي من المانحين الطبيعيين كما هو موصوف أعلاه (PB) كالتالي: تمت إعادة تعليق الخلايا (3 مليون لكل عينة) في محلول منظم من RT Maxcyte EP إلى تركيز نهائي من 30 e6 خلية/ملليلتر. تم خلط الخلايا مع mRNA ومعالجتها بالنقل الكهربي باستخدام البرنامج المحدد من قبل الصانع. تم ترك الخلايا لتتعافى بعد وقت قصير في 37 درجة مئوية لمدة عشرين دقيقة، ثم تخفيفها وتعريضها إلى ظروف الصدمة بالبرودة (30 درجة مئوية طوال الليل) قبل ترك الخلايا تتعافى في 37 درجة مئوية. تم تحليل النشاط يومين إلى ثلاثة لاحقاً. تم القيام بالتجارب مع كل من الزوج (أ) والزوج (ب) كما بالسابق، حيث تم إدخال كل زوج في mRNA أحادي (الشكل 5أ). تم كذلك اختبار الزوج (ب) من ZFN (SBS51857/51949) في صورة mRNA أحادي أو اثنين منفصلين من mRNAs كما هو موصوف أعلاه (الشكل 5ب). في هذه التجارب، أظهر الزوج (ب) النشاط الأعلى.

للخلايا المشتقة من نخاع العظم، تطلب التنقيح الناجح mRNA أكثر، لكن لوحظ وجود نشاط مرتفع (انظر الشكل 6). تم تحليل الخلايا من حيث التعبير الوراثي عن HBG وHBB كما هو موصوف أعلاه ونسبة HBB/HBG بالمقارنة مع نشاط الإنديل المئوي في اليوم صفر (الشكل 7). كان هناك توافق جيد بين مستويات مرتفعة من التعبير الوراثي عن HBG ونشاط الإنديل المرتفع.

تم القيام بتحاليل أكثر باستخدام البروتوكول Maxcyte (الشكلان 8 و9) حيث ظهر أنه على الرغم من أن تكرار مركبات الإنديل لم يكن دائماً ذاته في كل تجربة، تمت مراقبة النشاط النسبي (مثل، 2a SBS51857/51949 بنية أعلى من mRNAs المنفصلة) في كل دورة.

المثال 7: تطعيم خلايا +CD34 البشرية المنقحة في الفئران

كما هو موصوف أعلاه، تتم معالجة خلايا بشرية +CD34 بـmRNAs تشفر ZFNs النوعية تجاه مقوي 58+ وبعد ذلك تطعيمها في فئران NSG. يتم الحصول على خلايا +CD34 من متطوعين بشر أصحاء. في بعض الحالات، تم القيام باستراتيجيات تثبيت +CD34، باستخدام أي من G- CSF (Neupogen®) أو G-CSF + Plerixafor (Mozobil®) قبل الفصاد. يتم إعطاء G-CSF يومياً لمدة أربع أيام قبل الفصاد وفقاً لإرشادات الصانع، وإن تم استخدام Plerixafor، فإنه تم إعطاؤه في الليل الأخير قبل التجميع، مرة أخرى وفقاً لإرشادات الصانع. يتم إجراء الفصاد بواسطة الطرق القياسية. تم تخصيب خلايا +CD34 من نواتج فِصادَة كُرَيَّات بِيْض من PBMC مثبتة باستخدام نظام Miltenyi CliniMACs بواسطة الطرق القاسية ووفقاً لتعليمات الصانع.

يتم تخليق mRNAs مغطاة ومعالجة ببولي أدينيل تشفر ZFNs باستخدام طقم Ambion mMessage mMachine® T7 فائق كما ورد من الصانع وتعريضها للنقل الكهربي في خلايا +CD34 باستخدام إما نظام Maxcyte GT أو جهاز نقل كهربي BTX ECM830، كليهما وفقاً لإرشادات الصانع.

يتم استخدام فئران NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ لتلقي غريسة زراعة +CD34. يوم واحد (16-24 ساعة) قبل الغرس، يتم تعريض الفئران إلى إشعاع أقل من المميت (300 راد). تتم زراعة الخلايا +CD34 المعالجة بـ ZFN من الوارد أعلاه في الفئران التي تم تعريضها للإشعاع من خلال حقن وريد الذيل، حيث تم إعطاء 1 مليون خلية في 0.5 ملليلتر من PBS-0.1% من BSA لكل فأر.

لهذه التجربة، يتم النقل الكهربي لخلايا +CD34 مع mRNAs تشفر زوج 47923/46801. يتم استنساخ جينات تشفر ZFNs معاً في إطار قراءة مفتوح منفرد منفصل بواسطة متوالية تشفر ببتيد ذاتي القطع 2A. تم استخدام GFP في صورة عينة مقارنة. بعد الزراعة في الفئران، يتم أخذ العينات إما في 4، 8 و12 أسبوع بعد الزرع لملاحظة مستوى الترقيم النوعي للخلية البشرية في الخلايا.

يتم تطعيم خلايا +CD34 المنقحة بـ ZFN وتتمايز، تعد مستويات التطعيم متماثلة بين الخلايا المنقحة بالمقارنة مع عينات المقارنة غير المنقحة.

المثال 8: نشاط ZFNs في الخلايا المشتقة من المريض

تم اختبار نشاط ZFN في خلايا +CD34 بشرية ثابتة معزولة من الدم المحيطي البشري وفي خلايا +CD34 معزولة من نخاع العظم. تم تثبيت HSPC من خمسة من خاضعين يعانون من ثَلاسيمِيَّة

β (محددة على أنها P11، P18، P04، P08 وP19) وتنقيتها كما هو موصوف (Yannaki et al. (2012) Mol Ther 20(1):230). في كلتا التجربتين، تم النقل الكهربي لعدد 200000 من خلايا +CD34 يومين بعد الإذابة، باستخدام جهاز نقل كهربي BTX (Holliston، MA، فولطية=250 فولت، طول نبضة= 5 مللي ثانية) في 100 ميكرولتر من محلول نقل كهربي BTX Express. استخدمت صور نقل العدوى إما 4 ميكروجرام من بروتين فلوري أخضر green fluorescent protein (GFP) يشفر mRNA (في صورة عينة مقارنة لفعالية النقل الكهربي، وللتحكم تأثيرات غير نوعية للنقل الحراري ذاته، ولتأثيرات غير نوعية لإدخال mRNA في الخلايا)، أو 4 ميكروجرام و8 ميكروجرام من mRNA 51857-2a-51949.

في نقل العدوى على المستوى الصغير باستخدام جهاز النقل الكهربي BTX تسببت هذه المقادير من mRNA من SB51857/51949 تعديل جيني مستهدف مكافئ وتنشيط γ-جلوبين إلى تركيزات 80-120 ميكروجرام/ملليلتر مستخدمة في صور نقل العدوى بوسيلة MaxCyte ذات الحجم الكبير.

بعد النقل الكهربي، تم إجراء زراعة مؤقتة طوال الليل في درجة حرارة 30 درجة مئوية. تمت زراعة الخلايا لمدة 48 ساعة إضافية في 37 درجة مئوية حيث تم بدء التمايز في المعمل وتم تجميع نسب الخلية لتحليل تعديل DNA. بعد نقل العدوى، تمت زراعة الخلايا في وسط X Vivo 10 (Lonza, Walkersville, MD) مكمل بخليط من سيتوكين CC 100 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada).

تم قياس تعديل جين BCL11A بواسطة عمل متواليات عميقة من MiSeq 72 ساعة بعد النقل الكهربي، في الزمن عندما تم بدء تمايز في المعمل (بالتالي كان d3 بعد نقل العدوى هو d0 من التمايز) وفي اليوم 14 من تمايز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر. يتم توضيح النتائج في الجدول 13.

تم تجميد عينات خلية +CD34 تم الحصول عليها مشتقة من مريض قبل الاستخدام، وبالتالي بعضاً من هذه العينات أظهر حيوية منخفضة ونمو خلوي منخفض عند الإذابة. تمت ملاحظة حيوية منخفضة بعد الإذابة للتوافق مع الانخفاض الكبير في الحيوية بعد نقل العدوى ومع التعديل الجيني المستهدف المنخفض، خاصةً في النقاط الزمنية المبكرة، عندما لا يزال DNA من الخلايا الميتة غير المصابة بالعدوى موجودًا. بالنسبة إلى مؤشر مستقل لنقل العدوى بـ SB-ZFN لحيوية الخلية بعد نقل العدوى، يظهر الجدول 13 حيوية الخلية لكل مصدر خلية في عينة المقارنة التي تم نقل العدوى

إليها بواسطة GFP mRNA. يوضح الجدول أن عينات الخلية من المريض P18 في التجربة 1 كان لها حيوية منخفضة بكثير (38%) بالمقارنة بالعينيتين الآخريتين (71% و80%) في هذه التجربة ولم تصل إلى مستويات تعديل مشابهة لما يقارب من 70% من الأليلات المعدلة. بالمثل في التجربة الثانية في اليوم 3 أظهرت عينة الخلية المأخوذة من المريض P08 حيوية منخفضة للغاية (22%) ومستويات تعديل مبكر منخفض للغاية ومستويات تعديل أقل من المثلى حتى بعد تمدد الخلايا السليمة وزيادة نموها بشكل غير طبيعي.

الجدول 13: تحليل تعديل جين BCL11A بواسطة MiSeq

	مصدر خلية	حيوية عينة المقارنة GFP d3 (%)	SB-mRENH mRNA (ميكروجرام)	التعديل الجيني المستهدف (%)	
				اليوم 3	اليوم 14
التجربة 1	WT	71	4	70	69
			8	72	69
	P11	80	4	70	71
			8	73	73
	P18	38	4	45	53
			8	51	59
التجربة 2	WT	89	4	71	72
			8	77	77
	P04	62	4	48	62
			8	53	67

	P08	22	4	19	62
			8	32	68
	P19	68	4	ND	69
			8	ND	73

ND= لا توجد بيانات، WT= من النوع غير المعالج

توضح هذه البيانات أن خلل معزز BCL11A عقب النقل الكهربي لـSB ZFN mRNA في HSPCs منقاة، ومثبتة بـ G CSF من المانحات الأصحاء ومن مرضى ثَلاسيمِيَّة الذين يعانون من ثَلاسيمِيَّة β الحادثة في أغلب العينات ضمن المدى المتوقع للعينات المعملية. كنتيجة قابلية الحياة المنخفضة لبعضًا من العينات، كان الخلل في المعزز في P18 وP08 أقل مما حدث في الخلايا من المتطوعين المانحات الأصحاء، وبالتالي تم حذف العينتين ذات الحيوية المنخفضة من التحاليل أدناه. بشكل هام، أظهرت كذلك العينات من الخاضعين التي أظهرت حيوية خلية قوية (مثل، عينات P11 وP04) مستويات تعديل الجيني المكافئة لتلك المتضحة في الخلايا من النوع غير المعالج.

أظهرت مستويات mRNA جلوبين α وγ معزولة من نسل الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من CD34+ HSPC من خاضعين يعانون من ثَلاسيمِيَّة β زيادة في مستويات جلوبين (γ) جنيني بعد المعالجة بـ SB ZFN mRNA عند تحليلها بواسطة RT qPCR (الشكل 1). يتم توضيح مستويات mRNA جلوبين γ جنيني تم قياسها بالنسبة إلى mRNA جلوبين α حيث أن خلايا ثَلاسيمِيَّة عبرت بشكل منخفض أو لم تعبر على الإطلاق عن mRNA جلوبين β.

أظهرت ذرية الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من CD34+ HSPCs من خاضعين يعانون من ثَلاسيمِيَّة β معالجة بـ SB ZFN mRNA الزيادة المتوقعة في نسبة mRNA جلوبين (γ) جنيني إلى mRNA جلوبينα، لتصل إلى نسب من جاما-جلوبين إلى ألفا-جلوبين مماثلة لتلك المتضحة في الخلايا المانحة من النوع غير المعالج، تحديداً في عينات المرضى التي أظهرت حيوية جيدة بعد الإذابة وبالتالي مستويات تعديل جين مستهدف قابلة للمقارنة مع تلك في خلايا من النوع غير المعالج.

تم بعد ذلك استخدام HPLC بالطور المعكوس لتحديد ما إن كان تعديل معزز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من BCL11A يرفع خضاب الدم الجنيني في مستوى البروتين.

أظهرت نسب جلوبين جاما (مجموع قمم Agamma وGgamma)/جلوبين ألفا لتجربتين ارتفاع واضح لبروتين جلوبين جنيني والذي لوحظ في خلايا الدم الحمراء (RBCs) المشتقة من المتطوعين الأصحاء ومرضى ثَلاسيمِيَّة عند خلل SB ZFN لمعزز BCL11A، حتى على الرغم من أن نسب جاما/ألفا غير المعالجة في خلايا ثَلاسيمِيَّة بشكل خاص في خلايا β0/β0 تعد جيدة عادةً أعلى من تلك في الخلايا من النوع غير المعالج (الوزن). يتم تعقيد تحليل نسب الجلوبين الجنيني إلى البالغين في الخلايا من المرضى مع ثَلاسيمِيَّة β بشكل رئيسي من خلال حقيقة أن التحويل إلى الصورة رباعية الوحدات وترسيب جلوبين α في الخلايا غير المعدلة يزيلها من مجموعة قابلة للتحليل بواسطة HPLC.

بالتالي، يمكن أن يتم يظهر فقط جلوبين α محول للصورة الرباعية الوحدات بجلوبين β المتبقي (في المرضى الذين يعانون من ثَلاسيمِيَّة +β) وجلوبين γ، أو فقط جلوبين α محول للصورة الرباعية الوحدات مع جلوبين γ (في خلايا β0/β0) في هذا الاختبار. بالتالي، حال زادت مستويات بروتين جلوبين γ، يمكن أن تزيد مستويات بروتين جلوبين المحول للصورة الرباعية الوحدات كذلك وقللت نسبة بروتين جلوبين γ/α من قيمة الزيادة في مستويات بروتين جلوبين γ. تمثلت نسبة أخرى كانت مفيدة في فحص الخلايا من النوع غير المعالج نسبة جلوبين γ /بروتين شبيه β (الأخيرة تمثل مجموع مستوي بروتين جلوبين γ زائد جلوبين δ زائد جلوبين β). مع ذلك في خلايا مرضى ثَلاسيمِيَّة، تحديد في خلايا β0/β0، كانت النسبة المذكورة غالباً زيادة عن 90% حتى في الخلايا غير المعالجة بـ ZFN وحتى أن الزيادات الكبيرة في مستويات بروتين جلوبين γ بعد المعالجة بـ ZFN لم تزيد بشكل لافت من هذه النسبة.

المثال 9: تحليل توزيع الأليل المعدل والتأثير على الجلوبين الجنيني في خلايا +CD34 من النوع غير المعالج من الذي تمت معالجته بـ ZFN.

قمنا كذلك بتقييم خلايا شبيهة بالكريات الحمر مشتقة من خلايا +CD34 معالجة بـ SB ZFN، في مستوى الخلية الأحادية بالنسبة إلى النقاط النهائية: (1) توزيع الأليلات للمنطقة المعززة من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من BCL11A المصنفة بواسطة تأثير ZFNs بين الخلايا المنفردة، و(2) تأثير توزيع الأليلات المنفردة (من النوع غير المعالج والمعدلة وراثياً) على مستويات الجلوبين

الجنيني (كما هو مقاس بواسطة نسبة mRNA من جلوبين γ/β). بالتالي، تم فرز خلايا CD34+ الأحادية الموجودة في SB ZFN HSPC وتمايزها في المعمل. تم تجميع مستعمرات مشتقة من الخلية الأحادية الناتجة من الخلايا المحولة لصورة ذات خضاب دم بشكل منفرد؛ تم عمل متواليات من DNA جينومي (gDNA) لكل مستعمرة من المستعمرات في المنطقة المستهدفة من SB ZFN في معزز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من BCL11A لتحديد ما إن تم الإخلال بالموقع، وحال حدوث ذلك، ما الصورة الأليلية بالتحديد التي تم توليدها بالموقع. علاوة على ذلك، تم عزل كامل RNA من نفس المستعمرة، وتم تحليل مستويات التعبير الوراثي عن الجلوبين بتفاعل النسخ العكسي لسلسلة البوليميراز الكمي في الزمن الحقيقي (RT qPCR).

الطرق

للدراسات الخاصة بالخلية الأحادية، تمت إذابة خلايا SB ZFN HSPC المنقول إليها العدوى في 37 درجة مئوية، إضافتها إلى 10 ملليلتر X VIVO في درجة حرارة الغرفة، وتدويره لأسفل في 450 ضعف جرام لكل 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة. تمت إعادة تعليق كريات الخلية في 1 × 106/ملليلتر في وسط X VIVO مكملة بـ Flt3L، TPO، وSCF (100 نانوجرام/ملليلتر كل منها)، بنسيلين (100 وحدة/ملليلتر)، وستريبتوميسين (100 ميكروجرام/ملليلتر). بعد الزراعة طوال الليل في طبق معالج بمزرعة غير نسيجية من 24 عين في 37 درجة مئوية، 5%CO2 في حاضنة مرطبة، تم تجميع الخلايا، تدويرها، وإعادة تعليقها في محلول ملحي منظم بالفوسفات phosphate buffered saline (PBS) مكمل بـ0.5%من ألبومين المصل البقري في 2 × 106/ملليلتر. تم فرز الخلايا في أوساط مزرعة من الكريات الشبيهة بالحمر بالخطوة 1 (200 ميكرولتر/عين) في أطباق معالجة بغير TC له قاع على شكل حرف U من 96 عين في 2 خلية/عين باستخدام FACS Aria III. اشتملت الخطوة 1 على أوساط مزرعة من الكريات الشبيهة بالحمر من Glutamax يحتوي على وسط Dulbecco معدل بـ Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) مكمل بـ 100 وحدة /ملليلتر بنسيلين، 100 ميكروجرام/ملليلتر من ستريبتوميسين، 5% AB بشري + البلازما، 330 ميكروجرام/ملليلتر من ترانسفيرين هولو بشري، 20 ميكروجرام/ملليلتر من أنسولين بشري، 2 وحدة/ملليلتر من الهيبارين، 3 وحدة/ملليلتر من إريثروبويتين بشري ناتج عن عودة الارتباط الجيني، 100 نانوجرام/ملليلتر من SCF، 5 نانوجرام/ملليلتر من IL 3، و1 ميكرومولار/ملليلتر هيدروكورتيزون. بعد 7 أيام من الزراعة في 37 درجة مئوية، 5% CO2 في أوساط مزرعة من الكريات الشبيهة بالحمر بالخطوة 1، تمت إزالة 150 ميكرولتر من أوساط لكل عين وحلت محلها بـ

100 ميكرولتر من أوساط مزرعة من الكريات الشبيهة بالحمر بالخطوة 2، والتي كانت تشبه الأوساط بالخطوة 1 لكن دون إضافة IL 3 وهيدروكورتيزون. يعد 4 أيام إضافية من الزراعة، تمت إزالة 100 ميكرولتر من الأوساط لكل عين واستبدالها بـ 100 ميكرو لتر من أوساط الخطوة 3، والتي تشابهت مع أوساط الخطوة 2 لكن دون SCF.

في اليوم 14 بعد التمايز، تم تجميع 10 ميكرولتر من معلق الخلية لكل عين لعمل المتواليات العميقة. علاوة على ذلك، تمت إزالة 100 ميكرولتر من الأوساط لكل عين واستبدالها بـ100 ميكرولتر من أوساط من الخطوة 3 جديدة. تمت زراعة الخلايا المتبقية لمدة 3 أيام أخرى عندما تم تجميع 50 ميكرولتر من معلق خلوي لكل عين، مصبوغ بحجم مساوٍ من NucRed (2 قطرة/ملليلتر في PBS 0.5% BSA)، وحسابه على Guava easyCyte لمعدل تكوين الخلايا وتكوين التنوي. تم تدوير الخلايا المتبقية لأسفل، غسلها مرة بـ PBS، وتحللها في 20 ميكرولتر من ماء من فئة استشراب سائل مرتفع الأداء high performance liquid chromatography- (HPLC). تمت إزالة حطام الخلايا بواسطة طرد مركزي (10000 ضعف جرام، 15 دقيقة، 4 درجة حرارة). تم تخزين ناتج تحلل دموي في 70 درجة حرارة حتى التجهيز لتحليل سلسلة الجلوبين بواسطة استشراب السائل مرتفع الأداء معكوس الطور ultra performance liquid chromatography (UPLC).

تم تقييم فعالية التعديل الجيني بواسطة عمل متواليات DNA عميقة. تعد المنطقة المقصودة (المحتوية على موقع ربط ZFN داخل المنطقة المعززة للكريات الشبيهة بالحمر BCL11A) عبارة عن ناتج تفاعل سلسلة بوليمراز polymerase chain reaction- (PCR) مضخمة ويتم تحديد مستوى التعديل بواسطة عمل متواليات عميقة بالطرف المقترن على Illumina MiSeq. لتوليد المجموعات المتوافقة مع منصة تكوين متواليات Illumina MiSeq، تم ربط مهايئات، شفرات عمودية، ومادة رابطة لخلية تدفق (متوالية DNA قصيرة) بوحدات تضخيم نوعية للمستخدم باستخدام مجموعتي بادئات اندماج في تفاعلات سلسلة البوليمراز المتعاقبة. يتم استخدام البادئات التالية لـ PCRالمهايئة لـMiSeq (تعد الأجزاء الموضوع أسفلها خط عبارة عن متواليات معززة لخلايا شبيهة بالكريات الحمر BCL11A):

f :PRJIYLFN 5'

ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAGTCCTCTTCTACCCCACC (المتوالية رقم: 35)

و r :PRJIYLFN

GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTACTCTTAGACATAACACACC'5 (المتوالية رقم: 36). تم تجميع مزارع خلايا شبيهة بالكريات الحمر المشتقة من الخلية الأحادية المنفردة، وتم

استخلاص gDNA باستخدام QuickExtract™ (Epicentre) لتحليل التنميط الجيني باستخدام عمل متواليات عميقة على منصة Illumina.

لتحليل سلسلة الجلوبين بواسطة استشراب السائل مرتفع الأداء معكوس الطور UPLC بالطور المعكوس، تم حقن 5 ميكرولتر من ناتج تحلل دموي على عمود BEH C4 لبروتين من نوع Waters Acquity UPLC (300 أمبير، 1.7 ميكروم، 2.1 مم × 100 مم). تم الحصول على ناتج التصفية التتابعية في درجة حرارة الغرفة بمعدل تدفق من 0.2 ملليلتر/الدقيقة باستخدام تدرج خطي من 18 دقيقة لمقدار 38% إلى 42.5% من الأسيتونيتريل في الماء مع حمض تراي فلورو أسيتيك ثابت في 0.1%. تم إتباع التصفية التتابعية في 220 نانومتر. تم التحديد الكمي لنسبة المساحة المئوية لسلاسل الجلوبين النوعية، γ، β أو α، الممثلة لمقدار من كل سلسلة من سلاسل الجلوبين النوعية، باستخدام برنامج Agilent OpenLAB.

النتائج

لهذه الدراسة، تم نقل العدوى إلى 120 أو 80 ميكروجرام /ملليلتر من SB ZFN في خلايا CD34+ لتوليد خلايا SB ZFN HSPC وتم تجميع عينات الخلية عند ثلاثة أيام قبل نقل العدوى وتحليلها من حيث مستويات خلل المنطقة المعززة من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر BCL11A بواسطة عمل المتواليات العميق. أفصح ذلك عن نسبة تقريباً 67% من أليلات BCL11A المعدلة في العينة المنقول إليها العدوى من SB ZFN للتجربة 1 و58% للتجربة 2 (الجدول 14).

لإجراء هذا التحليل الخاص بالخلية الأحادية، تم فرز الخلايا المنفردة في SB ZFN HSPC من تجربتين مختلفتين (1 و2)، ووضعها في أطباق ذات 96 عين وتعرضت إلى التمايز الخاص بالخلايا الشبيهة بالكريات الحمر في المعمل، وتم تحليل مزارع الخلية الأحادية المنفردة بواسطة عمل متواليات من DNA ذات ناتج مرتفع كما تحليل التعبير الوراثي عن الجلوبين بواسطة UPLC، على التوالي.

يتم تلخيص نتائج التنميط الجيني لـ MiSeq لمزارع الخلايا الأحادية في الجدول 14. لكل صنف من خلايا HSPC معالجة بـSB ZFN، تم تحليل بين 200 300 من مزارع الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من الخلية الأحادية المنفردة. من جميع النسائل ذات الأنماط الظاهرية الواضحة (تم استبعاد النسائل المختلطة، 205 من النسائل للتجربة 1 و265 من النسائل للتجربة 2)، كانت 28 أو 36% من النسائل من النوع غير المعالج (+/+)، كانت 14 أو 11% من النسائل غير متجانسة الزيجوت

(+/)، وكانت 58 أو 52% نسائل متجانسة الزيجوت (/)، للتجربة 1 والتجربة 2، على التوالي. من جميع الأليلات في مزارع الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من الخلية الأحادية المشتقة من خلايا معالجة بـ SB ZFN، تم تعطيل 65% أو 58%، للتجارب 1 و2، على التوالي، في موقع معزز من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر BCL11A. من جميع مزارع الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من الخلية الأحادية الحاملة لأي من الأليلات المعدلة، كان لنسبة 81% (التجربة 1) أو 82% (التجربة 2) من نسائل الخلية المعدلة كلا أليلي BCL11A معطلين.

الجدول 14: التنميط الجيني لمزارع خلايا شبيهة بالكريات الحمراء من خلية أحادية مشتقة من HSPC منقول إليه العدوى من **SB ZFN**

الصنف-HSPC-ZFN-**SB**	**رقم التجربة**	
	1#	**2#**
النسائل الكلية المختبرة (الأليلات الإجمالية)	205 (410)	265 (530)
النسائل من النوع غير المعالج (+/+)	57 (%28)	96 (%36)
النسائل غير متجانسة الزيجوت (معدل أحادي الأليل) (+/−)	28 (%14)	30 (%11)
النسائل متجانسة الزيجوت (معدل ثنائي الأليل)(−/−)	120 (%58)	139 (%52)
المعدل الصافي(غير متجانس الزيجوت [+/−] + معدل ثنائي	148	169

الأليل [-/-])	(%72)	(%63)
جزء من الخلايا المعدلة الذي يكون معدل ثنائي الأليل [-/-]	%81	%82
تعديل معزز من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من BCL11A في مجموعة قبل زراعة الخلية الأحادية (% من الأليلات الإجمالية)	%67	%58
% من الأليلات الإجمالية تعديل معزز من الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر من BCL11A صافٍ من بيانات الخلية الأحادية (% من الأليلات الإجمالية)	%65	%58

توضح البيانات أن مجموعة SB ZFN HSPC تحمل نسبة 58-67% تعديل معزز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر BCL11A المستهدف شكلت 28-36% من الخلايا من النوع غير المعالج، 11-14% من الخلايا التي تحمل تعديل أحادي الأليل، و52-58% من الخلايا تحمل تعديل ثنائي الأليل بالموقع المستهدف.

من النسائل ذات الأنماط الجينية الواضحة، تم بنجاح تمايز 152 و172 نسيلة (التجربتين 1 و2، على التوالي) في الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر في المعمل، كما هو مشار إليه بواسطة معدل التنوي الداخلي المقاس بواسطة صبغة NucRed. تم بعد ذلك تعريض مزارع الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر بالخلية المنفردة المذكورة إلى تحليل UPLC بالطور العكسي لقياس مستوى التعبير عن سلسلة الجلوبين. اختلفت المستعمرات في درجة نضوج الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر؛ كان من المتوقع وجود بعض الاختلاف في نسبة جلوبين γ/β حتى داخل المستعمرات التي تحمل النمط الجيني المعزز للخلايا الشبيهة بالكريات الحمر BCL11A ذاته. علاوة على ذلك، يمكن ن يحتفظ جزء من الأليلات المختلة من معزز الخلايا الشبيهة بالكريات الحمر BCL11A بوظيفة جزئية أو مكتملة، بشكل محتمل نتيجة الاحتفاظ بموقع ربط GATA 1 (Vierstra et al (2015) Nat Methods. 12(10): 927-30؛ Canver et al (2015) Nature 527(7577): 192-7).

كما يتضح في البيانات (الشكل 13)، كشفت النتائج عن أن ترابط واضح بين النمط الجيني من مستعمرة لموقع معزز شبيه بالكريات الحمر من BCL11A ونسبة جلوبين γ/β منه. تحديداً، كان للمستعمرات الحاملة لتعديل ثنائي الأليل (متجانس الزيجوت) من BCL11A متوسط نسبة γ/β مقاسة بمقدار 35% و39% للتجارب 1 و2، على التوالي، بينما كان لمستعمرات بتعديل أحادي الأليل (غير متجانس الزيجوت) متوسط نسبة γ/β مقاسة بمقدار 19% و13% للتجارب 1 و2، على التوالي، والمستعمرات من النوع غير المعالج 14% و13% للتجارب 1 و2، على التوالي. في اختبار t ثنائي الطرفين بتصحيح وفق Welch، تكون قيمة P الخاصة بالمقارنة بين "النوع متجانس الزيجوت مقابل النوع غير المعالج" <0.0001 لكلتا التجربتين 1 و2؛ تكون قيمة P الخاصة بالمقارنة بين "النوع غير متجانس الزيجوت مقابل النوع متجانس الزيجوت" بمقدار <0.0001 للتجربة 1 و0.0025 للتجربة 2؛ وتكون قيمة P الخاصة بالمقارنة بين " النوع غير متجانس الزيجوت مقابل النوع غير المعالج" بمقدار 0.02 و0.0002 لكلتا التجربتين 1 و2، على التوالي. في الرسم البياني أدناه (الشكل 13)، يتم الرسم التخطيطي لبيانات نسبة جلوبين γ/β و γ/α لجميع المستعمرات التي تم اختبارها، فرزها بواسطة فئة النمط الجيني من أليلات معزز شبيه بالكريات الحمر من BCL11A.

يتم في هذا الطلب تضمين جميع براءات الاختراع، طلبات براءات الاختراع والمنشورات الموصوفة في هذا الطلب كمراجع بأكملها.

على الرغم من أنه تم توفير الكشف ببعض التفصيل عن طريق التوضيح والأمثلة من أجل أغراض توضيح الإدراك، سيكون من الواضح بالنسبة لذوي الخبرة في المجال أن التغييرات والتعديلات المختلفة يمكن أن يتم تنفيذها دون الخروج عن روح الكشف أو مجاله. وفقاً لذلك، ينبغي ألا يتم تفسير صور الوصف والأمثلة السابقة على أنها مقيدة.

قائمة المتواليات

<110> SANGAMO BIOSCIENCES, INC. سانجامو بيوساينسز، إنك.

<120> تنظيم يتدخل فيه إنزيم نوكلياز للتعبير الوراثي الجيني

<130> 8328-0132.40

<140> PCT/US2016/032049

<141> 2016-05-12

<150> 62/303,595

<151> 2016-03-04

<150> 62/160,396

<151> 2015-05-12

<160> 38

<170> PatentIn الإصدار 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي أوليجونولكليوتيد

<400> 1

aaagcaactg ttagcttgca ctagacta 28

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 2

Asp Gln Ser Asn Leu Arg Ala

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 3

Arg Pro Tyr Thr Leu Arg Leu

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 4

Ser Gly Tyr Asn Leu Glu Asn
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 5

Thr Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 6

Ala Gln Cys Cys Leu Phe His

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 7

Ser Thr Gly Asn Leu Thr Asn

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 8

Ser Arg Gly Ala Leu Lys Thr

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 9

Arg Asn Phe Ser Leu Thr Met

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 10

Ser Asn Gly Asn Leu Arg Asn

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 11

Ser Ser Tyr Asn Leu Ala Asn

1 5

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي أوليجونولكليوتيد

<400> 12

cacaggctcc aggaagggtt tggcctct 28

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 13

Arg Ser Asp His Leu Thr Gln

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 14

Gln Ser Gly His Leu Ala Arg

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 15

Gln Lys Gly Thr Leu Gly Glu

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 16

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 17

Arg Arg Asp Asn Leu His Ser

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 18

Arg His Arg Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 19

Arg Asn Asp His Arg Thr Thr

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 20

Gln Lys Ala His Leu Ile Arg

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 21

Arg Gly Arg Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 22

Gln Arg Ala His Leu Thr Arg

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 23

His Arg Asn Thr Leu Val Arg

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 24

Gln Ser Gly Thr Arg Asn His

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 25

Leu Lys Arg Thr Leu Lys Arg

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 26

Ser Ser Ser Asn Leu Thr Asn

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 27

Ser Ser Ser Asn Leu Gly Asn

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 28

Ser Arg Ser Ala Leu Arg Val

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 29

Arg Ser Arg Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 30

Phe Arg Gln Thr Arg Ala Arg

1 5

<210> 31

<211> 26

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

ببتيد

<400> 31

His Thr Lys Ile His Leu Arg Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser Lys Ser

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Glu Glu Lys

20 25

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 32

His Thr Lys Ile His Leu Arg Gly Ser Ile Ser Arg Ala Arg Pro Leu
1 5 10 15

Asn Pro His Pro Glu Leu Glu Glu Lys
20 25

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي ببتيد

<400> 33

His Thr Lys Ile His Leu Arg Gly Ser Ile Ser Arg Ala Arg Pro Leu
1 5 10 15

Asn Pro His Pro Glu Leu Glu Glu Lys
20 25

<210> 34

<211> 26

<212> PRT

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي
ببتيد

<400> 34

His Thr Lys Ile His Leu Arg Gly Ser Tyr Ala Pro Met Pro Pro Leu
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ser Pro Glu Leu Glu Glu Lys
20 25

<210> 35

<211> 43

<212> DNA

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

بادئ

<220>

<221> قاعدة معدلة

<222> (21)..(24)

<223> a, c, t, g, غير معروف أو أخرى

<400> 35

acacgacgct cttccgatct nnnnagtcct cttctacccc acc 43

<210> 36

<211> 42

<212> DNA

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي

بادئ

<400> 36

gacgtgtgct cttccgatct ctactcttag acataacaca cc 42

<210> 37

<211> 93

<212> DNA

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي أوليجونولكليوتيد

<220>

<221> قاعدة معدلة

<222> (1)..(4)

<223> a, c, t, g, غير معروف أو أخرى

<220>

<221> قاعدة معدلة

<222> (68)..(72)

<223> a, c, t, g, غير معروف أو أخرى

<400> 37

nnnnagtagt gtgtgcccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct 60

tttagtcnnn nnagtgtgga aaatctctag cag 93

<210> 38

<211> 93

<212> DNA

<213> متوالية اصطناعية

<220>

<223> وصف متوالية اصطناعية: تخليقي أوليجونولكليوتيد

<220>

<221> قاعدة معدلة

<222> (1)..(4)

<223> a, c, t, g, غير معروف أو أخرى

<220>

<221> قاعدة معدلة

<222> (26)..(30)

<223> a, c, t, g, غير معروف أو أخرى

<400> 38

nnnnctgcta gagattttcc acactnnnnn gactaaaagg gtctgaggga tctctagtta 60

ccagagtcac acaacagacg ggcacacact act 93

عناصر الحماية

1- بروتين اصبع الزنك الذي يرتبط مع موقع مستهدف في منطقة المعزز في BCL11A البشري، حيث بروتين اصبع الزنك يتضمن 4، 5 أو 6 أصابع والتي تسمى من F1 إلى F4 ، من F1 إلى F5 أو من F1 إلى F6 ، حيث ان كل اصبع يتضمن منطقة حلزون تمييز والتي تميز موضع فرعي مستهدف حيث يتم اختيار البروتين من المجموعة التي تتكون من

(1) بروتين يتضمن مناطق حلزون تمييز كما يلي:

F1: STGNLTN (بيان تتابع رقم: 7)؛

F2: TSGSLTR (بيان تتابع رقم: 5)؛

F3: DQSNLRA (بيان تتابع رقم: 2)؛ و

F4: AQCCLFH (بيان تتابع رقم: 6)؛

(2) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: DQSNLRA (بيان تتابع رقم: 2)؛

F2: RPYTLRL (بيان تتابع رقم: 3)؛

F3: SRGALKT (بيان تتابع رقم: 8)؛

F4: TSGSLTR (بيان تتابع رقم: 5)؛

F5: DQSNLRA (بيان تتابع رقم: 2)؛ و

F6: AQCCLFH (بيان تتابع رقم: 6)؛

(3) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: DQSNLRA (بيان تتابع رقم: 2)؛

F2: RNFSLTM (بيان تتابع رقم: 9)؛

F3: SNGNLRN (بيان تتابع رقم: 10) أو SSYNLAN (بيان تتابع رقم: 11)؛

F4: TSGSLTR (بيان تتابع رقم: 5)؛

F5: DQSNLRA (بيان تتابع رقم: 2)؛ و

F6: AQCCLFH (بيان تتابع رقم: 6)؛

(4) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: RSDHLTQ (بيان تتابع رقم: 13)؛

F2: QSGHLAR (بيان تتابع رقم: 14)؛

F3: QKGTLGE (بيان تتابع رقم: 15)؛

F4: RHRDLSR (بيان تتابع رقم: 18)؛ و

F5: RRDNLHS (بيان تتابع رقم: 17)؛

(5) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: RNDHRTT (بيان تتابع رقم: 19)؛

F2: QKAHLIR (بيان تتابع رقم: 20)؛

F3: QKGTLGE (بيان تتابع رقم: 15)؛

F4: LKRTLKR (بيان تتابع رقم: 25)؛ و

F5: RRDNLHS (بيان تتابع رقم: 17)؛

(6) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: RSDHLTQ (بيان تتابع رقم: 13)؛

F2: QRAHLTR (بيان تتابع رقم: 22)؛

F3: QKGTLGE (بيان تتابع رقم: 15) أو QSGTRNH (بيان تتابع رقم: 24)؛

F4: HRNTLVR (بيان تتابع رقم: 23)؛ و

F5: RRDNLHS (بيان تتابع رقم: 17)؛

(7) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: RSDHLTQ (بيان تتابع رقم: 13)؛

F2: QKAHLIR (بيان تتابع رقم: 20)؛

F3: QKGTLGE (بيان تتابع رقم: 15) أو QSGTRNH (بيان تتابع رقم: 24)؛

F4: RGRDLSR (بيان تتابع رقم: 21)؛ و

F5: RRDNLHS (بيان تتابع رقم: 17)؛ و

(8) بروتين يتضمن مناطق حلزون التمييز كما يلي:

F1: RSDHLTQ (بيان تتابع رقم: 13)؛

F2: QSGHLAR (بيان تتابع رقم: 14)؛

F3: QSGTRNH (بيان تتابع رقم: 24)؛

F4: QSSDLSR (بيان تتابع رقم: 16)؛ و

F5: RRDNLHS (بيان تتابع رقم: 17).

2- بروتين اندماج fusion protein يتضمن بروتين اصبع الزنك zinc finger protein وفقا لعنصر الحماية 1 ونطاق تنشيط نسخ أو نطاق كبح للنسخ.

3- بروتين اندماج fusion protein يتضمن بروتين اصبع الزنك zinc finger protein وفقا لعنصر الحماية 1 و نطاق انقسام cleavage.

4- بولي نيوكليوتيدات polynucleotides واحدة أو أكثر يقوم بتشفير البروتين الاندماج fusion protein وفقا لعنصر الحماية 3.

5- خلية معزولة معدلة جينيا A genetically modified isolated cell تشتمل واحدة أو أكثر من البولي نوكليوتيدات polynucleotides وفقا لعنصر الحماية 4.

6- خلية معزولة معدلة جينيا A genetically modified isolated cell وفقا لعنصر الحماية 5، حيث أن الخلية عبارة عن خلية جذعية stem أو خلية بادرة precursor .

7- خلية معزولة معدلة جينيا A genetically modified isolated cell وفقا لعنصر الحماية 6، حيث أن الخلية عبارة عن خلية بشرية human cell.

8- خلية معزولة معدلة جينيا A genetically modified isolated cell وفقا لعنصر الحماية 5، حيث أن التعديل الجينومي genomic modification يتم اختياره من المجموعة التي تتكون من إدخالات insertions، إزالات وتوليفات منها.

9- خلية معزولة معدلة جينيا A genetically modified isolated cell وفقا لعنصر الحماية 8، حيث تظهر الخلية زيادة في التعبير عن جاما و/أو جلوبين بيتا gamma and/or beta globin مقارنة بالخلية التي بدون التعديل الجينومي genomic modification.

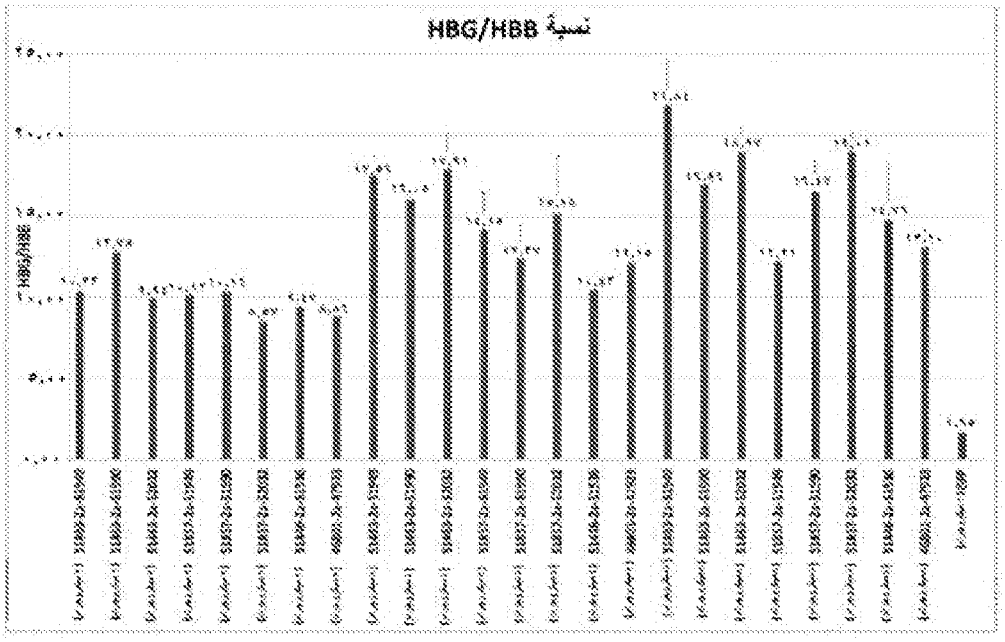
10- تركيب صيدلي pharmaceutical composition يتضمن بروتين الاندماج fusion protein وفقا لعنصر الحماية 3.

11- تركيب صيدلي pharmaceutical composition يتضمن خلية أو سلالة خلية معدلة جينيا يتم إنتاجها من الخلية وفقاً لعنصر الحماية 8.

12- تركيب صيدلي pharmaceutical composition وفقا لعنصر الحماية 11، يتضمن أيضًا خلايا معدلة جينيا متمايزة بشكل جزئي أو كلي مشتقة من الخلية أو سلالة خلية.

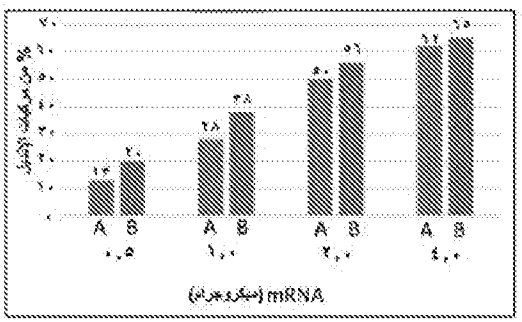
13- تركيب صيدلي pharmaceutical composition وفقا لعنصر الحماية 11، حيث أن الخلايا المعدلة جينيا متمايزة جزئيا أو بالكامل تظهر تعبيرا متزايدا عن جاما و/أو جلوبين بيتا gamma and/or beta globin بالمقارنة بالخلية التي بدون التعديل الجينومي genomic modification.

14- تركيب صيدلي pharmaceutical composition يشتمل على واحد أو أكثر من البولي نيوكليوتيدات polynucleotides وفقا لعنصر الحماية 4.



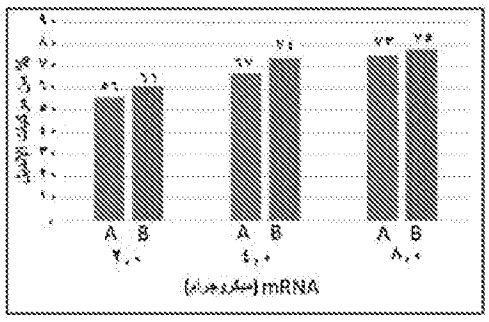
شكل ١

شكل ٢أ



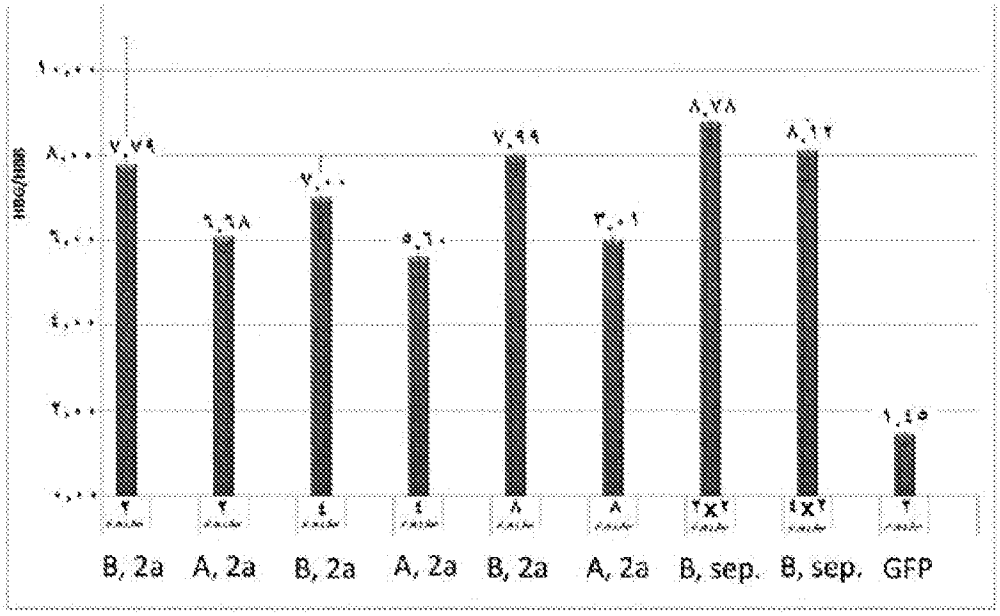
% من مركبات الإنديل				
mRNA المستخدم/الكتاكل	٠,٥	١,٠	٢,٠	٤,٠
A: S1446_2a_S1536	١٢,٨	٢٨,٢	٥٠,٨	٦٢,٢
B: S1857_2a_S1948	٢٠,٨	٣٨,١	٥٦,٠	٦٤,٢

شكل ٢ب



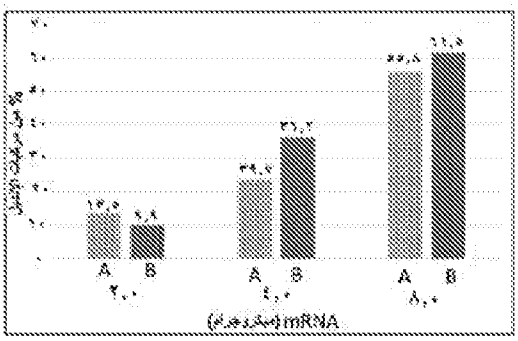
% من مركبات الإنديل			
mRNA المستخدم/الكتاكل	٢,٠	٤,٠	٨,٠
A: S1446_2a_S1536	٥٦,٤	٦٦,٧	٧٤,٥
B: S1857_2a_S1948	٦١,٢	٧٣,٩	٧٨,٣

شكل ٢



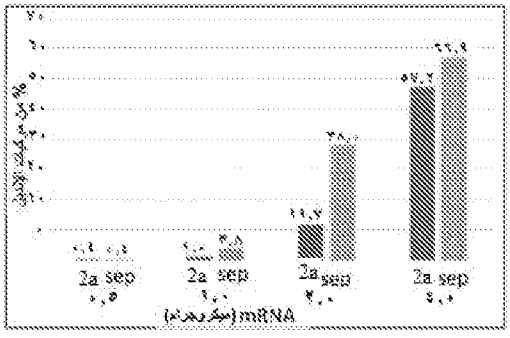
شكل ٣

شكل ٤أ



% من مركبات الإنبل			
mRNA (المستخدم/التفاعل)	٢,٠	١,٠	٠,٥
A: S1486_2a_S1536	١٣,٥	٢٤,٧	٥٥,٨
B: S1857_2a_S1949	٨,٨	٣٢,٢	٦١,٥

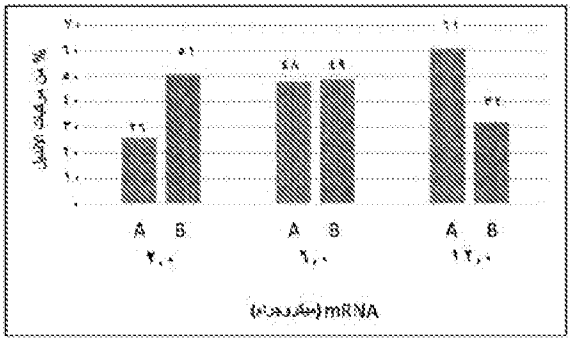
شكل ٤ب



% من مركبات الإنبل				
mRNA (المستخدم/التفاعل)	٠,٥	١,٠	٢,٠	٤,٠
B: S1857_2a_S1949	١,٤	٣,٥	١٩,٣	٥٤,٢
B: S1857; S1949 sep	١,٤	٣,٨	٢٨,٠	٦٦,٩

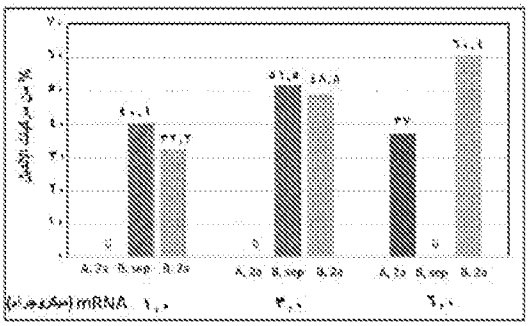
شكل ٤

شكل ٥أ



% من مركبات الإنتيل			
mRNA المستخدم/التفاعل	٢,٠	٦,٠	١٢,٠
A: S1446_2a_S1536	٢٥,٥	٤٨,٠	٢٦,٥
B: S1857_2a_S1949	٥٠,٨	٤٩,٥	٣٣,٥

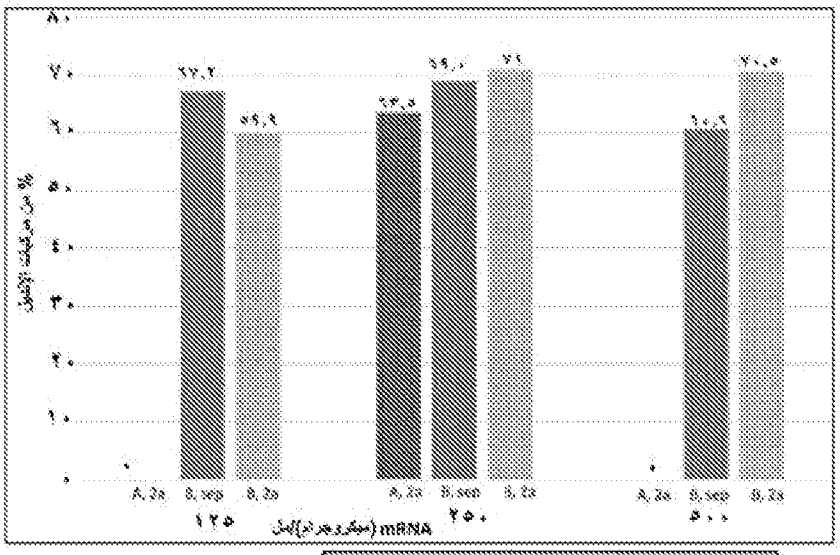
شكل ٥ب



% من مركبات الإنتيل			
mRNA المستخدم/التفاعل	١,٠	٣,٠	٦,٠
A: S1446_2a_S1536	nt	nt	٣٢
B: S1857 + S1949, sep	٤٠,٠	٥١,٥	nt
B: S1857_2a_S1949	٣٣,٢	٤٨,٥	٦٠,٠

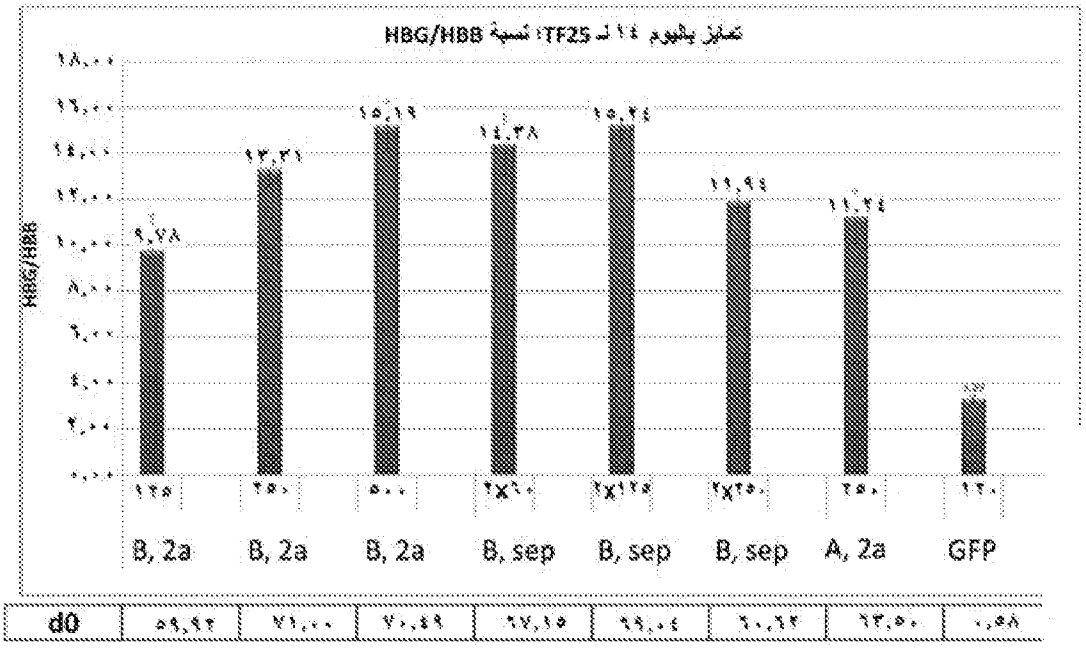
-Nt غير مختبر

شكل ٥

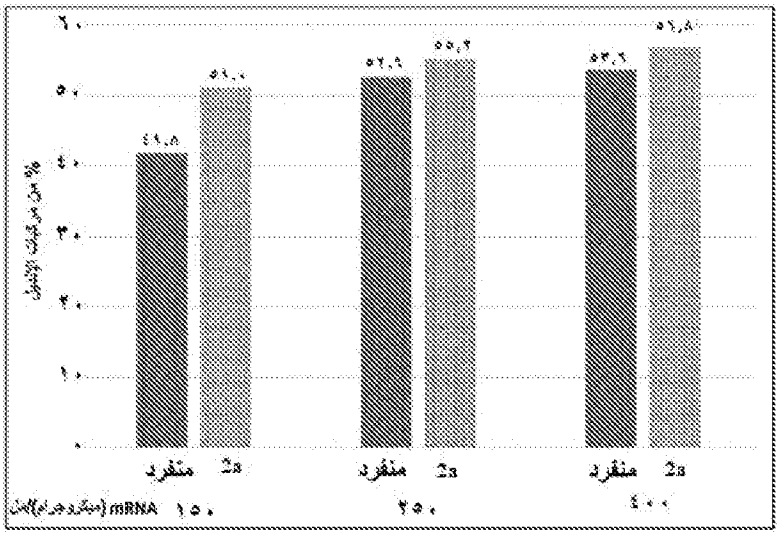


% من مرفيات الإنتيل			
mRNA المستخدم/لتر	١٢٥	٢٥٠	٥٠٠
A: S1446_2a_S1535	ND	٦٣,٥	ND
B: S1857 + S1949, sep	٦٩,٢	٦٩,٠	٦٠,٩
B: S1857_2a_S1949	٦٩,٤	٧١	٧٠,٥

شكل ٢

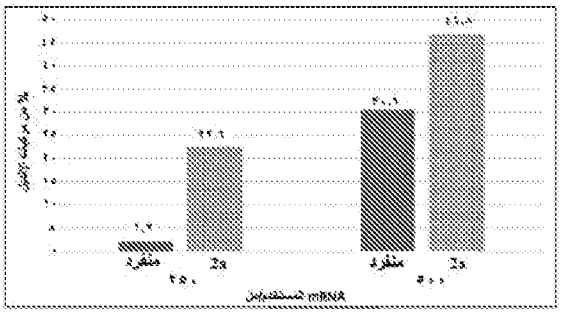

تمايز يوم ١٤ لـ TF25: نسبة HBG/HBB
HBG/HBB
١٨,٠٠
١٦,٠٠
١٤,٠٠
١٢,٠٠
١٠,٠٠
٨,٠٠
٦,٠٠
٤,٠٠
٢,٠٠
٠,٠٠
٩,٧٨
١٣,٣١
١٥,١٩
١٤,٣٨
١٥,٢٤
١١,٩٤
١١,٢٤
١٢٥
٢٥٠
٥٠٠
٢X٢٠٠
٢X١٢٥
٢X٢٥٠
٢٥٠
١٢٠
B, 2a
B, 2a
B, 2a
B, sep
B, sep
B, sep
A, 2a
GFP
d0
٥٩,٩٢
٧١,٠٠
٧٠,٤٩
٦٧,١٥
٦٦,٠٤
٦٠,٦٢
٦٣,٥٠
٠,٥٨

شكل٧



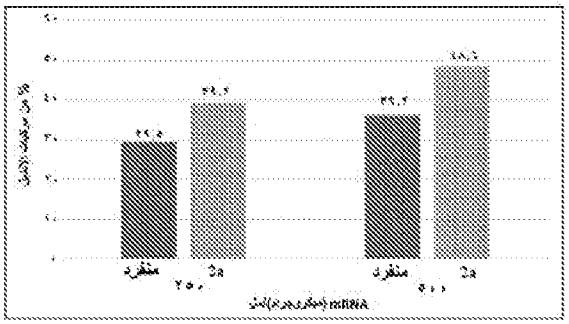
% من مركبات الإنتين			
mRNA المستخدم(نانو	١٥٠	٢٥٠	٤٠٠
B: 51857 + 51949, sep	٤١,٨	٥٢,٩	٥٣,٦
B: 51857_2a_51949	٥٠,٠	٥٥,٢	٥٦,٨

شكل ٨



B: 51857 + 51949, sep	٢٠٢	٣٠٫٩
B: 51857_2a_51949	٢٢٫٦	٤٦٫٨

شكل ٩أ

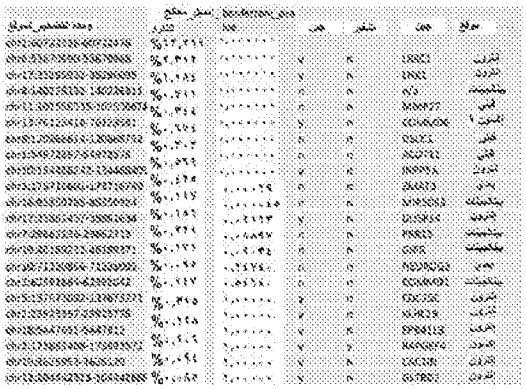


B: 51857 + 51949, sep	٢٢٫٥	٣٦٫٢
B: 51857_2a_51949	٢٩٫٠	٥٠٫٩

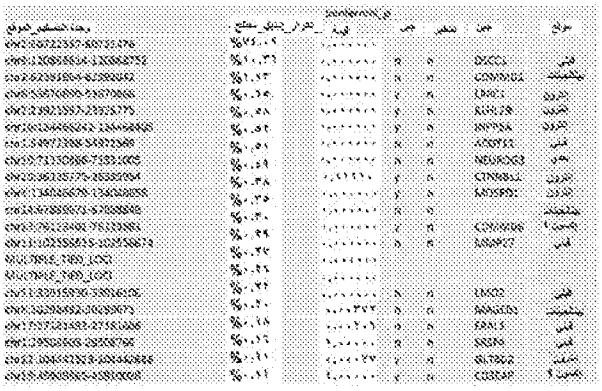
شكل ٩ب

شكل ٩

شكل ١٠أ

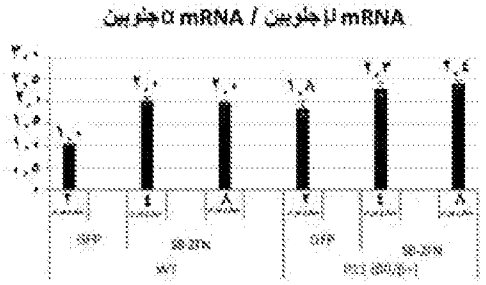


شكل ١٠ب

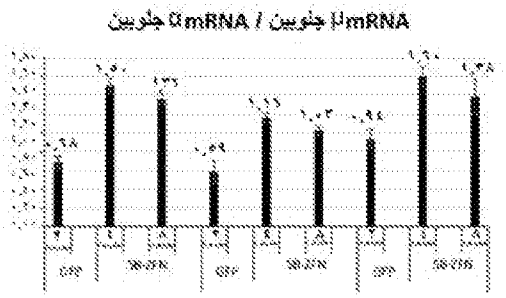


شكل ١٠

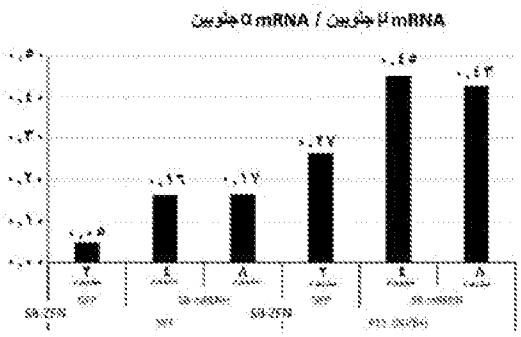
شکل ۱۱أ



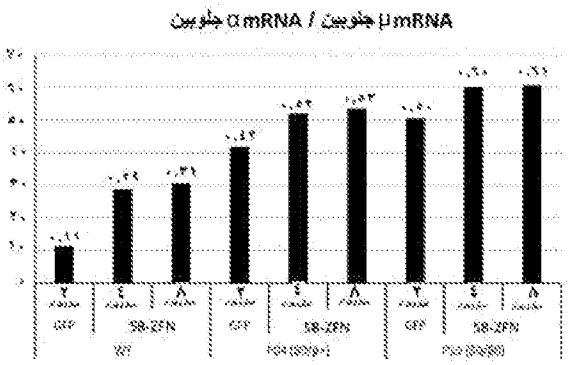
شکل ۱۱ب



شکل ۱۱

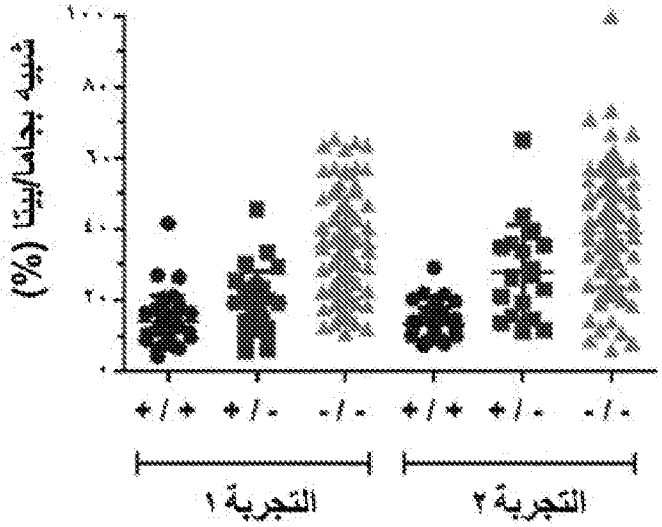


شكل ١٢أ



شكل ١٢ب

شكل ١٢



شكل ١٣

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشـرط تسـديد المقابل المالي السـنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سـقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA