

ÖZET**ADRENOLOKODİSTROFİ VE ADRENOMİYELONOROPATİ İÇİN GEN TERAPİ
VEKTORLERİ**

- 5 Buluş, bir lentiviral vektör olup, bir sol (5') HIV-1 LTR; bir Psi (Ψ) paketleme sinyali; bir merkezi polipürin yolu/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir RRE retroviral dışa aktarım ögesi; ve negatif kontrol bölgesi silinmiş, dl587rev primer bağlama bölgesi ornatılmış (MND) başlatıcısı bir insan ATP bağlayan kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir miyeloproliferatif sarkom virüsü güçlendiricisi; bir sağ (3') kendi
- 10 kendini inaktive eden (SIN) HIV-1 LTR; ve sentetik bir tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı; içermektedir.

İSTEMLER

1. Bir lentiviral vektör olup,
 - (a) bir sol (5') HIV-1 LTR;
 - (b) bir Psi (Ψ) paketleme sinyali;
 - 5 (c) bir merkezi polipürin yolu/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP);
 - (d) bir RRE retroviral dışa aktarım ögesi; ve
 - (e) negatif kontrol bölgesi silinmiş, dl587rev primer bağlama bölgesi ornatılmış (MND) başlatıcısı bir insan ATP bağlayan kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir miyeloproliferatif sarkom virüsü güçlendiricisi;
 - 10 (f) bir sağ (3') kendi kendini inaktive eden (SIN) HIV-1 LTR; ve
 - (g) sentetik bir tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı;

çermekte olup; **özelliği**; içerisinde lentiviral vektör, bir transkripsiyon sonrası transkripsiyon düzenleyici öge (WPRE) içermemesidir.
- 15 2. Bir memeli hücresi olup, **özelliği**; istem 1'e göre bir lentiviral vektör içermesidir.
3. Bir paketleme hücresi olup, **özelliği**; gag kodlayan bir birinci polinükleotit, pol kodlayan bir ikinci polinükleotit, env kodlayan bir üçüncü polinükleotit, ve istem 1'e göre bir lentiviral vektör içermesidir.
4. Bir üretici hücre olup, **özelliği**; istem 1'e göre bir lentiviral vektör içermesidir.
- 20 5. Bir vektör parçacığı olup, **özelliği**; istem 4'ün üretici hücresi tarafından üretilmiş olmasıdır.
6. Bir konakçı hücre olup, istem 1'e göre lentiviral vektör tarafından kalıt aktarılmış olup, **özelliği**; içerisinde hücrenin bir somatik kök hücresi, bir ata hücre ya da bir hematopoietik kök hücre olması, ve içerisinde hücrenin bir insan embriyonik kök hücresi olmamasıdır.
- 25

7. Bir hematopoietik kök ya da ata hücre olup, istem 1'e göre bir vektör tarafından kalıt aktarılmış olup, **özelliği**; adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavi eden bir metotta kullanım için olmasıdır.
- 5 8. İstem 7'nin kullanımına göre bir hematopoietik kök ya da ata hücre olup, **özelliği**; içerisinde hematopoietik kök ya da ata hücrenin kaynağının kemik iliği, göbek kordonu kanı ya da periferel dolaşım olmasıdır.
9. İstem 9 ya da istem 10'un kullanımına göre hematopoietik kök ya da ata hücre olup, **özelliği**; içerisinde hematopoietik kök ya da ata hücrenin bir otolog CD34+ hematopoietik kök hücre olmasıdır.
- 10 10. İstem 1'e göre bir lentiviral vektör olup, gen terapisinde kullanım için olup, **özelliği**; içerisinde gen terapisinin adrenolökodistrofiyi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavi etmek ya da önlemek için olmasıdır.

TARİFNAME

ADRENOLOKODİSTROFİ VE ADRENOMİYELONOROPATİ İÇİN GEN TERAPİ VEKTORLERİ

BULUŞUN ARKA PLANI

5 Buluşun Teknik Alanı

Mevcut buluş genel olarak gen terapisi vektörleri ile ilgilidir. Özel olarak, mevcut buluş, adrenolökodistrofi ve adrenomiyelonöropati için gen terapisi sağlayan lentiviral vektörlere ilişkindir.

İlgili Tekniğin Tarifi

10 Çocukluk çağı serebral adrenolökodistrofi (CCALD), tedavi edilmeyen, tanıdan sonra 5 yıllık bir ortalama içinde bir bitkisel hayata ve nihayetinde ölüme neden olan erkeklerde (başlangıç yaşı 7; dağılım 3 ila 15 yıl arası) çok nadir, bazen hızlı ilerleyen, x'e bağlı genetik nörolojik bir hastalıktır.

15 CCALD sıklıkla başlangıçta Addison hastalığı olarak karşımıza çıkar, ancak tanı genellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRI) doğrulayıcı serebral miyelin kaybı bulguları ile birlikte, dikkat, düşünme, konsantrasyon ve diğer serebral fonksiyonlarda "ani" azalmaya dayanır. Miyelin kaybından önce, hastanın beyninin MRI normaldir ve nörogelişimsel anormallikler yoktur. Klinik seyir ilk başta "yavaş" olabilir, ancak beyindeki yaygın miyelin kaybı ile birlikte hızla ilerleyen ve geri döndürülemez hale gelebilir. "Yavaş" ve "ani" terimleri, 20 miyelin kaybı süresinin gerçekten bilinmediği, fakat bilişsel ve motor fonksiyondaki hızlı düşüşün herhangi bir zamanda ve bilinmeyen nedenlerden kaynaklanabileceğinden görecelidir. Gerçekten de MRI değişiklikleri semptomlardan önce gelir ve hastalığın çok az klinik belirtisi olduğu bir zamanda yaygın miyelin kaybı ile gösterişli bir şekilde anormal olabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde x'e bağlı adrenolökodistrofi (ALD) insidansı yaklaşık 25 olarak %35'i CCALD geliştiren yaklaşık olarak 1:21,000 erkek doğumdur; her yıl yaklaşık 35 ila 40 arasındaki çocuğa CCALD tanısı konmaktadır. Hastalığın nedeni, bir disfonksiyonel adrenolökodistrofi proteini (ALDP) gen ürününe ya da bunun yokluğuna yol açan ATP bağlayıcı kaset, alt aile D (ALD), üye 1 (ABCD1) geninin bir mutasyonudur. ALDP hücresel peroksizomlara lokalize olur, burada çok uzun zincirli yağ asitlerinin (VLCFA) (zincir 30 uzunlukları > 20 karbon), daha kısa yağ asitlerine bozunma işleminde hücresel yapıyı ve işlevi korumak için kullanılır.

CCALD'nin merkezi sinir sistemi (CNS) belirtilerinin patofizyolojisi tam olarak anlaşılammıştır, fakat miyelin kaybı, yetersiz ALDP beyin mikroglıyasındaki süreci desteklemediği için, metabolize edilemeyen VLCFA'nın bir lokal birikimi sonucunda ortaya çıkar. Hastalığın hızla ilerleyen fazına, muhtemelen VLCFA tarafından hücresele proteinlerin asilasyonunun neden olduğu iltihaplanma neden olur, bu da miyelin kaybını artırır. CCALD'nin hızla ilerleyen fazı, aylar içinde normal fonksiyondan ciddi biçimde özürlü duruma geçen bir çocuğa neden olabilir.

Mevcut tek tedavi, fonksiyonel ALDP üreten hücrelerin temin edilmesi için allojeneik hematopoitik kök hücre transplantasyonudur (HCT). Beyin mikroglıyası kemik iliğinden türetildiği için, fonksiyonel ALDP üreten hücreler kullanılarak tam olarak ilgili donör insan kök hücre transplantasyonu potansiyel olarak miyelin kaybının ilerlemesini iyileştirebilir ya da durdurabilir. Bununla birlikte, allojenik HCT'nin hastalığı stabilize etmesi 12 ila 18 ay arasında sürdüğu için ve hastalığın ilerleyici niteliğinden dolayı, tanıya konulduktan sonra mümkün olan en kısa sürede transplantasyon yapılmalıdır. Bu, bazen ilgili ya da ilgisiz eşleştirilmiş kemik iliği kök hücre donörleri bulmak için gerekli hazırlık süreleri nedeni ile sorunludur. Allojeneik kök hücrelerin kullanımı ayrıca greft yetmezliği ve akut ve kronik greft versus host hastalığının (GvHD) gelişmesi riskini de beraberinde getirir. Bu komplikasyonlar ölüme yol açabilir ve ilgisiz donörler allojeneik hematopoitik kök hücreler için bir kaynak olarak kullanıldığında insidans bakımından artar.

ALDP yerine koyma tedavisinin bir başka kaynağı da, daha tipik olarak kısmen uyumlu kordon kanı hücresele transplantasyonlarının eşleştirilmesidir. Kordon kanı kök hücrelerinin (CBSC) kullanımı, bir greft başarısızlığı riski ve uzatılmış transfüzyon desteğini gerektiren envanterde uzamış bir süre nedenlerinden dolayı sorunludur. Gerçekten de, allojenik HCT'nin tüm formları, % 10 ila % 15 arasında bir oranda transplantasyon ile ilişkili mortalite riskini ve % 30'a varan bir oranda da kronik greft versus host hastalığı riskini içerir. Biffi et al., Hum Mol Genet., 2011,20(R1): R42-53, lentiviral vektörler kullanılarak lökodistrofileri tedavi etmek için bir gen terapisi stratejisini açıklar. WO 02/087341, lentiviral gen terapisi vektörlerinde kullanılmak üzere retroviral LTR'leri açıklar.

Dolayısı ile, teknikte daha güvenli ve daha etkili adrenolökodistrofi terapilerine ihtiyaç vardır. Mevcut buluş, bu ve diğer problemlere çözümler sağlar.

KISA ÖZET

Dolayısı ile, bu tarifname boyunca çeşitli yerlerde "bir yapılanmada" veya "bir yapılanmada" ifadelerin bulunması, hepsinin aynı yapılanmaya değinmesini gerektirmez. Ayrıca, belirli

özellikler, yapılar ya da karakteristikler, bir ya da daha fazla yapılanmada uygun herhangi bir şekilde birleştirilebilir.

Mevcut buluş, aşağıdakileri içeren bir lentiviral vektör ile ilgilidir: (a) bir sol (5') HIV-1 LTR; (b) bir Psi (Ψ) paketleme sinyali; (c) bir merkezi polipürin yolu/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); (d) bir RRE retroviral dışarı aktarım elemanı; ve (e) negatif kontrol bölgesi silinmiş, d1587rev primer bağlama bölgesi ornatılmış (MND) başlatıcısı bir insan ATP bağlayan kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir miyeloproliferatif sarkom virüsü güçlendiricisi; (f) bir sağ (3') kendi kendini inaktive eden (SIN) HIV-1 LTR; ve (g) sentetik bir tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı olup; içerisinde lentiviral vektör, bir transkripsiyon sonrası transkripsiyon düzenleyici öge (WPRE) içermez.

Mevcut buluş ayrıca bahse konu lentiviral vektörünü içeren bir memeli hücresi ile ilgilidir.

Mevcut buluş ayrıca aşağıdakileri içeren bir paketleme hücresi ile ilgilidir: bir gag kodlayan bir birinci polinükleotit, pol kodlayan bir ikinci polinükleotit, env kodlayan bir üçüncü polinükleotit ve bahse konu lentiviral vektör.

15 Mevcut buluş ayrıca bahse konu lentiviral vektörünü içeren bir üretici hücre ile ilgilidir.

Mevcut buluş ayrıca bahse konu üretici hücrenin ürettiği bir vektör parçacığı ile ilgilidir.

Mevcut buluş ayrıca bahse konu lentiviral vektör ile kalıt aktarılmış bir konakçı hücre ile ilgili olup, içerisinde hücre bir somatik kök hücre, bir ata hücre ya da bir hematopoietik kök hücre olup, içerisinde hücre bir insan embriyonik kök hücresi değildir.

20 Mevcut buluş, adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatinin tedavi edilmesine yönelik bir metotta kullanılmak üzere bahse konu vektör ile aktarılan hematopoietik bir kök ya da ata hücre ile ilgilidir.

Mevcut buluş ayrıca gen terapisinde kullanım için bahse konu lentiviral vektör ile ilgili olup, içerisinde gen terapisi adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavi eder ya da önler.

Çeşitli örneklerde, mevcut açıklama kısmen aşağıdakileri içeren bir vektör tasarlamakta olup: bir sol (5') retroviral LTR; bir merkez polipürin kanalı/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir retroviral dışarı aktarım ögesi; bir ATP bağlayıcı kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir mikrogliyal hücrede aktif olan bir başlatıcı; ve bir sağ (3') retroviral LTR; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesini (WPRE) içermez.

Ozel örneklerde, vektör bir lentivirüs vektörüdür.

İlgili örneklerde, lentivirüs HIV'dir.

Daha özel örneklerde, lentivirüs HIV-1'dir.

Bazı örneklerde, 5' LTR'nin başlatıcısı bir heterolog başlatıcı ile değiştirilir.

- 5 Ek örneklerde, heterolog başlatıcı bir sitomegalovirüs (CMV) başlatıcısı, bir Rous Sarkom Virüsü (RSV) başlatıcısı ya da bir Simian Virüs 40 (SV40) başlatıcısıdır.

Ek özel örneklerde, heterolog başlatıcı bir CMV başlatıcısıdır.

Başka örneklerde, 5' LTR ya da 3' LTR bir lentivirüs LTR'sidir.

Diğer örneklerde, 5' LTR ve 3' LTR, lentivirüs LTR'leridir.

- 10 Belirli özel örneklerde, lentivirüs HIV-1'dir.

Ozel örneklerde, 3' LTR bir ya da daha fazla modifikasyon içerir.

Belirli özel örneklerde, 3' LTR bir ya da daha fazla delesyon içerir.

Ek örneklerde, 3' LTR kendi kendini inaktive eden (SIN) bir LTR'dir.

Bazı örneklerde, retroviral dışarı aktarım ögesi bir rev tepkisi ögesidir (RRE).

- 15 Diğer örneklerde, cPPT/ FLAP, HIV-1'dir.

Belirli örneklerde, başlatıcı bir miyeloproliferatif sarkom virüsü güçlendiricisi, negatif kontrol bölgesi delesyona uğramış, dl587rev primer bağlama bölgesi ornatılmış (MND) başlatıcıyı ya da bunun transkripsiyonel olarak aktif parçasını içerir.

Ozel örneklerde, ABCD1 polipeptidini kodlayan polinükleotit bir cDNA'dır.

- 20 İlgili örneklerde, cDNA optimize edilmiş bir Kozak sekansını içerir.

Belirli örneklerde, optimal Kozak sekansı (GCC)RCCATGG olup, içerisinde R bir pürindir (A ya da G).

Ozel örneklerde, polinükleotit insan ABCD1 polipeptidini kodlar.

- 25 Çeşitli örneklerde, bu açıklama kısmen, aşağıdakileri içeren bir lentiviral vektörü tasarlamakta olup: bir sol (5') LTR; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini kodlayan bir

polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; bir sağ (3') LTR; ve bir poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesi (WPRE) içermez.

Özel örneklerde, lentiviral vektör bir Psi (XF) paketleme sinyali içerir.

- 5 Belirli örneklerde, poliadenilasyon sekansı, bir bovin büyüme hormonu poliadenilasyon ya da sinyal tavşanı β -globin poliadenilasyon sekansıdır.

Belirli özel örneklerde, lentiviral vektör, HIV-1'den gelen bir 5' LTR ya da 3' LTR içerir.

Ek örneklerde, 3' LTR bir SIN LTR'dir.

- 10 Çeşitli yapılanmalarda, mevcut buluş, kısmen, aşağıdakileri içeren bir lentiviral vektör tasarlamakta olup: bir sol (5') HIV-1 LTR; bir Psi (Ψ) paketleme sinyali; bir merkezi polipürin yolu/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir RRE retroviral dışarı aktarım elemanı; negatif kontrol bölgesi silinmiş, dl587rev primer bağlama bölgesi ornatılmış (MND) başlatıcısı bir insan ATP bağlayan kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir miyeloproliferatif sarkom virüsü güçlendiricisi; bir sağ (3') kendi kendini inaktive eden
15 (SIN) HIV-1 LTR; ve (g) sentetik bir tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı olup; içerisinde lentiviral vektör, bir transkripsiyon sonrası transkripsiyon düzenleyici öge (WPRE) içermez.

Çeşitli yapılanmalarda, mevcut buluş kısmen, buluşa göre bir vektör içeren bir memeli hücrelerini tasarlar.

- 20 Özel yapılanmalarda, mevcut buluş, kısmen, aşağıdakileri içeren bir paketleme hücresi tasarlanmaktadır: bir gag kodlayan bir birinci polinükleotit, pol kodlayan bir ikinci polinükleotit, env kodlayan bir üçüncü polinükleotit ve buluşa göre bir vektör.

Belirli yapılanmalarda, mevcut buluş kısmen, buluşa göre bir vektör içeren bir üretici hücreyi tasarlar.

- 25 Ek yapılanmalarda, mevcut buluş, kısmen, üretici hücre tarafından üretilen vektör parçacıklarını tasarlar.

- 30 Çeşitli özel örneklerde, mevcut açıklama, kısmen, aşağıdakileri içeren bir vektör tasarlamakta olup: en az bir LTR; bir merkez polipürin kanalı/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir retroviral dışarı aktarım ögesi; ve bir ATP bağlayıcı kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir mikrogliyal hücrede aktif olan bir başlatıcı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesini (WPRE) içermez.

5 Çeşitli belirli örneklerde, bu açıklama kısmen, aşağıdakileri içeren bir vektörü tasarlamakta olup: en az bir LTR; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; bir sağ (3') LTR; ve bir poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesi (WPRE) içermez.

10 Çeşitli ilave örneklerde, bu açıklama kısmen, aşağıdakileri içeren bir vektörü tasarlamakta olup: en az bir SIB HIV-1 LTR; bir Psi (Ψ) paketleme sinyali; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; bir sağ (3') LTR; ve bir tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesi (WPRE) içermez.

Çeşitli yapılanmalarda, mevcut buluş, kısmen vektör tarafından kalıt aktarılmış olan bir konakçı hücreyi tasarlamakta olup, içerisinde konakçı hücre bir somatik kök hücresi, bir ata hücre, ya da bir hematopoietik kök hücresi olup, içerisinde hücre bir insan embroyonik kök hücresi değildir.

15 Özel yapılanmalarda, mevcut buluş ayrıca, kısmen, gen terapisinde kullanım için bahse konu lentiviral vektörler tasarlamakta olup, içerisinde gen terapisi adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavi eder ya da önler.

20 Diğer çeşitli yapılanmalarda, mevcut buluş, kısmen, adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatinin tedavi edilmesine yönelik bir metotta kullanılmak üzere, buluşun bir vektörü ile kalıt aktarılmış olan hematopoietik bir kök ya da ata hücre tasarlanmaktadır.

Belirli yapılanmalarda hücre, bir hematopoietik kök hücredir.

SEKANS TANIMLAYICILARININ KISA AÇIKLAMASI

SEK ID NO: 1 insan ABCD1'ini kodlayan bir cDNA sekansıdır.

SEK ID NO: 2 insan ABCD1'ini kodlayan bir cDNA sekansıdır.

25 SEK ID NO: 3, bir MND başlatıcı polinükleotit sekansıdır.

ÇİZİMLERİN ÇOK SAYIDAKİ GORUNUMLERİNİN KISA TARİFİ

30 Şekil 1, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılan MND-ALD vektör yapılarının şematik haritasını göstermektedir. Tüm vektörler, yüksek seviyeli ekspresyon için MND başlatıcısının kontrolü altında insan ABCD-1 cDNA'sına sahiptir. pLBP100 ve pLBP140'a yapılan güvenlik modifikasyonları şunları içerir: gag kodlama bölgesinde 2 durdurma kodonu, sağ HIV LTR'nin

U3'ünde 400bp'lik bir delesyon ve tavşan β -globin poliA (r β gppA) sinyali. HIV LTR, insan immün yetmezlik tipi-1 virüs uzun terminali tekrarı; Ψ +, paketleme sinyali; cPPT/ kanat, merkezi polipürin yolu; RRE, Rev uyumlu tepki ögesi; ppt, polipürin yolu. pLBP140, mutasyona uğramış (mut6) fakat fonksiyonel, dağ sıçanı hepatit virüsü transkripsiyonel sonrası düzenleyici öge (Δ WPRE) uygulanması ile pLBP100 vektöründen ayrıştır.

Şekil 2, deneylerde pLBP100 ve pLBP140 lentiviral vektörler ve kısa süreli sıvı ve metilselüloz kültürleri ile kalıt aktarımı göstermektedir.

Şekil 3, pLBP100 ve pLBP140 lentiviral vektörler ile kalıt aktarımı takiben kısa süreli sıvı ve metielluloz kültürleri ya da MS5 stromalarını destekleyen uzun vadeli kültürü göstermektedir.

10 Şekil 4, normal insan CD34+ hücrelerinin kalıt aktarımından sonra miyeloid (CFU-GM; Şekil 4A) ve eritroid (BFU-E; Şek.4B) atalarının sayısını göstermektedir. Kalıt aktarımlar, dört ayrı deney içeren pLBP100 (p100) ya da pLBP140 (p140) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

15 Şekil 5, sınırlayıcı seyreltmeyi ve 5 haftalık stromal ko-kültürün, ikincil CFC'lerin sayımı için metilselüloz kültürlerine aktarılmasını takiben LTC-IC'lerin sıklığını ve L-Calc™ programı kullanılarak % 95'lik güven aralıkları ile frekansların tahmin edilmesini göstermektedir.

Şekil 6, kısa süreli atalarda vektör entegrasyonunun verimliliğini göstermektedir. (A) Sıvı kültürde 7.,14., 28., 31. ve 35. günlerde hücrelerde vektör kopya numarası (VCN). (B) Havuzlanmış 14. gün CFC kültürlerinden ortalama VCN.(C) Yüzde vektör pozitif miyeloid kolonileri. Analiz edilen pozitif ve toplam koloni sayıları belirtilmiştir.

20 Şekil 7, kısa süreli atalara karşı uzun süreli (LTC-IC) ataların vektör entegrasyonunun verimliliğini göstermektedir.(A) Havuzlanmış 14. gün CFC kültürlerinden ortalama VCN.(B) Yüzde vektör pozitif miyeloid kolonileri. Analiz edilen pozitif ve toplam koloni sayıları belirtilmiştir.

25 Şekil 8, kalıt aktarılmış hücrelerde akış sitometrisi ile ALD proteini (ALDP) ekspresyonunu göstermektedir. (A1 ve A2) Farklı deneylerden gelen sahte, pLBP100and ve pLBP140 kalıt aktarılmış hücreler için PE floresanını gösteren histogramlar. (B)Yüzde ALDP pozitif hücreler, 7. gün (deneyler 072010 ve 091410), 14. gün (deney 08101010) ve 28. gün (deney 080610). (C) ALDP+ hücreleri arasında ALDP ifadesinin nispi seviyelerini gösteren sahte kontroller üzerinde bir oran olarak MFI.

30 Şekil 9, bir MND-ALD vektör yapısının şematik haritasını göstermektedir. Vektör, yüksek seviyeli ekspresyon için MND başlatıcısının kontrolü altında insan ABCD-1 cDNA'sına sahiptir. HIV LTR, insan immün yetmezlik tipi-1 virüs uzun terminali tekrarı; Ψ +, paketleme

sinyali; cPPT/ kanat, merkezi polipürin yolu; RRE, Rev uyumlu tepki ögesi; ppt, polipürin yolu. Vektör bir WPRE sekansını içermemektedir.

Şekil 10, çeşitli MOI'de p100 ve p140 ile kalıt aktarılmış olan 4496 hücrelerinde VCN'ye karşı sahteye VLCFA'nın düzeltmesinin oranını göstermektedir.

5 DETAYLI TARİFNAME

A. Genel Bakış

Mevcut buluş genel olarak adrenolökodistrofiler ve adrenomiyelonöropatiler için daha güvenli ve daha etkili viral vektörlere ve kalıt aktarılmış hücre terapilerine yöneliktir. Herhangi bir teoriye bağlı kalmak istemeyen Başvuru Sahipleri, ALD'ye sahip erkek çocukların hematopoietik kök hücrelerinin başka şekilde normal olduğunu ve kemik mikroglia kökenli oldukları için, deneklerin hematopoietik kök hücrelerin de yetersiz ABCD1 geninin normal ABDC1 cDNA ile desteklenmesinin beyin mikrogliyasında ALDP seviyelerinin normalleştirilmesine yol açacağını tasarlamışlardır. Bu yüzden, mevcut buluşun vektörleri kullanılarak normal ABCD1 cDNA'sının otolog CD34+ hematopoietik hücrelere ex vivo gen transferi, ardından kemik iliği ablasyonundan sonra transplantasyon, CNS fonksiyonunun stabilizasyonu ve ALD'nin ölümcül etkileri ilişkili olan plazma VLCFA seviyelerinde bir düşüş ile sonuçlanabilir.

Buna göre, hematopoietik yamanma başarısızlığı ve akut ve kronik GvHD'nin yok edilmesinde önemli ölçüde azalmış risk ile hızlı tedaviye izin vereceğinden mevcut buluşun bileşimleri ve metotları, ALD'li erkek çocuklarda tedavide önemli bir tıbbi ilerleme gösterebilir. CNS bozulmasının potansiyel olarak hızlı olması ve HCT ile birlikte görülen hastalık stabilizasyonu için 12 ila 18 arasında beklemek gerektiği için, bu toplulukta kaybedecek hiç zaman yoktur.

Bu buluşun uygulaması, tam tersi belirtilmedikçe, teknikte uzman kişilerce bilinen geleneksel moleküler biyoloji metotları ve rekombinant DNA tekniklerinin birçoğunu aşağıda gösterim amacı ile açıklanmıştır. Bu teknikler literatürde tam olarak açıklanmıştır. Bakınız örnek olarak, Sambrook, et al., *Molecular Cloning:A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning:A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning:A Practical Approach*, vol.I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, ed., 1984).

B. Tanımlar

Başka şekilde tarif edilmediği sürece, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ait olduğu teknikte uzman bir kişi tarafından genel olarak anlaşılan ile aynı anlama sahiptir. Mevcut buluşun amaçları için, aşağıdaki terimler aşağıda tanımlanmıştır.

- 5 Burada kullanıldığı şekli ile "retrovirüs" terimi, genomik RNA'sını bir doğrusal çift sarmallı DNA kopyasına dönüştüren ve daha sonra genomik DNA'sını bir konakçı genomuna kovalent olarak entegre eden bir RNA virüsü anlamına gelir. Retrovirüsler, kısa dimerleşmiş bir bölgeye sahip olan tek sarmallı bir RNA genomunun iki kopyasına sahip olan çok sayıda yirmi eşkenar üçgen yüzlü olmayan, sarılı virüslerden oluşan Retroviridae ailesine aittir.
- 10 Retrovirüsler gen dağıtımı için yaygın bir araçtır (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460). Virüs konakçı genoma entegre edildiğinde, buna bir "provirüs" denir. Provirüs, RNA polimeraz II için bir şablon olarak hizmet eder ve yeni viral parçacıklar üretmek için gerekli olan yapısal proteinleri ve enzimleri kodlayan RNA moleküllerinin ekspresyonunu yönlendirir.

- 15 Tanımlayıcı retrovirüsler şunları içerir, ancak bunlar ile sınırlı değildir: Moloney murin lösemi virüsü (M-MuLV), Moloney murin sarkom virüsü (MoMSV), Harvey murin sarkom virüsü (HaMuSV), murin meme tümörü virüsü (MuMTV), gibbon maymunu lösemi virüsü (GaLV), kedigiller lösemi virüsü (FLV), spumavirüs, Friend murin lösemi virüsü, Murine Kök Hücre Virüsü (MSCV) ve Rous Sarkom Virüsü (RSV) ve lentivirüs.

- 20 Burada kullanılan "lentivirüs" terimi, karmaşık retrovirüslerin bir grubunu (ya da cinsini) belirtir. Tanımlayıcı retrovirüsler şunları içerir, ancak bunlar ile sınırlı değildir: HIV (HIV tip 1 ve HIV tip 2 dahil olmak üzere insan immün yetmezlik virüsü); visna maedi virüs (VMV) virüsü; kaprin artrit ansefalit virüsü (CAEV); at enfeksiyöz anemi virüsü (EIAV); kedigiller immün yetmezlik virüsü (FIV); sığır bağışıklık eksikliği virüsü (BIV); ve simian immün yetmezlik virüsü (SIV). Bir yapılanmada, HIV bazlı vektör omurgaları (yani, HIV cis etkili
- 25 sekans öğeleri) tercih edilir.

Retroviral vektörler ve daha özel olarak lentiviral vektörler, mevcut buluşun uygulanmasında kullanılabilir. Buna göre, burada kullanıldığı şekli ile "retrovirüs" ya da "retroviral vektör" terimi sırası ile "lentivirüs" ve "lentiviral vektörler" içerir.

- 30 "Vektör" terimi, burada, başka bir nükleik asit molekülünü transfer edebilen ya da nakleden bir nükleik asit molekülünü belirtmek için kullanılmaktadır. Transfer edilen nükleik asit genellikle vektör nükleik asit molekülüne eklenir. Bir vektör, bir hücrede otonom kopyalanmasını yönlendiren sekansları içerebilir ya da konakçı hücre DNA'sına entegrasyona izin vermek için yeterli sekansları içerebilir. Yararlı vektörler, örnek olarak,

plazmidleri (örnek olarak, DNA plazmidleri ya da RNA plazmidleri), kozmidleri, bakteriyel yapay kromozomları ve viral vektörleri içerir. Yararlı viral vektörler, örnek olarak, kopyalama kusurlu retrovirüsleri ve lentivirüsleri içerir.

5 Teknikte uzman kişilerce açıkça görüleceği gibi, "viral vektör" terimi yaygın olarak, ya tipik olarak nükleik asit molekülünün transfer edilmesini ya da bir hücrenin genomuna entegre edilmesini kolaylaştıran virüs kaynaklı nükleik asit öğelerini içeren bir nükleik asit molekülüne (örnek olarak, bir transfer plazmidi) ya da nükleik asit transferine aracılık eden bir viral parçacığa atıfta bulunur. Viral parçacıklar tipik olarak çeşitli viral bileşenleri ve bazen aynı zamanda nükleik aside (asitlere) ilaveten konakçı hücre bileşenlerini de içerecektir.

10 Viral vektör terimi ya bir hücreye bir nükleik asidi transfer edebilme yeteneğine sahip olan bir virüse ya da viral parçacığa ya da transfer edilen nükleik asidin kendisine refere edebilir. Viral vektörler ve transfer plazmidleri, esas olarak bir virüsten türetilen yapısal ve/ veya fonksiyonel genetik öğeleri içerir. "Retroviral vektör" terimi, temel olarak bir retrovirüsten türetilen yapısal ve fonksiyonel genetik öğeleri içeren bir viral vektöre ya da plazmide atıfta
15 bulunur. "Lentiviral vektör" terimi, esas olarak bir lentivirüstan türetilen LTR'ler dahil olmak üzere yapısal ve fonksiyonel genetik öğeleri içeren bir viral vektöre ya da plazmide atıfta bulunur. "Melez" terimi, hem retroviral, örnek olarak lentiviral, sekansları hem de lentiviral olmayan viral sekansları içeren bir vektöre, LTR'ye ya da öteki nükleik aside atıfta bulunur. Bir melez vektör, retroviral, örnek olarak lentiviral, ters transkripsiyon, kopyalama,
20 entegrasyon ve/ veya paketleme ve alfavirüs alt genomik başlatıcı sekansları, yapısal olmayan proteinler ve/ veya polimeraz tanıma sahaları için sekansları içeren bir vektör ya da transfer plazmidine atıfta bulunabilir.

Özel yapılanmalarda, "lentiviral vektör", "lentiviral ekspresyon vektörü" terimleri, lentiviral transfer plazmidlerini ve/ veya enfeksiyöz lentiviral parçacıklarına atıfta bulunmak için
25 kullanılabilir. Burada klonlama alanları, başlatıcılar, düzenleyici öğeler, heterolog nükleik asitler, vb. gibi öğelere atıfta bulunulduğunda, bu öğelerin sekanslarının buluşun lentiviral parçacıklarında RNA formunda mevcut olduğu ve buluşun DNA plazmidlerinde DNA formunda mevcut olduğu anlaşılmalıdır.

30 Provirüsün her bir ucunda "uzun terminal tekrarlar" ya da "LTR'ler" olarak adlandırılan yapılar vardır. "Uzun terminal tekrar (LTR)" terimi, doğal sekans bağlamında, doğrudan tekrarlar olan ve U3, R ve U5 bölgelerini içeren retroviral DNA'ların uçlarında yer alan baz çiftlerinin etki alanlarını ifade eder. LTR'ler genellikle retroviral genlerin ekspresyonuna (örnek olarak gen transkriptlerinin geliştirilmesi, başlatılması ve poliadenilasyonu) ve viral kopyalamaya temel fonksiyonlar sağlar. LTR, transkripsiyonel kontrol öğeleri, poliadenilasyon sinyalleri ve viral

genomun kopyalanması ve entegrasyonu için gerekli sekanslar dahil olmak üzere çok sayıda düzenleyici sinyal içerir. Viral LTR, U3, R ve U5 olarak adlandırılan üç bölgeye ayrılmıştır. U3 bölgesi, geliştirici ve başlatıcı öğeleri içerir. U5 bölgesi, primer bağlama bölgesi ve R bölgesi arasındaki sekanstır ve poliadenilasyon sekansını içerir. R (tekrar) bölgesi U3 ve U5 bölgeleri tarafından kuşatılmıştır. U3, R ve U5 bölgelerinden oluşan LTR, hem viral genomun hem 5' hem de 3' uçlarında görülür. 5' LTR'ye komşu olan, genomun (tRNA primer bağlama bölgesi) ters transkripsiyonu için ve viral RNA'nın partiküller halinde (Psi bölgesi) verimli bir şekilde paketlenmesi için gerekli sekanslardır.

Burada kullanıldığı şekli ile "paketleme sinyali" ya da "paketleme sekansı" terimi, viral RNA'nın viral kapsid ya da parçacık içine sokulması için gerekli olan retroviral genom içinde yer alan sekansları belirtir, bakınız örnek olarak Clever et al., 1995.J. of Virology, Vol.69, No. 4; pp. 2101-2109. Çok sayıda retroviral vektör, viral genomun kapsüllenmesi için gerekli olan minimum paketleme sinyalini (aynı zamanda psi [Ψ] sekansı olarak da adlandırılır) kullanır. Dolayısı ile, burada kullanıldığı şekli ile "paketleme sekansı", "paketleme sinyali", "psi" ve "nxΨ sembolü" terimleri, viral parçacık oluşumu sırasında retroviral RNA sarmallarının kapsüllenmesi için gerekli olan kodlayıcı olmayan sekansa referans olarak kullanılmaktadır.

Çeşitli yapılanmalarda, vektörler modifiye edilmiş 5' LTR ve/ veya 3' LTR'leri içerir. 3' LTR'nin modifikasyonları, virüs kopyalanmasını kusurlu hale getirerek lentiviral ya da retroviral sistemlerin güvenliğini arttırmak için sıklıkla yapılır. Burada kullanıldığı şekli ile "kopyalama kusurlu" terimi, enfektif viryonlar üretilmeyecek şekilde (örnek olarak, kopyalama kusurlu lentiviral silsile) tam, etkili kopyalama yapamayan virüse atıfta bulunur. "Kopyalama yetkin" terimi, virüsün viral kopyalanmasının enfektif viryonlar (örnek olarak, kopyalama yetkin lentiviral silsile) üretebileceği şekilde, çoğalma yeteneğine sahip olan vahşi tip virüs ya da mutant virüs anlamına gelir.

"Kendi kendine inaktive eden" (SIN) vektörleri, U3 bölgesi olarak bilinen sağ (3') LTR arttırıcı-başlatıcı bölgenin viral transkripsiyonun viral kopyalamanın ilk basamağının ötesine geçmesini önlemek için modifiye edildiği (örnek olarak, delesyon ve ornatılma vasıtası ile) retroviral ya da lentiviral vektörler gibi kopyalama kusurlu vektörleri belirtir. Bunun nedeni, (3') LTR U3 bölgesinin, viral kopyalama sırasında sol (5') LTR U3 bölgesi için bir şablon olarak kullanılması ve dolayısı ile, viral transkripsiyonun U3 arttırıcı-başlatıcı olmadan yapılamamasıdır. Buluşun bir başka yapılanmasında, 3' LTR, U5 bölgesinin örnek olarak ideal bir poli(A) sekansı ile değiştirileceği şekilde modifiye edilir. 3' LTR, 5' LTR ya da 3' ve 5' LTR'lerin her ikisine de yapılan değişiklikler gibi LTR'lerde yapılan değişikliklerin de buluşa dahil edildiği dikkate alınmalıdır.

- Viral parçacıkların üretimi sırasında viral genomun transkripsiyonunu tahrik etmek için 5' LTR'nin U3 bölgesinin bir heterolog başlatıcı ile değiştirilmesi ile ilave bir güvenlik artışı sağlanır. Kullanılabilen heterolog başlatıcıların örnekleri arasında, örnek olarak, viral simian virüsü 40 (SV40) (örnek olarak, erken ya da geç), sitomegalovirüs (CMV) (örnek olarak, 5 immediyat erken), Moloney murin lösemi virüsü (MoMLV), Rous sarkom virüsü (RSV) ve herpes simpleks virüsü (HSV) (timidin kinaz) başlatıcıları bulunur. Tipik başlatıcılar Tat'dan bağımsız bir şekilde yüksek seviyelerde transkripsiyonu tahrik edebilirler. Bu yerine koyma tedavisi, virüs üretim sisteminde tam bir U3 dizisi olmadığından çoğaltma yetkili virüs üretme çapraz gen oluşturma olasılığını azaltır.
- 10 Bazı yapılanmalarda, viral vektörler bir TAR ögesi içerir. "TAR" terimi, lentiviral (örnek olarak, HIV) LTR'lerin R bölgesinde yer alan "trans aktivasyon tepkisi" genetik ögesini ifade eder. Bu öge, viral kopyalanmasını arttırmak için lentiviral trans aktivatör (tat) genetik ögesi ile etkileşir. Bununla birlikte, bu öge, 5' LTR'nin U3 bölgesinin bir heterolog başlatıcı ile değiştirildiği yapılanmalarda gerekli değildir.
- 15 "R bölgesi", capping grubunun başlangıcından (yani, transkripsiyonun başlangıcı) başlayarak ve poli A yolunun başlangıcından hemen önce sona eren retroviral LTR'ler içindeki bölgeye atıfta bulunur. R bölgesi ayrıca U3 ve U5 bölgeleri tarafından kuşatılmış olarak tanımlanmaktadır. R bölgesi, yenilenen DNA'nın genomun bir ucundan diğerine aktarılmasına izin veren ters transkripsiyon sırasında rol oynar.
- 20 Burada kullanıldığı şekli ile, "FLAP ögesi" terimi, bir retrovirüsün, örnek olarak HIV-1 ya da HIV-2'nin merkezi polipürin yolunu ve merkezi sonlandırma sekanslarını (cPPT ve CTS) içeren bir nükleik aside karşılık gelir. Uygun FLAP ögeleri, US Pat. No. 6,682,907 ve Zennou, et al., 2000, Cell, 101:173'te tarif edilmiştir. HIV-1 ters transkripsiyonu sırasında, merkezi polipürin yolundaki (cPPT) artı sarmallı DNA'nın merkezi başlatılması ve merkezi sonlandırma sekansındaki (CTS) merkezi sonlandırma, üç sarmallı bir DNA yapısının oluşumuna yol açar: HIV-1 merkezi DNA kanadı. Herhangi bir teori ile sınırlanmak istenmemek ile birlikte, DNA kanadı lentiviral genom nükleer içe aktarımının cis aktif belirleyicisi olarak hareket edebilir ve/ veya virüs titresini artırabilir. Özel yapılanmalarda, lentiviral vektör omurgaları, vektörlerdeki ilgili heterolog genlerin üst akışında ya da alt 25 akışında bir ya da daha fazla FLAP ögesi içerir. Örnek olarak, özel yapılanmalarda, bir transfer plazmid bir FLAP ögesi içerir. Bir yapılanmada, buluşun bir vektörü, HIV-1'den izole edilen bir FLAP ögesi içerir.
- 30

Bir yapılanmada, lentiviral transfer vektörleri bir ya da daha fazla dışa aktarma ögesi içerir. "Dışa aktarma ögesi" terimi, bir RNA transkriptinin nükleustan bir hücrenin sitoplazmasına

taşınmasını düzenleyen cis etkili bir transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesine atıfta bulunmaktadır. RNA dışı aktarma öğelerinin örnekleri arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) rev tepki ögesi (RRE) (bakınız örnek olarak, Cullen et al., 1991. J. Virol. 65: 1053; ve Cullen et al., 1991. Cell 58:423) ve hepatit B virüsü transkripsiyon sonrası düzenleyici öge (HPRE) bulunur. Genel olarak, RNA dışı aktarma 5 öğesi bir genin 3' UTR'sine yerleştirilir ve bir ya da çoklu kopya olarak eklenebilir.

Heterolog sekansların viral vektörlerde ekspresyonu, transkripsiyon sonrası düzenleyici öğeler ve etkin poliadenilasyon alanları ve isteğe bağlı olarak transkripsiyon sonlandırma sinyallerinin vektörlere dahil edilmesi ile artırılabilir. Transkripsiyon sonrası düzenleyici 10 öğelerin bir çeşitliliği proteindeki bir heterolog nükleik asidin ekspresyonunu artırabilir, örnek olarak, dağ sıçanı hepatit virüsü transkripsiyon sonrası düzenleyici öge (WPRE; Zufferey ve arkadaşları, 1999, J. Virol., 73: 2886); hepatit B virüsünde (HPRE) mevcut olan transkripsiyonel düzenleyici öge (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886); the posttranscriptional regulatory element present in hepatitis B virus (HPRE) (Huang et al., Mol. 15 Cell. Biol., 5:3864); ve benzerleri (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766). Transkripsiyon sonrası düzenleyici öge genellikle 3' ucunda heterolog nükleik asit sekansına konumlandırılır. Bu konfigürasyon, 5' kısmı, heterolog nükleik asit kodlama sekanslarını içeren ve 3' kısmı, transkripsiyon sonrası düzenleyici öge sekansını içeren bir mRNA transkriptinin sentezi ile sonuçlanır. Tercih edilen yapılanmalarda, buluşun vektörleri bir WPRE ya da HPRE gibi bir 20 transkripsiyon sonrası düzenleyici öğeden yoksundur ya da onu içermez, çünkü bazı durumlarda bu öğeler hücrel transformasyon riskini artırır ve/ veya mRNA transkript miktarını ya da mRNA stabilitesini büyük ölçüde ya da kayda değer miktarda arttırmaz. Bu neden ile, bazı yapılanmalarda, buluşun vektörleri ek bir güvenlik önlemi olarak bir WPRE ya da HPRE'den yoksundur ya da bunu içermez.

25 Heterolog nükleik asit transkriptlerinin etkin sonlandırılmasını ve poliadenilasyonu yönlendiren öğeler, heterolog gen ekspresyonunu artırır. Transkripsiyon sonlandırma sinyalleri genellikle poliadenilasyon sinyalinin alt akışında bulunur. Burada kullanıldığı şekli ile "poliA bölgesi" ya da "poliA sekansı" terimi, RNA polimeraz II ile yeni ortaya çıkan RNA transkriptinin hem sonlandırılmasını hem de poliadenilasyonunu yönlendiren bir DNA dizisini 30 belirtir. Rekombinant transkriptin etkili poliadenilasyonu, bir poliA kuyruğu içermeyen transkriptlerin kararsız olması ve hızla bozunması nedeni ile arzu edilir. PoliA sinyallerinin açıklayıcı örnekleri, ideal bir poliA sekansını (örnek olarak, AATAAA, ATATAA AGTAAA), bir sığır büyüme hormonu poliA sekansını (BGHpA), bir tavşan β -globin poliA sekansını ($r\beta$ gpA) ya da tekniğin mevcut durumunda bilinen başka bir uygun heterolog ya da endojen poliA 35 sekansını içerir.

Bazı yapılanmalarda, bir lentiviral vektör ayrıca bir insulatör öge de içerir. İnsulatör ögeler, genomik DNA'da bulunan cis etkili ögelerin aracılık ettiği ve transfer edilmiş sekansların denetimsizleştirilmiş ekspresyonuna yol açan lentivirüs eksprese edilmiş sekansların, örnek olarak terapötik polipeptidlerin, örnek olarak, entegrasyon bölgesi etkilerinden korunmasına katkıda bulunabilir (yani, pozisyon etkisi; örnek olarak, Burgess-Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433; and Zhan et al., 2001, Hum. Genet., 109:471). Bazı yapılanmada, transfer vektörleri, bir LTR'de ya da her ikisinde ya da hücrel genoma entegre olan vektörün bölgesinde başka bir yerde bir insulatör öge içerir. Buluşta kullanım için uygun insulatörler, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, tavuk β -globin insulatörünü içerir (bakınız Chung et al., 1993. Cell 74:505; Chung et al., 1997. PNAS 94:575; and Bell et al., 1999. Cell 98:387). İnsulatör ögelerinin örnekleri arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, tavuk HS4 gibi bir β -globin lokusundan bir insulatör bulunur.

Buluşun belli özel yapılanmalarına göre, viral vektör omurga sekanslarının çoğu ya da tümü bir lentivirüsten, örnek olarak HIV-1'den türetilmektedir. Bunun ile birlikte, birçok farklı lentiviral sekans kaynağının kullanılabilmesi ve bazı lentiviral sekanslarda çok sayıda ornatım ve değişikliğin, bir transfer vektörünün burada tarif edilen fonksiyonları yerine getirme yeteneğini bozmadan yerleştirilebileceği anlaşılmalıdır. Ayrıca, çeşitli lentiviral vektörler, teknikte bilinmektedir, bakınız, Naldini et al., (1996a, 1996b, ve 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, U.S. Patent No'ları 6,013,516; ve 5,994,136'dan herhangi biri, mevcut buluşun bir viral vektörünü ya da transfer plazmidini üretmek için uyarlanabilir.

Burada kullanıldığı şekli ile "polinükleotit" ya da "nükleik asit" terimleri haberci RNA (mRNA), RNA, genomik RNA (gRNA) artı sarmallı RNA (RNA (+)), eksi sarmallı RNA (RNA (-)), genomik DNA (gDNA) tamamlayıcı DNA (cDNA) ya da DNA anlamına gelir. Polinükleotitler, tek ve çift sarmallı polinükleotitleri içerir. Tercihen, buluşun polinükleotitleri, tipik olarak varyantın, referans dizinin en az bir biyolojik aktivitesini koruduğu yer olan burada tarif edilen referans sekanslarından herhangi birine (bakınız, örnek olarak Sekans Listesi) en az yaklaşık olarak % 50, % 55, % 60, % 65, % 70, % 75, % 80, % 85, % 90, % 95, % 96, % 97, % 98, % 99 ya da % 100 dizi özdeşliği oranında polinükleotit ya da varyantları içerir. Çeşitli örnek yapılanmalarda, mevcut buluş, kısmen, viral vektörü ve transfer plazmid polinükleotit sekanslarını ve bunları içeren bileşimleri tasarlar. Özel yapılanmalarda, buluş terapötik polipeptitleri kodlayan polinükleotitleri sağlar.

Burada kullanıldığı şekli ile "polinükleotit varyant" ve "varyant" terimleri ve benzerleri, bir referans polinükleotit sekansı ya da daha sonra tanımlanacak olan sıkı koşullar altında bir referans sekansı ile melezlenen polinükleotitler ile önemli oranda sekans özdeşliği gösteren polinükleotitleri ifade eder. Bu terimler, bir ya da daha fazla nükleotidin ilave edildiği ya da

5 çıkarıldığı ya da bir referans polinükleotit ile karşılaştırıldığında farklı nükleotidler ile değiştirildiği polinükleotitleri içerir. Bu bağlamda, teknikte, mutasyonlar, eklemeler, delesyonlar ve ornatımlar dahil bazı değişikliklerin, bir referans polinükleotide yapılabileceği, böylece değiştirilmiş polinükleotidin, referans polinükleotidin biyolojik fonksiyonunu ya da

10 Burada kullanıldığı hali ile, "izole edilmiş" terimi, normal olarak kendi doğal durumunda kendisine eşlik eden bileşenlerin büyük ölçüde ya da esas olarak olmadığı malzeme anlamına gelir. Örnek olarak, burada kullanılan "izole edilmiş bir polinükleotit" terimi, doğal olarak meydana gelen bir durumda, örnek olarak, normal olarak parçaya bitişik olan sekanslardan ayrılan bir DNA parçasını çevreleyen sekanslardan saflaştırılmış bir polinükleotit anlamına gelir.

15 Polinükleotitlerin oryantasyonunu tarif eden terimler arasında aşağıdakiler bulunmaktadır: 5' (normal olarak bir serbest fosfat grubuna sahip olan polinükleotidin ucu) ve 3' (normal olarak bir serbest hidroksil (OH) grubuna sahip olan polinükleotidin ucu). Polinükleotit sekansları 5' 3' yönünde ya da 3' 5' yönünde açıklanabilir.

20 "Tamamlayıcı" ve "tamamlayıcılık" terimleri, baz eşleme kuralları ile ilgili polinükleotidlere (yani bir nükleotit sekansı) karşılık gelir. Örnek olarak, 5' A G T C A T G 3' DNA sekansının tamamlayıcı sekansı 3' T C A G T A C 5' dir. Sonuncu sekans genellikle soldaki 5' ucu ve sağdaki 3' ucu, 5' C A T G A C T 3' ile ters tamamlayıcı olarak yazılır. Ters tamamlayıcısına eşit olan bir sekansın bir palindromik sekans olduğu söylenir. Tamamlayıcılık, nükleik asitlerin bazlarının, baz eşleştirme kurallarına göre eşleştirildiği şekilde "kısmi" olabilir. Ya da, nükleik asitler arasında "tam" ya da "toplam" tamamlayıcılık olabilir.

25 Burada kullanıldığı şekli ile "nükleik asit kaseti" terimi, vektör içinde bir RNA'yı ve daha sonra bir proteini eksprese edebilen genetik sekansları belirtir. Nükleik asit kaseti ilgilenilen geni içerir. Nükleik asit kaseti, vektör içinde, kasetin içindeki nükleik asit RNA'ya kopyası çıkarılacak şekilde, ve gerekli olduğunda, bir proteine ya da bir polipeptide çevrilecek, dönüştürülmüş hücre içindeki aktivite için gerekli olan uygun translasyon sonrası modifikasyonlara maruz kalacak, ve biyolojik aktivite için uygun bölmeye yeri değiştirilebilecek şekilde uygun hücre içi bölmeleri hedeflemek ya da hücre dışı bölmelere

30 salgılamak yolu ile pozisyonel olarak ve sıralı olarak konumlandırılmıştır. Tercihen, kaset 3' ve 5' uçlarına bir vektörün içine sokulması için uyarlanmıştır, örnek olarak her bir uçta sınırlama endonükleaz alanları vardır. Buluşun tercih edilen bir yapılmasında, nükleik asit kaseti, adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavi etmek için kullanılan bir

terapötik gen sekansı içerir. Kaset çıkarılabilir ve tek bir birim olarak bir plazmid ya da viral vektör içine sokulabilir.

Polinükleotitler, ilgilenilen bir polinükleotidi içerir. Burada kullanılan "polinükleotit" terimi, eksprese edilmesi arzu edilen bir ekspresyon vektörüne sokulmuş örnek olarak bir polipeptidi (yani, ilgilenilen bir polipeptit) kodlayan bir polinükleotit, polinükleotit anlamına gelir. Belirli yapılanmalarda, ilgilenilen polinükleotit, bir "terapötik polipeptit", örnek olarak, ATP bağlayıcı kaset, alt aile D (ALD), üye 1 (ABCD1) geni olarak adlandırılabilir bir hastalık ya da bozukluğun tedavisinde ya da önlenmesinde terapötik bir etki sağlayan bir polipeptidi kodlar. İlgilenilen polinükleotitler ve bunlardan kodlanan polipeptitler arasında, vahşi tip polipeptitleri kodlayan her iki polinükleotit ve bunların fonksiyonel varyantları ve parçaları bulunur. Özel yapılanmalarda, bir fonksiyonel varyant, karşılık gelen bir vahşi tip referans polinükleotit ya da polipeptit sekansına en az % 80, en az % 90, en az % 95 ya da en az % 99 özdeşliğe sahiptir. Belirli yapılanmalarda, bir fonksiyonel varyant ya da parça, karşılık gelen bir vahşi tip polipeptidin biyolojik aktivitesinin en az % 50'sini, en az % 60'ını, en az % 70'ini, en az % 80'ini ya da en az % 90'ını içerir. Mevcut buluşta kullanım için uygun olan temsili polinükleotit sekansları arasında, bunlar ile sınırlı olmamak ile birlikte, SEK ID NO'lar 1 ile 2'de belirtilen insan ACBD1 cDNA'ları bulunur.

Mevcut buluşun polinükleotitleri, kodlama sekansının kendisinin uzunluğundan bağımsız olarak, başlatıcılar ve/ veya güçlendiriciler, translasyona uğramamış bölgeler (UTR'ler), Kozak sekansları, poliadenilasyon sinyalleri, ilave kısıtlama enzim bölgeleri, çoklu klonlama bölgeleri, iç ribozomal giriş alanları (IRES), rekombinaz tanıma sahaları (örnek olarak, LoxP, FRT ve Att alanları), sonlandırma kodonları, transkripsiyon sonlandırma sinyalleri ve kendi kendini bölen polipeptitleri kodlayan polinükleotitler, epitop etiketleri gibi diğer DNA sekansları ile burada başka bir yerde açıklandığı gibi ya da teknikte bilindiği gibi, genel uzunlukları önemli ölçüde değişebilir şekilde birleştirilebilir. Bu nedenle, hemen hemen her uzunluğa sahip bir polinükleotit parçasının kullanılabilirliği düşünülmektedir, toplam uzunluk tercihen, tasarlanan rekombinant DNA protokolünde hazırlama ve kullanım kolaylığı ile sınırlanmaktadır.

Burada kullanılan "başlatıcı" terimi, bir RNA polimerazın bağlandığı bir polinükleotidin (DNA ya da RNA) bir tanıma bölgesini ifade eder. "Güçlendirici" terimi, geliştirilmiş transkripsiyon sağlayabilen sekansları içeren ve bazı durumlarda başka bir kontrol sekansına göre yönelimlerinden bağımsız olarak işlev görebilen bir DNA segmentini ifade eder. Bir güçlendirici, başlatıcılar ve/ veya diğer güçlendirici öğeler ile işbirliği halinde ya da ek olarak işlev görebilir. "Başlatıcı/ güçlendirici" terimi, hem başlatıcı hem de güçlendirici fonksiyonları sağlayabilen sekansları içeren bir DNA segmentini ifade eder. Bir yapılanmada, buluşa ait bir

vektör, bir miyeloproliferatif sarkom virüsü güçlendiricisi, negatif kontrol bölgesi silinmiş, dl587rev primer bağlama bölgesi ornatılmış (MND) başlatıcısı (Challita et al., J Virol. 69(2):748-55 (1995); SEK ID NO: 3) içerir.

5 Özel yapılanmalarda, buluşun bir vektörü, başlatıcılar ve/ veya güçlendiriciler gibi dışsal, içten büyüyen ya da heterolog kontrol sekanslarını içerir. Bir "içten büyüyen" kontrol sekansı, genomda belirli bir gen ile doğal olarak bağlantılı olan bir sekanstır. Bir "dışsal" kontrol sekansı, genin manipülasyonu yolu ile (yani, moleküler biyolojik teknikler) bu genin transkripsiyonu, bağlantılı güçlendirici/ başlatıcı tarafından yönlendireceği şekilde bir gen ile yan yana yerleştirilen bir sekanstır. Bir "heterolog" kontrol sekansı, genetik olarak manipüle edilen hücreden farklı bir türden olan dışsal bir sekanstır.

15 "İşlevsel olarak bağlanmış" terimi, bir yan yana duruşu ifade etmekte olup, içerisinde tarif edilen bileşenler, amaçlanan şekilde işlev görmelerine izin veren bir ilişki içindedirler. Bir yapılanmada, terim, bir nükleik asit ekspresyon kontrol sekansı (bir başlatıcı ve/ veya güçlendirici gibi) ve bir ikinci polinükleotit sekansı, örnek olarak, ilgilenilen bir polinükleotit, arasındaki bir fonksiyonel bağlantıya atıfta bulunmakta olup, içerisinde ekspresyon kontrol sekansı, ikinci sekansa karşılık gelen nükleik asidin transkripsiyonunu yönlendirir.

Burada kullanıldığı şekli ile "yapıcı başlatıcı" terimi, işlevsel olarak bağlı bir sekansın transkripsiyonunu hiç durmadan ya da sürekli olarak sağlayan bir başlatıcıya atıfta bulunur. Yapıcı başlatıcılar, çok çeşitli hücre ve doku tiplerinde ekspresyona izin veren bir "her yerde bulunan başlatıcı" ya da sınırlı hücre ve doku tiplerinde ekspresyona izin veren "dokuya özgü bir başlatıcı" olabilir. Tanımlayıcı her yerde bulunan başlatıcılar arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, bir sitomegalovirüs (CMV) immediyat erken başlatıcısı, bir viral simian virüsü 40 (SV40) (örnek olarak, erken ya da geç), bir Molon murin lösemi virüsü (MoMLV) LTR başlatıcısı, bir Rous sarkom virüsü (RSV) LTR'si, bir herpes simpleks virüsü (HSV) (timidin kinaz) başlatıcısı, H5, P7.5 ve P11 başlatıcılarından aşılama virüsü, bir uzama faktörü 1-alfa (EFla) başlatıcısı, erken büyüme tepkisi 1 (EGR1) ferritin H (FerH), ferritin L (FerL), Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4A1 (EIF4A1), ısı şoku 70kDa proteini 5 (HSPA5), ısı şoku proteini 90kDa beta, üye 1 (HSP90B1), ısı şok proteini 70kDa (HSP70), (3-kinesin ((3-KIN), insan ROSA 26 lokusu (Irions et al., Nature Biotechnology 25, 1477-1482 (2007)), bir Ubikuitin C başlatıcısı (UBC)) bir fosfogliserat kinaz-1 (PGK) başlatıcısı, bir sitomegalovirüs güçlendirici/ tavuk β -aktin (CAG) başlatıcısı ve bir β -aktin başlatıcısı bulunur.

İstenen bir polinükleotit sekansının hücre tipine özgü, silsileye spesifik ya da doku spesifik ekspresyonunu elde etmek için dokuya spesifik bir başlatıcının kullanılması arzu edilebilir

(örnek olarak, sadece bir hücre tipinin ya da dokuların bir alt kümesinde bir polipeptidi kodlayan özel bir nükleik asidi eksprese etmek için ya da gelişimin belirli aşamalarında).Doku spesifik başlatıcılarının tanımlayıcı örnekleri arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere: bir B29 başlatıcısı (B hücre ekspresyonu), bir tnt transkripsiyon faktörü (CBFa2) başlatıcısı (kök hücre spesifik ekspresyonu), bir CD 14 başlatıcısı (monositik hücre ekspresyonu), bir CD43 başlatıcı (lökosit ve trombosit ekspresyonu), bir CD45 başlatıcısı (hematopoietik hücre ekspresyonu), bir CD68 başlatıcısı (makrofaj ekspresyonu), bir CYP450 3A4 başlatıcısı (hepatosit ekspresyonu), bir desmin başlatıcısı (kas ekspresyonu), bir elastaz 1 başlatıcısı (pankreas asiner hücresi) ekspresyon, bir endoglin başlatıcısı (endotel hücre ekspresyonu), fibroblast spesifik protein 1 başlatıcısı (FSP1) başlatıcısı (fibroblast hücre ekspresyonu), fibronektin başlatıcısı (fibroblast hücre ekspresyonu), yüzgeçler ile ilgili tirozin kinaz 1 (FLT1) başlatıcısı (endotel hücresi) ekspresyon, bir gliyal fibriler asidik protein (GFAP) başlatıcısı (astroit ekspresyonu), bir insülin başlatıcısı (pankreatik beta hücre ekspresyonu), bir integrin, alfa 2b (ITGA2B) başlatıcısı (megakaryositler), bir hücre içi adezyon molekülü 2 (ICAM-2) başlatıcısı (endotel hücreler), bir interferon beta (IFN- β) başlatıcısı (hematopoietik hücreler), bir keratin 5 başlatıcısı (keratinosit ekspresyonu), bir miyoglobin (MB) başlatıcısı (kas ekspresyonu), miyogenik farklılaşma 1 (MYOD1) başlatıcısı (kas ekspresyonu), bir nefrin başlatıcısı (podosit ekspresyonu), bir kemik gama-karboksiglutamat proteini 2 (OG-2) başlatıcısı (osteoblast ekspresyonu), bir 3-oksoasit CoA transferaz 2B (Oxct2B) başlatıcısı, (haploid spermatid ekspresyonu), bir yüzey etkin protein B (SP-B) başlatıcısı (akciğer ekspresyonu), bir sinapsin başlatıcısı (nöron ekspresyonu), bir Wiskott Aldrich sendromu proteini (WASP) başlatıcısı (hematopoietik hücre ekspresyonu) yer alır.

Bir yapılanmada, mevcut buluşun bir vektörü, mikroglial hücrelerde, örnek olarak bir MND başlatıcısında (SEK ID N0: 3) istenen bir polipeptidi, örnek olarak ABCD1'i eksprese eden bir dokuya spesifik başlatıcı ve/ veya güçlendirici içerir.

Burada kullanıldığı şekli ile "koşullu ekspresyon", bunlar ile sınırlı olmamak üzere, indüklenilebilen ekspresyon dahil olmak üzere herhangi bir tipte koşullu ekspresyon; bastırılabilir ekspresyon; belli bir fizyolojik, biyolojik ya da hastalık durumuna sahip olan hücreler ya da dokulardaki ekspresyona atıfta bulunabilir. Bu tanım hücre tipini ya da dokuya özgü ekspresyonu dışlamak için tasarlanmamıştır. Buluşun belirli yapılanmaları, bir polinükleotidin ilgi konusu koşullu ekspresyonunu sağlar, örnek olarak ekspresyon, bir hücre, doku, organizma, vb., polinükleotidin eksprese edilmesine neden olan ya da ilgilenilen polinükleotit tarafından kodlanan polinükleotidin ekspresyonunda bir artışa ya da azalmaya neden olan bir tedaviye ya da duruma maruz bırakılarak kontrol edilir.

İndüklenebilir başlatıcıların/ sistemlerin açıklayıcı örnekleri arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, glukokortikoid ya da östrojen reseptörlerini kodlayan genler için başlatıcılar (ilgili hormon ile tedavi ile indüklenebilen), metalotionin başlatıcıları (çeşitli ağır metaller ile muamele ile indüklenebilen) , MX-1 başlatıcısı (interferon ile uyarılabilir), "GeneSwitch"
5 mifepriston düzenlenebilir sistemi (Sirin et al., 2003, Gene, 323:67), cumate indüklenebilir gen anahtarı (WO 2002/088346), tetrasiklin bağımlı düzenleyici sistemler vb. gibi steroid indüklenebilir başlatıcılar bulunur.

Koşullu ekspresyon, bölgeye özgü bir DNA rekombinaz kullanılarak da elde edilebilir. Açıklamanın belirli örneklerine göre, vektör, bölgeye özgü bir rekombinazın aracılık ettiği
10 rekombinasyon için en az bir (tipik olarak iki) bölge (bölgeler) içerir. Burada kullanıldığı şekli ile "rekombinaz" ya da "bölgeye özgü rekombinaz" terimleri, bir ya da daha fazla rekombinasyon alanı (örnek olarak, iki, üç, dört, beş, yedi, on, on iki, on beş, yirmi, otuz, elli, vb.) içeren rekombinasyon reaksiyonlarında yer alan eksizyon ya da bütünleyici proteinler, enzimler, ko-faktörler ya da vahşi tip proteinler (bakınız, Landy, Current Opinion in
15 Biotechnology 3:699-707 (1993)), ya da mutantlar, türevler, (örnek olarak, rekombinasyon protein sekanslarını ya da bunların fragmanlarını içeren füzyon proteinleri), fragmanları, ve bunların varyantları olabilen ilişkili proteinleri içerir. Mevcut açıklamanın özel örneklerinde kullanım için uygun rekombinazların tanımlayıcı örnekleri arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, aşağıdakiler bulunmaktadır: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Cin, Φ C31, Cin, Tn3
20 resolvaz, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCEI ve ParA.

Vektörler, çok çeşitli alana özgü rekombinazlardan herhangi biri için bir ya da daha fazla rekombinasyon alanı içerebilir. Bir alana özgü rekombinaz için hedef alanın, bir vektörün, örnek olarak bir retroviral vektör ya da lentiviral vektörün entegrasyonu için gerekli herhangi bir alana ek olduğu anlaşılmalıdır. Burada kullanıldığı şekli ile "rekombinasyon sekansı",
25 "rekombinasyon alanı" veya "alana özgü rekombinasyon alanı" terimleri, bir rekombinazın tanımladığı ve bağlandığı özel bir nükleik asit sekansını belirtir.

Örnek olarak, Cre rekombinaz için bir rekombinasyon alanı, 8 baz çift çekirdekli bir sekansı çevreleyen (13 nolu çift bazlı ters çevrilmiş tekrarlar içeren (rekombinaz bağlama alanları olarak hizmet etmekte olan) bir 34 baz çifti sekansı olan loxP'dir (bkz. Sauer, B., Current
30 Opinion in Biotechnology 5:521-527 (1994)'ün Şekil 1'i). Diğer örnek loxP alanları, bunlar ile sınırlı olmamak üzere şunları içerir: lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer et al., 2002), lox71 (Albert et al., 1995) ve lox66 (Albert et al., 1995).

FLP rekombinaz için uygun tanıma alanları şunları içerir, ancak bunlar ile sınırlı değildir: FRT (McLeod, et al., 1996), F₁, F₂, F₃ (Schlake and Bode, 1994), F₄, F₅ (Schlake and Bode, 1994), FRT (LE) (Senecoff et al., 1988), FRT (RE) (Senecoff et al., 1988).

5 Tanıma sekanslarının diğer örnekleri, rekombinaz enzim λ Integraz, örnek olarak phi-c31 tarafından tanınan attB, attP, attL ve attR sekanslarıdır. ϕ 31 SSR, yalnızca heterotipik alanlar attB (uzunluk olarak 34 bp) ve attP (uzunluk olarak 39 bp) arasında rekombinasyona aracılık eder (Groth et al., 2000). Sırası ile, bakteri ve faj genomları üzerindeki faj entegrasyonu için bağlantı alanlarına verilen attB ve attP, her ikisi de, ϕ 31C31 homodimerler tarafından muhtemel olan kusurlu ters tekrarlar içerir (Groth et al., 2000). Ürün alanları, attL ve attR, 10 ϕ C31 aracılı rekombinasyona (Belteki et al., 2003) karşı etkili değildir ve reaksiyonu geri döndürülemez hale getirir. Katalizör insersiyonları için, attB taşıyan DNA'nın bir genomik attP bölgesine bir genomik attB bölgesine göre olandan daha kolay bir şekilde yerleştirildiği bulunmuştur (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003). Böylece, homolog rekombinasyon ile bir tipik bir rekombinasyon pozisyonu, bir attP taşıyan "kenetlenme alanı", tanımlı bir lokus 15 içine yerleştirilir, daha sonra insersiyon için bir attB taşıyan gelen sekans ile eşleşir.

Burada kullanıldığı şekli ile, bir "iç ribozom giriş alanı" ya da "IRES", bir sistrunun (bir protein kodlama bölgesi) ATG gibi başlatma kodonuna doğrudan iç ribozom girişini başlatan, dolayısı ile genin kaptan bağımsız translasyonuna neden olur. Bakınız, örnek olarak, Jackson et al., 1990. Trends Biochem Sci 15(12):477-83) ve Jackson and 20 Kaminski. 1995. RNA 1(10):985-1000. Özel yapılanmalarda, buluş tarafından tasarlanan vektörler, bir ya da daha fazla polipeptidi kodlayan bir ya da daha fazla polinükleotit içerir. Çok sayıda polipeptidin her birinin etkili bir şekilde translasyonunu sağlamak için, polinükleotit sekansları, bir ya da daha fazla IRES sekansı ya da kendi kendini bölen polipeptitleri kodlayan polinükleotit sekansları ile ayrılabilir.

25 Burada kullanıldığı şekli ile "Kozak sekansı" terimi, mRNA'nın ribozomun küçük alt birimine ilk bağlanmasını büyük ölçüde kolaylaştıran ve translasyonu artıran kısa bir nükleotid sekansına atıfta bulunmaktadır. Konsensüs Kozak sekansı (GCC)RCCATGG olup, içerisinde R bir pürindir (A ya da G) (Kozak, 1986. Cell 44(2):283-92 ve Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48). Özel yapılanmalarda, buluş tarafından tasarlanan vektörler, bir 30 konsensüs Kozak sekansına sahip olan ve arzu edilen bir polipeptidi, örnek olarak, ABCD1'i kodlayan polinükleotitleri içerir.

Ozel yapılanmalarda, vektörler, eksprese edilecek olan bir polipeptidi kodlayan bir polinükleotidin bir poliadenilasyon sekansını 3'ünü içerir. Poliadenilasyon sekansları, bir poliA kuyruğunun kodlama sekansının 3' ucuna eklenmesi ile mRNA stabilitesini arttırabilir ve

dolayısı ile artan translasyon verimliliğine katkıda bulunabilir. Tanınan poliadenilasyon alanları, ideal bir poliA sekansını (örnek olarak, AATAAA, ATTAAA AGTAAA), bir sığır büyüme hormonu poliA sekansını (BGHpA), bir tavşan β -globin poliA sekansını (r β gpA) ya da tekniğin mevcut durumunda bilinen başka bir uygun heterolog ya da endojen poliA sekansını içerir.

Belirli yapılanmalarda, vektörler, aynı zamanda seçilebilir bir markör olarak adlandırılan bir seçim geni içerir. Tipik seçim genleri, (a) antibiyotiklere ya da diğer toksinlere, örnek olarak ampisilin, neomisin, higromisin, metotreksat, Zeosin, Blastosidin ya da tetrasiklin, (b) tamamlayıcı oksotrofik eksikliklere ya da (c) örnek olarak, Basil için D-alanin rasemazını kodlayan gen gibi kompleks ortamda mevcut olmayan kritik besin maddelerine karşı direnç kazandıran proteinleri kodlar. Dönüştürülmüş hücre hatlarını geri kazanmak için herhangi bir sayıda seçim sistemi kullanılabilir. Bunlar arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, sırasıyla tk- ya da aprt hücrelerde kullanılabilir olan herpes simpleks virüsü timidin kinaz (Wigler et al., 1977. Cell 11:223-232) ve adenin fosforibosiltransferaz (Lowy et al., 1990. Cell22:817-823) genleri bulunur.

Bir "konakçı hücre", bir rekombinant vektör ya da buluşa ait bir polinükleotit ile in vivo ya da in vitro olarak transfekte ya da enfekte edilmiş hücreleri içerir. Konakçı hücreler, paketleme hücrelerini, üretici hücrelerini ve virüs vektörleri ile enfekte olmuş hücreleri içerebilir. Özel yapılanmalarda, buluşun viral vektörü ile enfekte edilen konakçı hücreler, tedaviye ihtiyaç duyan bir deneğe uygulanmada kullanım içindir.

Büyük ölçekli viral parçacık üretimi genellikle makul bir viral titre elde etmek için gereklidir. Viral parçacıklar, bir transfer vektörünün, viral yapısal ve/ veya aksesori genler, örnek olarak, gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx ya da nef genleri ya da diğer retroviral genleri içeren bir paketleme hücre hattına transfekte edilmesi ile üretilir.

Burada kullanıldığı şekli ile "paketleme vektörü" terimi, bir paketleme sinyalinden yoksun olan ve bir, iki, üç, dört ya da daha fazla viral yapısal ve/ veya aksesori genleri kodlayan bir polinükleotit içeren bir ekspresyon vektörünü ya da viral vektörü belirtir. Tipik olarak, paketleme vektörleri bir paketleme hücrelerine dahil edilir ve transfeksiyon, kalıt aktarım ya da enfeksiyon yolu ile hücreye sokulur. Transfeksiyon, kalıt aktarım ya da enfeksiyon metotları, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir. Mevcut buluşa ait bir lentiviral transfer vektörü, bir üretici hücre ya da hücre hattı oluşturmak için transfeksiyon, kalıt aktarım ya da enfeksiyon yolu ile bir paketleme hücre hattına sokulabilir. Mevcut buluşun paketleme vektörleri, örnek olarak kalsiyum fosfat transfeksiyonu, lipofeksiyon ya da elektroporasyon gibi standart metotlar ile insan hücrelerine ya da hücre hatlarına sokulabilir. Bazı yapılanmalarda,

5 paketleme vektörleri, neomisin, higromisin, puromisin, blastosidin, zeosin, timidin kinaz, DHFR, Gin sintetaz ya da ADA gibi baskın seçilebilir bir markör ile birlikte hücrelerin içine sokulur, ardından ilaç ve klonların izolasyonu varlığında seçim yapılır. Seçilebilir bir markör gen, paketleme vektörü tarafından kodlanan genlere, örnek olarak IRES ya da kendi kendine parçalanmış viral peptitlere fiziksel olarak bağlanabilir.

10 Viral zarf proteinleri (env), hücre hatlarından üretilen rekombinant retrovirüsler tarafından nihayetinde enfekte ve transforme edilebilen konakçı hücre aralığını belirler. HIV-1, HIV-2, SIV, FIV ve EIV gibi lentivirüsler durumunda, env proteinleri gp41 ve gp120'yi içerir. Tercihen, buluşun paketleme hücreleri tarafından eksprese edilen viral env proteinleri, daha önce tarif edildiği gibi viral gag ve pol genlerinden ayrı bir vektör üzerinde kodlanır.

15 Buluşta kullanılacak retroviral türevli env genlerinin tanımlayıcı örnekleri arasında, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, şunlar yer alır: MLV zarflar, 10A1 zarfı, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Ebola, Sendai, FPV (Kuş vebası virüsü) ve grip virüsü zarfları. Benzer şekilde, RNA virüslerinden (örnek olarak, Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Kornaviridae, Paramiksoviridae, Rabdoviridae, Filoviridae, Orthomiksoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae RNA virüs aileleri) ve ayrıca DNA virüslerinden (Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poksiiridae ve Iridoviridae familyaları) gelen zarfları kodlayan genler kullanılabilir. Temsili örnekler arasında FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, Kuduz, ALV, 20 BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10, EIAV bulunmaktadır.

25 Başka yapılanmalarda, mevcut buluşa ait bir virüsü psödo tipleme için olan zarf proteinleri, bunlar ile sınırlı olmamak üzere, aşağıdaki virüslerden herhangi birini içerir: H1N1, H1N2, H3N2 ve H5N1 (kuş gribi), İnfluenza B, İnfluenza C virüsü, Hepatit A virüsü, Hepatit B virüsü, Hepatit C virüsü, Hepatit D virüsü, Hepatit E virüsü, Rotavirüs, Norwalk virüs grubundan herhangi bir virüs gibi, enterik adenovirüsler, parvovirüs, Dang humması virüsü, Maymun çiçek virüsü, Mononegaviraller, kuduz virüsü gibi Lyssavirus, Lagos yarasa virüsü, Mokola virüsü, Duvenhage virüsü, Avrupa yarasa virüsü 1 ve 2 ve Avustralya yarasa virüsü, Efemerovirus, Vezikulovirus, Veziküler Somatit Virüs (VSV), Herpes simpleks virüsü tipleri 1 30 ve 2 gibi herpes virüsler, varisella zoster, sitomegalovirüs, Epstein-Bar virüsü (EBV), insan herpes virüsleri (HHV), insan herpes virüs tip 6 ve 8, İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), papilloma virüs, murin gamma herpes virüs, Arjantin hemorajik ateş virüsü, Bolivya hemorajik ateş virüsü, Sabia ilişkili hemorajik ateş virüsü, Venezüella hemorajik ateş virüsü, Lassa ateş virüsü, Maçupo virüsü, Lenfositik karyomenenjit virüsü gibi Arenavirüsler (LCMV), Kırım 35 Kongo kanamalı ateşi virüsü, Hanta virüsü, böbrek sendromu ile birlikte kanamaya neden

olan hemorajik ateş, Rift Vadisi ateşi virüsü, Ebola hemorajik ateşi de dahil olmak üzere Filoviridae (filovirüs) ve Marsan hemorajik ateşi, Kaysanur Orman hastalıkları virüsü dahil olmak üzere Flaviviridae, Omsk hemorajik ateş virüsü, virüslere neden olan kene kaynaklı ensefalit ve Hendra virüsü ve Nipah virüsü gibi paramiksoviridae, variola majör ve variola minör (çiçek virüsü), Venezüella ekuin ensefalit virüsü, doğu ekuin ensefalit virüsü, batı ekuin ensefalit virüsü gibi alfavirüsler, SARS ile ilişkili koronavirüs (SARS-CoV), Batı Nil virüsü, virüse neden olan herhangi bir beyin iltihabı.

Bir yapılanmada, buluş, VSV-G glikoprotein ile psödo tiplenmiş, örnek olarak lentivirüs gibi rekombinant retrovirüs üreten paketleme hücreleri sağlar.

10 Burada kullanılan "psödo tip" veya "psödo tiplendirme" terimleri, viral zarf proteinleri, tercih edilen özelliklere sahip başka bir virüsün ornatıkları ile ornatılmış olan bir virüse karşılık gelir. Örnek olarak HIV, HIV'in daha geniş bir hücre aralığını enfekte etmesine izin veren veziküler stomatit virüsü G-protein (VSV-G) zarf proteinleri ile psödo tiplenebilir, çünkü HIV zarf proteinleri (env geni tarafından kodlanan) normal olarak virüsü CD4+ gösteren hücreleri hedefler. Buluşun tercih edilen bir yapılanmasında, lentiviral zarf proteinleri VSV-G ile psödo tiplenmiştir. Bir yapılanmada, buluş, VSV-G zarfı glikoprotein ile psödo tiplenmiş, örnek olarak lentivirüsler gibi rekombinant retrovirüsler üreten paketleme hücreleri sağlar.

Burada kullanıldığı şekli ile "paketleme hücresi hatları" terimi, bir paketleme sinyali içermeyen, ancak viral parçacıkların doğru şekilde paketlenmesi için gerekli olan viral yapısal proteinleri ve kopyalama enzimlerini (örnek olarak, gag, pol ve env) kararlı ya da geçici olarak eksprese eden hücre hatlarına referans olarak kullanılır. Buluşun paketleme hücrelerini hazırlamak için uygun herhangi bir hücre hattı kullanılabilir. Genel olarak, hücreler memeli hücreleridir. Özel bir yapılanmada, paketleme hücre hattını üretmek için kullanılan hücreler, insan hücreleridir. Kullanılabilen uygun hücre hatları, örnek olarak CHO hücreleri, BHK hücreleri, MDCK hücreleri, C3H 10T1/2 hücreleri, FLY hücreleri, Psi-2 hücreleri, BOSC 23 hücreleri, PA317 hücreleri, WEHI hücreleri, COS hücreleri, BSC 1 hücreleri, BSC 40 hücreleri, BMT 10 hücreleri, VERO hücreleri, W138 hücreleri, MRC5 hücreleri, A549 hücreleri, HT1080 hücreleri, 293 hücreleri, 293T hücreleri, B-50 hücreleri, 3T3 hücreleri, NIH3T3 hücreleri, HepG2 hücreleri, Saos-2 hücreleri, Huh7 hücreleri, HeLa hücreleri, W163 hücreleri, 211 hücreleri ve 211A hücrelerini içerir. Tercih edilen yapılanmalarda, ambalaj hücreleri 293 hücreleri, 293T hücreleri ya da A549 hücreleridir. Tercih edilen başka bir yapılanmada, hücreler A549 hücreleridir.

Burada kullanıldığı şekli ile "üretici hücre hattı" terimi, bir paketleme hücresi hattı ve bir paketleme sinyali içeren bir transfer vektörü yapısı içeren, rekombinant retroviral parçacıkları

üretebilen bir hücre hattına karşılık gelir. Enfeksiyöz viral parçacıkların ve viral stok solüsyonlarının üretimi geleneksel teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Viral stok solüsyonları hazırlama metotları, tekniğin mevcut durumunda bilinmektedir ve örnek olarak, Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, ve N. R. Landau et al.(1992) J. Virol.66: 5110-5113'de gösterilmiştir. Bulaşıcı virüs parçacıkları, geleneksel teknikler kullanılarak paketlenen hücrelerinden toplanabilir. Örnek olarak, enfeksiyöz parçacıklar, teknikte bilindiği gibi hücre lizisi ya da hücre kültürünün süpernatantı toplanması ile toplanabilir. İsteğe bağlı olarak, toplanan virüs parçacıkları eğer arzu edilirse saflaştırılabilir. Uygun saflaştırma teknikleri, teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinmektedir.

- 10 Bir retroviral ya da lentiviral vektör kullanılarak bir genin (genlerin) ya da başka bir polinükleotit sekansının transfeksiyondan ziyade viral enfeksiyon yolu ile verilmesi "kalıt aktarım" olarak adlandırılır. Bir yapılanmada, retroviral vektörler, enfeksiyon ve provirüs entegrasyonu yolu ile bir hücreye kalıt aktarılır. Belirli yapılanmalarda, eğer bir hücre, bir viral ya da retroviral vektör enfeksiyonu yolu ile bir hücreye gönderilmiş olan bir gen ya da öteki
- 15 polinükleotit sekansı içeriyor ise, kalıt aktarılmıştır. Belirli yapılanmalarda, kalıt aktarılmış bir hücre, hücresel genomu içindeki bir retroviral ya da lentiviral vektör yolu ile gönderilmiş olan gen ya da öteki polinükleotit sekansını içerir.

- Belirli yapılanmalarda, terapötik bir polipeptidi, örnek olarak, bir ABCD1 polipeptidini eksprese eden, buluşun viral vektörü ile kalıt aktarılan konakçı hücreler, adrenölkodistrofi ya
- 20 da adrenomiyeloneuropati gibi bir hastalığın, bozukluğun, ya da durumun iyileştirilmesi ve/veya önlenmesi için bir deneğe uygulanmasında kullanım içindir. Mevcut buluşun belli yapılanmalarının kullanılabileceği gen terapisinde viral vektörlerin kullanımına ilişkin diğer metotlar, örnek olarak, Kay, M. A. (1997) Chest 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) Hum.Gene Ther.9: 1975-1981; Shiratory, Y. et al. (1999) Liver 19:265-
- 25 74; Oka, K. et al.(2000) Curr.Opin.Lipidol. 11:179-86; Thule, PM and Liu, JM (2000) Gene Ther.7: 1744-1752; Yang, NS (1992) Krit.Rev. Biotechnol.12:335-56; Alt, M. (1995) J. Hepatol.23:746-58; Brody, SL and Kristal, RG (1994) Ann.N.Y. Acad.Sci.716:90-101; Strayer, DS (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep 3: 43-49; ve Lee, HC etal. (2000) Nature 408:483-8'da
- 30 bulunabilir.

- Burada kullanıldığı şekli ile, içerik aksini açıkça göstermedikçe, "tedavi" ve "tedavi edilen", "tedavi etme" vb. gibi benzer kelimeler, yararlı ve istenen sonuçları elde etmek için ve tercihen klinik sonuçları içeren bir yaklaşımı gösterir. Tedavi, isteğe bağlı olarak, hastalığın ya da durumun semptomlarının azaltılması ya da iyileştirilmesi ya da hastalığın ya da
- 35 durumun ilerlemesinin geciktirilmesini içerebilir.

Burada kullanıldığı şekli ile, içerik aksini açıkça göstermedikçe, "önlemek" ve "önlenmiş", "önleyen" vb. gibi benzer kelimeler, hastalık ya da durumun ortaya çıkma ya da tekrarlanma olasılığını önlemek, engellemek ya da azaltmak için bir yaklaşımı gösterir. Bu, aynı zamanda bir hastalık ya da durumun başlangıcını ya da tekrarlamasını geciktirmeyi ya da bir hastalık ya da durumun semptomlarının ortaya çıkmasını ya da tekrarlanmasını geciktirmeyi de kapsar. Burada kullanıldığı şekli ile "önleme" ve benzer kelimeler, aynı zamanda, hastalık ya da durumun başlangıcından ya da nüksetmesinden önce bir hastalığın ya da durumun yoğunluğunu, etkisini, semptomlarını ve/ veya yükünü azaltmayı da içerir.

5

10

Burada kullanıldığı şekli ile, kalıt aktarılmış bir konakçı hücrenin ya da bir maddenin "etkili bir miktarı" ya da "terapötik olarak etkili bir miktarı", klinik sonuçlar da dahil olmak üzere, yararlı sonuçlar gibi arzu edilen bir biyolojik etkiyi etkilemek için yeterli miktardır.

15

20

Burada kullanıldığı şekli ile "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı", farmasötik olarak kabul edilebilir hücre kültür ortamı dahil olmak üzere, fizyolojik olarak uyumlu olan her türlü ve herhangi bir çözücüyü, dispersiyon ortamını, kaplamaları, antibakteriyel ve antifungal maddeleri, izotonik ve absorpsiyon geciktirici maddeleri ve benzerlerini içerir. Bir yapılanmada, taşıyıcı, parenteral uygulama için uygundur. Taşıyıcı intravasküler (örnek olarak, intravenöz ya da intraarteriyel), intraperitoneal ya da intramüsküler uygulama için uygun olabilir. Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar arasında steril sulu solüsyonlar ya da dispersiyonlar ve steril enjekte edilebilir çözeltilerin ya da dispersiyonun ektemporane hazırlanması için steril tozlar bulunur. Farmasötik olarak aktif maddeler için bu gibi ortam ve maddelerin kullanımı teknikte iyi bilinmektedir. Herhangi bir geleneksel ortam ya da maddenin kalıt aktarılmış hücreler ile uyumsuz olduğu durumlar haricinde, buluşun farmasötik bileşimlerinde kullanımı tasarlanmaktadır.

25

"A", "an" ve "the" tanımlıkları, tanımlığın gramer nesnesinin birine ya da birden fazlasına (yani en az birine) atıfta bulunmak için kullanılmıştır. Örnek olarak, "bir öge", bir öge ya da birden fazla öge anlamına gelir.

30

Alternatifin (örnek olarak, "ya da") kullanımı, alternatiflerin biri, her ikisi ya da bunların herhangi bir kombinasyonu anlamına gelecektir. Burada kullanıldığı şekli ile "içerme" ve "içerir" terimleri eş anlamlı şekilde kullanılmaktadır.

Burada kullanıldığı şekli ile "yaklaşık" ya da "yaklaşık olarak" terimi, referans miktar, seviye, değer, sayı, frekans, yüzde, ebat, boyut, miktar, ağırlık ya da uzunluk için % 15, % 10, % 9 % 8, % 7, % 6, % 5, % 4, % 3, % 2 ya da % 1'e kadar değişen bir miktar, seviye, değer, sayı, frekans, yüzde, ebat, boyut, miktar, ağırlık ya da uzunluk anlamına gelir. Bir yapılanmada, "yaklaşık" ya da "yaklaşık olarak" terimi, referans miktar, seviye, değer, sayı, frekans, yüzde,

ebat, boyut, miktar, ağırlık ya da uzunluk için yaklaşık olarak $\pm\%$ 15, $\pm\%$ 10, $\pm\%$ 9, $\pm\%$ 8, $\pm\%$ 7, $\pm\%$ 6, $\pm\%$ 5, $\pm\%$ 4, $\pm\%$ 3, $\pm\%$ 2 ya da $\pm\%$ 1 miktar, seviye, değer, sayı, frekans, yüzde, ebat, boyut, miktar, ağırlık ya da uzunluk anlamına gelir.

5 Bu tarifname boyunca, içerik başka türlü gerektirmedikçe, "içermek", "içerir" ve "içeren" kelimeleri, belirtilen herhangi bir adımın ya da öğenin ya da adım ya da öge gruplarının dahil edilmesini ima ettiği, ancak başka herhangi bir adım ya da öge ya da adım ya da öge grubunun hariç tutulmadığı şeklinde anlaşılacaktır. "Oluşmaktadır" ifadesi ile, "oluşmaktadır" ifadesini takip eden her ne ise, bunu "içeren" ve bunun ile sınırlı olan ifade edilmek istenmektedir. Bu neden ile, "oluşmaktadır" ifadesi listelenen öğelerin gerekli ve zorunlu 10 olduğu, başka herhangi bir öğenin mevcut olmayabileceğini göstermektedir. "Esas olarak oluşmaktadır" ifadesi, ifade sonrasında listelenen öğelerin dahil edilmesi anlamına gelir ve listelenen öğeler için açıklamada belirtilen aktivite ve aksiyonlara dahil olmayan ya da bunlara katkıda bulunmayan öteki öğeler için sınırlı olduğu şeklinde anlaşılacaktır. Dolayısı ile, "esas olarak oluşmaktadır" ifadesi listelenen öğelerin gerekli ve zorunlu olduğunu 15 gösterir, fakat isteğe bağlı olan başka hiçbir öğenin olmayacağını ve listelenen öğelerin aktivite ya da aksiyonlarını etkileyip etkilemediklerine bağlı olarak mevcut olabilecekleri ya da mevcut olamayacaklarını gösterir.

20 Bu tarifname boyunca "(a) bir yapılanma" ya da "(an) bir düzenleme"ye atıfta bulunmak, yapılanma ile bağlantılı olarak tarif edilen özel bir özellik, yapı ya da karakteristiğinin, mevcut buluşun en az bir yapılanmasına dahil edildiği anlamına gelir. Dolayısı ile, bu tarifname boyunca çeşitli yerlerde "(a) bir yapılanmada" ya da "(an) bir yapılanmada" ifadelerin bulunması, hepsinin aynı yapılanmaya değinmesini gerektirmez. Ayrıca, belirli özellikler, yapılar ya da karakteristikler, bir ya da daha fazla yapılanmada uygun herhangi bir şekilde birleştirilebilir.

25 Aşağıdaki açıklamada, buluşun çeşitli yapılanmalarının tam olarak anlaşılmasını sağlamak için belirli spesifik detaylar ortaya konmuştur. Bununla birlikte, teknikte uzman bir kişi, buluşun bu detaylar olmadan uygulanabileceğini anlayacaktır. Ek olarak, burada tarif edilen yapıların ve ornatıkların çeşitli kombinasyonlarından türetilen bireysel vektörler ya da vektör 30 grupları, mevcut başvuru tarafından sanki her bir vektör ya da vektör grupları tek tek açıklanmış gibi aynı ölçüde açıklanmaktadır. Dolayısı ile, özel vektör yapılarının ya da özel ornatıkların seçimi, mevcut açıklamanın kapsamı dahilindedir.

C. Viral Vektörler

Retroviral ve lentiviral vektörler test edilmiş ve geniş bir hedef hücrenin genomuna ilgilenilen genlerin kararlı bir şekilde sokulması için uygun taşıyıcı araçlar olduğu bulunmuştur. Birçok

vektör tasarımı, FLAP, RRE ve HPRE ya da WPRE sekanslarını içererek maksimum kalıt aktarım verimliliği ve transgen ekspresyonu için optimize edilmiştir. Özellikle, bu konuda ortalama bilgiye sahip kişiler, transgen ekspresyonunu arttırmak için genellikle translasyon sonrası düzenleyici sekansları içerir. Şaşırtıcı bir şekilde, mevcut buluş sahipleri bir WPRE 5 sekansının dahil edilmesinin ekspresyonu anlamlı bir şekilde arttırmadığını keşfetmişlerdir.

Bu konfigürasyon, 5' kısmı, heterolog nükleik asit kodlama sekanslarını içeren ve 3' kısmı, transkripsiyon sonrası düzenleyici öge sekansını içeren bir mRNA transkriptinin sentezi ile sonuçlanır. Tercih edilen yapılanmalarda, buluşun vektörleri bir WPRE ya da HPRE gibi bir transkripsiyon sonrası düzenleyici öğeden yoksundur ya da onu içermez, çünkü bazı 10 durumlarda bu öğeler hücrel transformasyon riskini artırır ve/ veya mRNA transkript miktarını ya da mRNA stabilitesini büyük ölçüde ya da kayda değer miktarda arttırmaz. Bu neden ile, bazı yapılanmalarda, buluşun vektörleri ek bir güvenlik önlemi olarak bir WPRE ya da HPRE'den yoksundur ya da bunu içermez.

Mevcut buluş ayrıca, mevcut buluşun metotlarını uygulamak için kullanılabilen transfer 15 vektörlerini de sağlar.

Teknikte uzman bir kişi, bu tür transfer vektörlerinin, çeşitli farklı viral vektörler kullanılarak üretilebileceğini takdir edecekse de, özel yapılanmalarda, lentiviral vektörler transgenlerin in vitro ve in vivo olarak bölünmeyen hücrelere ayrılmasında verimli gönderim, entegrasyon ve uzun süreli ekspresyon sağlayabildiği için, transfer vektörü bir lentiviral vektördür. Tekniğin 20 mevcut durumunda çeşitli lentiviral vektörler bilinmektedir, bakınız, Naldini et al, (1996a, 1996b, and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, U.S. Pat. No'ları 6,013,516; ve 5,994,136; bunların herhangi biri mevcut buluşun bir transfer vektörünü üretmek için adapte edilebilir. Genel olarak, bu vektörler, plazmid bazlı ya da virüs bazlıdır ve bir terapötik polipeptidi kodlayan bir nükleik asidin bir konakçı hücreye aktarılması için gerekli sekansları 25 taşımak üzere yapılandırılmıştır.

Lentiviral genom ve proviral DNA, retrovirüslerde bulunan üç gen içerir: iki uzun terminal tekrarı (LTR) sekansı tarafından kuşatılmış olan gag, pol ve env. GAG geni, iç yapısal (matris, kapsid ve nükleokapsid) proteinleri kodlar; pol geni, RNA yönelimli DNA polimerazını (ters transkriptaz), bir proteazı ve bir integrazı kodlar; ve env geni viral zarf glikoproteinlerini 30 kodlar. 5' ve 3' LTR'ler, sırası ile, virion RNA'larının transkripsiyonunu ve poliadenilasyonunu başlatmaya hizmet ederler. Lentivirüsler vif, vpr, tat, rev, vpu, nef ve vpx dahil olmak üzere ek genlere sahiptir. 5' LTR'ye komşu olan, genomun (tRNA primer bağlama alanı) ters transkripsiyonu için ve viralin RNA'nın parçacıklara (Psi alanı) verimli bir şekilde kapsidasyonu için gerekli sekanslardır.

Başka yapılanmalarda, lentiviral vektör bir HIV vektörüdür. Dolayısı ile, vektörler, insan immün yetmezlik-1 (HIV-1), insan immün yetmezlik-2 (HIV-2), simian immün yetmezlik virüsü (SIV), kedi immün yetmezlik virüsü (FIV), sığır immün yetmezlik virüsü (BIV), Jembrana Hastalık virüsü (JDV), ekuin enfeksiyöz anemi virüsü (EIAV), kaprin artrit ensefalit virüsü (CAEV) ve benzerlerinden türetilir. HIV bazlı vektör omurgaları (yani, HIV cis etkileyici sekans elemanları ve HIV gag, pol ve rev genleri), mevcut buluşun çoğu yönü ile bağlantılı olarak genellikle tercih edilir, çünkü HIV bazlı yapılar, insan hücrelerinin kalıt aktarımında etkili olanlardır.

Çeşitli yapılanmalarda, buluşun vektörleri, adrenolökodistrofiler ve/ veya adrenomiyelonöropatiler için tedavi sağlayan bir polipeptidi kodlayan bir gene işlevsel şekilde bağlı olan bir mikrogliyal hücrede işlevsel olarak bir başlatıcı içerir. Vektörlerin bir ya da daha fazla LTR'si mevcut olabilir olup, içerisinde LTR bir ya da daha fazla nükleotit ornatımı, ilavesi ya da delesyonu gibi bir ya da daha fazla modifikasyon içerir. Vektörler ayrıca, buluşun vektörlerinin bir WPRE veya HPRE içermemesi dışında, kalıt aktarım verimliliğini (örnek olarak, bir cPPT/FLAP), viral paketlemeyi (örnek olarak, bir Psi (Ψ) paketleme sinyali, RRE) ve/ veya terapötik gen ekspresyonunu arttıran (örnek olarak poli(A) sekansları) diğer öğeleri arttırmak için daha fazla yardımcı öğelerden birini içerebilir.

Bir özel örnekte, açıklamanın transfer vektörü aşağıdakileri içermekte olup: bir sol (5') retroviral LTR; bir merkez polipürin kanalı/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir retroviral dışarı aktarım öğesi; bir ATP bağlayıcı kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir mikrogliyal hücrede aktif olan bir başlatıcı; ve bir sağ (3') retroviral LTR; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici öğesini (WPRE) içermez.

Bir özel örnekte, açıklamanın transfer vektörü aşağıdakileri içermekte olup: bir sol (5') retroviral LTR; bir merkez polipürin kanalı/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir retroviral dışarı aktarım öğesi; bir ATP bağlayıcı kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir mikrogliyal hücrede aktif olan bir başlatıcı; bir sağ (3') retroviral LTR; ve bir poli (A) sekansı, içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici öğesini (WPRE) içermez. Bir başka özel örnekte, açıklama aşağıdakileri içeren bir lentiviral vektörünü içermekte olup: bir sol (5') LTR; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini (örnek olarak, SEK ID NO:1 ila 2) kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; bir sağ (3') LTR; ve bir poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici öğesi (WPRE) içermez.

Belirli bir yapılanmada, buluş aşağıdakileri içeren bir lentiviral vektörünü içermekte olup: bir sol (5') HIV-1 LTR; bir Psi (XF) paketleme sinyali; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; bir sağ (3') kendi kendini inaktive eden (SIN) HIV-1 LTR; ve bir bir sentetik tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesi (WPRE) içermez.

Bir başka örnekte, açıklama, aşağıdakileri içeren bir vektör sağlamakta olup: en az bir LTR; bir merkez polipürin kanalı/ DNA kanadı (cPPT/ FLAP); bir retroviral dışarı aktarım ögesi; ve bir ATP bağlayıcı kaseti, alt aile D, üye 1 (ABCD1) polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir mikrogliyal hücrede aktif olan bir başlatıcı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesini (WPRE) içermez.

Ozel bir örnekte, mevcut açıklama, aşağıdakileri içeren bir vektörü sağlamakta olup: en az bir LTR; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini kodlayan bir polinükleotide işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; ve bir poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesi (WPRE) içermez.

Belirli bir örnekte, mevcut açıklama, aşağıdakileri içeren bir vektörü sağlamakta olup: en az bir SIN HIV-1 LTR; bir Psi (XF) paketleme sinyali; bir cPPT/ FLAP; bir RRE; bir insan ABCD1 polipeptidini kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı; ve bir tavşan β -globin poliadenilasyon sekansı; içerisinde vektör, bir dağ sıçanı transkripsiyon sonrası düzenleyici ögesi (WPRE) içermez.

Teknikte uzman kişiler, diğer birçok farklı örneğin, terapötik transgen, bir WPRE ya da HPRE ögesi olmayan bir retroviral vektörde mikrogliyal hücrede eksprese edileceği şekilde mevcut buluşun mevcut örneklerinden üretilebileceğini takdir edeceklerdir.

D. Bileşimler ve Formülasyonlar

Mevcut açıklama ayrıca burada tarif edilen metotlara göre üretilmiş kalıt aktarılmış hücreleri ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı içeren farmasötik bileşimleri içerir. Taşıyıcı, parenteral uygulama için uygun olabilir. Taşıyıcı intravenöz, intraperitoneal ya da intramüsküler uygulama için uygun olabilir. Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar arasında steril sulu solüsyonlar ya da dispersiyonlar ve steril enjekte edilebilir çözeltilerin ya da dispersiyonun ektemporane hazırlanması için steril tozlar bulunur. Farmasötik olarak aktif maddeler için bu gibi ortam ve maddelerin kullanımı teknikte iyi bilinmektedir.

- Açıklamanın bileşimleri, bir hücreye ya da bir hayvana tek başına ya da bir veya daha fazla başka tedavi modalitesi ile kombinasyon halinde uygulama için farmasötik olarak kabul edilebilir ya da fizyolojik olarak kabul edilebilir solüsyonlarda formüle edilmiş, burada tarif edilen, polipeptitler, polinükleotitler, bunları içeren vektörler, aynı kalıt aktarıma uğramış hücreler, vs. içerebilir. Aynı zamanda, eğer arzu edilirse, açıklamanın bileşimlerinin, örnek olarak, diğer proteinler, polipeptitler, küçük moleküller ya da çeşitli farmasötik olarak aktif maddeler gibi başka maddeler ile kombinasyon halinde uygulanabileceği anlaşılabilecektir. Ek maddelerin, bileşimin amaçlanan gen terapisini sağlama kabiliyetini olumsuz etkilememesi koşulu ile, bileşimlere de dahil edilebilecek diğer bileşenlere neredeyse hiç bir sınır yoktur.
- 5
- 10 Açıklamanın farmasötik bileşimlerinde, farmasötik olarak kabul edilebilir ara maddelerin ve taşıyıcı solüsyonların formülasyonu, burada açıklanan belirli bileşimlerin çeşitli kullanımları için uygun dozlama ve oral, parenteral, intravenöz, intranazal ve intramüsküler uygulama ve formülasyon dahil olmak üzere tedavi rejimlerinin geliştirilmesinin olduğu gibi, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir.
- 15 Belirli durumlarda, burada tarif edilen bileşimlerin parenteral, intravenöz, intramüsküler ya da hatta intraperitoneal olarak gönderilmesi, örnek olarak US Pat. 5,543,158; US Pat. 5,641,515 ve US Pat. 5,399,363'de tarif edildiği gibi arzu edilir olacaktır. Aktif bileşiklerin serbest baz ya da farmakolojik olarak kabul edilebilir tuzlar olarak solüsyonları, hidroksipropilselüloz gibi bir yüzey aktif madde ile uygun şekilde karıştırılmış suda hazırlanabilir. Dispersiyonlar aynı zamanda, gliserol, sıvı polietilenglikoller ve bunların karışımları ve yağlarda da hazırlanabilir. Normal depolama ve kullanım koşulları altında, bu preparatlar mikroorganizmaların büyümesini önlemek için bir koruyucu içerir.
- 20
- Enjekte edilebilir kullanım için uygun olan farmasötik formlar steril sulu solüsyonları ya da dispersiyonları ve steril enjekte edilebilir solüsyonların ya da dispersiyonların (US Pat. No. 25 5,466,468) hazırlıksız hazırlanması için steril tozları içerir. Her durumda, form steril olmalıdır ve kolay şırınga edilebilirlik derecesine kadar sıvı olmalıdır. Üretim ve depolama koşulları altında stabil olmalı ve bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmaların kirletici etkisine karşı korunmalıdır. Taşıyıcı, örnek olarak su, etanol, poliol (örnek olarak, gliserol, propilen glikol ve sıvı polietilen glikol ve benzeri), bunların uygun karışımları ve/veya bitkisel yağları içeren bir 30 çözücü ya da dispersiyon ortamı olabilir. Uygun akışkanlık, örnek olarak, lesitin gibi bir kaplamanın, dispersiyon durumunda gerekli parçacık boyutunun korunması ve yüzey aktif maddelerin kullanımı ile muhafaza edilebilir. Mikroorganizmaların etkisinin önlenmesi, çeşitli antibakteriyel ve antifungal maddeler, örnek olarak parabenler, klorobütanol, fenol, sorbik asit, timerosal ve benzerleri ile kolaylaştırılabilir. Birçok durumda, örnek olarak şekerler ya da 35 sodyum klorür gibi izotonik maddelerin dahil edilmesi tercih edilecektir. Enjekte edilebilir

bileşimlerin uzun süreli emilimi, örnek olarak alüminyum monostearat ve jelatin gibi emilimi geciktiren maddelerin bileşimlerinde kullanım ile sağlanabilir.

5 Sulu bir solüsyon içinde parenteral uygulama için, örnek olarak, solüsyon gerektiğinde uygun şekilde tamponlanmalıdır ve sıvı seyreltici ilk önce yeterli salin ya da glukoz ile izotonik hale getirilmelidir. Bu özel sulu çözeltiler, özellikle intravenöz, intramüsküler, subkütanöz ve intraperitoneal uygulama için uygundur. Bu bağlamda, kullanılabilen steril bir sulu ortam, mevcut açıklamanın ışığı altında, teknikte uzman kişilerce bilinecektir. Örnek olarak, bir dozaj 1 ml izotonik NaCl çözeltisi içinde çözülebilir ve, ya 1000 ml hipodermositiz sıvısına eklenebilir ya da önerilen infüzyon alanına enjekte edilebilir (bakınız örnek olarak, 10 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000). Tedavi edilmekte olan deneğin durumuna bağlı olarak, dozajda bazı değişiklikler zorunlu olarak gerçekleşecektir. Uygulamadan sorumlu kişi, her halükarda, bireysel denek için uygun dozu belirleyecektir. Ayrıca, insani uygulama için preparatlar, sterilite, pirojenisite ve FDA Biyoloji Standart Ofisi standartlarının gerektirdiği genel güvenlik 15 ve saflık standartlarını karşılamalıdır.

Steril enjekte edilebilir solüsyonlar, aktif bileşiklere gereken miktarda uygun çözücü içinde, yukarıda sayılan çeşitli diğer bileşenlerle, gerektiği şekilde, filtre edilmiş sterilizasyon ile birleştirilerek hazırlanabilir. Genel olarak, dispersiyonlar, çeşitli sterilize edilmiş aktif bileşenlerin, bazik dispersiyon ortamını ve yukarıda sayılanlardan gerekli olan diğer 20 bileşenleri içeren steril bir araca dahil edilmesi ile hazırlanır. Steril enjekte edilebilir solüsyonların hazırlanması için steril tozlar söz konusu olduğunda, tercih edilen hazırlama metotları, aktif terkip maddesinin bir tozunu ve daha önce steril olarak filtrelenmiş bir solüsyondan herhangi bir ilave terkip maddesini veren vakum ile kurutma ve dondurarak kurutma teknikleridir.

25 Burada açıklanan bileşimler nötr ya da tuz formunda formüle edilebilir. Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar, asit ekleme tuzlarını (proteinin serbest amino grupları ile oluşturulmuş) içerir ve örnek olarak hidroklorik ya da fosforik asitler gibi inorganik asitler ile ya da asetik, oksalik, tartarik, mandelik ve benzerleri gibi organik asitler ile oluşturulur. Serbest karboksil grupları ile oluşturulan tuzlar, örnek olarak sodyum, potasyum, amonyum, kalsiyum ya da 30 ferrik hidroksitler gibi inorganik bazlardan ve izopropilamin, trimetilamin, histidin, prokain ve benzeri gibi organik bazlardan türetilebilir. Formülasyon üzerine, solüsyonlar, dozaj formülasyonu ile uyumlu bir şekilde ve terapötik olarak etkili miktarda uygulanacaktır. Formülasyonlar, enjekte edilebilir solüsyonlar, ilaç salma kapsülleri ve benzerleri gibi çeşitli dozaj formlarında kolaylıkla uygulanır.

Burada kullanıldığı hali ile, "taşıyıcı", her türlü çözücüyü, dispersiyon ortamını, taşıtları, kaplamaları, seyrelticileri, antibakteriyel ve antifungal maddeleri, izotonik ve absorpsiyon geciktirme maddelerini, tamponları, taşıyıcı solüsyonları, süspansiyonları, kolloidleri ve benzerlerini içermektedir. Farmasötik olarak aktif maddeler için bu gibi ortam ve maddelerin kullanımı teknikte iyi bilinmektedir. Herhangi bir geleneksel ortamın veya madde aktif bileşenin ile uyumsuz olduğu durumlar haricinde, buluşun terapötik bileşimlerinde kullanımı tasarlanmaktadır. Tamamlayıcı aktif bileşenler de bileşimlere dahil edilebilir.

"Farmasötik olarak kabul edilebilir" ifadesi, bir insana uygulandığında alerjik ya da benzer bir istenmeyen reaksiyon oluşturmeyen moleküler varlıkları ve bileşimleri belirtir. Aktif bir bileşen olarak bir protein içeren bir sulu bileşimin hazırlanması, teknikte iyi anlaşılmaktadır. Tipik olarak, bu tip bileşimler ya sıvı solüsyonlar ya da süspansiyonlar halinde enjekte edilebilir maddeler olarak hazırlanır; enjeksiyon öncesinde sıvı içinde çözelti ya da süspansiyon içinde uygun katı formlar da hazırlanabilir. Hazırlık aynı zamanda emülsiyonlaştırılabilir.

Bileşimler intranazal spreyleyler, inhalasyon ve/ veya diğer aerosol gönderim araçları ile gönderilebilir. Genleri, polinükleotitleri ve peptit bileşimlerini doğrudan nazal aerosol spreyleyler vasıtası ile akciğerlere iletmeye yönelik metotlar, örnek olarak., US Pat. 5,756,353 ve US Pat. No. 5,804,212'de tarif edilmiştir. Benzer şekilde, intranazal mikroparçacık reçineleri (Takenaga et al, 1998) ve lizofosfatidil-gliserol bileşikleri (US Patent No. 5,725,871) kullanılarak ilaçların verilmesi de farmasötik tekniğinde iyi bilinmektedir. Benzer şekilde, bir polipropafloeroetilen destek matrisi formunda transmukozal ilaç gönderme US Pat. No. 5,780,045'de tarif edilmiştir.

Gönderim, mevcut açıklamanın bileşimlerinin uygun konakçı hücreler içine sokulması için lipozomlar, nanokapsüller, mikroparçacıklar, mikroküreler, lipit parçacıkları, veziküller, isteğe bağlı olarak CPP polipeptitleri ile karıştırma ve benzerleri kullanılarak meydana gelebilir. Özellikle, mevcut açıklamanın bileşimleri, ya bir lipit parçacık, bir lipozom, bir kesecik, bir nanosfer, bir nanoparçacık ya da benzerleri içinde kapsüllenmiş olarak verilecek şekilde formüle edilebilir. Bu tür taşıma araçlarının formülasyonu ve kullanımı, bilinen ve geleneksel teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Açıklamanın formülasyonları ve bileşimleri, bir hücreye ya da bir hayvana, tek başına ya da bir ya da daha fazla başka tedavi modalitesi ile kombinasyon halinde uygulama için, farmasötik olarak kabul edilebilir ya da fizyolojik olarak kabul edilebilir solüsyonlarda (örnek olarak, kültür ortamı) formüle edilen, burada tarif edilen herhangi bir sayıda polipeptit, polinükleotit ve küçük moleküllerin bir kombinasyonundan oluşan bir ya da daha fazla sayıda bastırıcı ve/ veya aktivatör içerebilir. Aynı zamanda, eğer arzu edilirse, açıklamanın bileşimlerinin, örnek olarak, hücreler diğer proteinler ya da

polipeptitler ya da çeşitli farmasötik olarak aktif maddeler gibi başka maddeler ile kombinasyon halinde uygulanabileceği anlaşılabacaktır.

5 Özel bir örnekte, mevcut açıklamaya göre bir formülasyon ya da bileşim, burada tarif edildiği gibi herhangi bir sayıda polipeptit, polinükleotit ve küçük moleküllerin bir kombinasyonu ile temas ettirilen bir hücreyi içerir.

Belirli yönlerden, mevcut açıklama, bunlar ile sınırlı olmamakla birlikte retroviral (örnek olarak, lentiviral) vektörler dahil olmak üzere, viral vektör sistemlerinin (örnek olarak, viral aracılı kalıt aktarım) verilmesine uygun formülasyonlar ya da bileşimler sağlar.

10 Ex vivo uygulama için örnek teşkil eden formülasyonlar, aynı zamanda, kalsiyum fosfat, elektroporasyon, ısı şoku ve çeşitli lipozom formülasyonları (yani, lipit aracılı transfeksiyon) gibi teknikte bilinen çeşitli transfeksiyon maddelerinin kullanımını da içerebilir. Aşağıda daha ayrıntılı olarak tarif edildiği gibi lipozomlar, bir sulu sıvı fraksiyonunu içine alan lipit çift katmanlandırıcılardır. DNA kendiliğinden katyonik lipozomların dış yüzeyine bağlanır (yükü sayesinde) ve bu lipozomlar hücre zarı ile etkileşime girer.

15 Belirli yönlerden, mevcut açıklama, burada tarif edildiği gibi, bir ya da daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı (katkı maddesi) ve/ veya seyreltici (örnek olarak, farmasötik olarak kabul edilebilir hücre kültürü ortamı) ile birlikte formüle edilen, bir ya da daha fazla polinükleotit ya da polipeptidin terapötik olarak etkili bir miktarını içeren farmasötik olarak kabul edilebilir bileşimler sağlar.

20 Açıklamanın özel örnekleri, farmasötik alanda iyi bilinenler gibi başka formülasyonları içerebilir ve örnek olarak Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000'da tarif edilir.

E. Gen Terapi Metotları

25 Retroviral vektörler, adrenolökodistrofi ve adrenomiyelonöropati gen terapisinin geliştirilmiş metotlarını sağlar. Bu açıklamada kullanıldığı hali ile, "gen terapisi" terimi, bir genin bir hücrenin genomuna sokulması anlamına gelir. Çeşitli yapılanmalarda, buluşun bir viral vektörü, bir adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiye sahip olduğundan şüphelenilen bir deneğe tedavi edici, önleyici ya da iyileştirici faydalar sağlayan bir polipeptidi kodlayan bir terapötik transgeni eksprese eden bir başlatıcı içerir. Virüs, hücreyi in vivo, ex vivo ya da in

30 vitro olarak enfekte edebilir ve kalıt aktarımını yapabilir. Ex vivo ve in vitro yapılanmalarda, kalıt aktarılmış hücreler daha sonra terapiye ihtiyaç duyan bir deneğe uygulanabilir. Mevcut buluş, bu buluşun vektör sistemlerinin, viral parçacıklarının ve kalıt aktarılmış hücrelerinin, bir

denekte adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavi etmek, önlemek ve/ veya iyileştirmek için kullanılabileceğini tasarlamaktadır.

5 Çeşitli yapılanmalarda, retroviral vektörler, in vivo olarak gen terapisine ihtiyaç duyan bir deneğin bir hücrelerine, dokusuna ya da organına doğrudan enjeksiyon ile uygulamakta kullanım içindir. Çeşitli başka yapılanmalarda hücreler, buluşun vektörleri ile in vitro ya da ex vivo olarak kalıt aktarıma tabi tutulur. Kalıt aktarıma uğramış hücreler daha sonra, adrenolökodistrofi ya da adrenomyelonöropatiye sahip olan bir deneğe uygulanmaya yöneliktir.

10 Buluş bağlamında açıklanan gen terapisi metotlarında kalıt aktarım ve uygulama için uygun hücreler arasında, bunlar ile sınırlı olmamakla birlikte, kök hücreler, ata hücreler ve farklılaşmış hücreler bulunur. Belirli yapılanmalarda, kalıt aktarıma uğramış hücreler, kemik iliği kök hücreleri, göbek kordonu kök hücreleri ya da mezenkimal kök hücrelerdir.

15 Çeşitli yapılanmalarda, kök hücrelerin kullanılması tercih edilir, çünkü bunlar in vivo olarak belirli bir biyolojik niş içine uygulandığında uygun hücre tiplerine farklılaşma kabiliyetine sahiptirler. "Kök hücre" terimi, (1) uzun vadeli kendi kendine yetme kabiliyetine sahip olan farklılaşmamış bir hücre ya da orijinal hücrenin en az bir özdeş kopyasını üretme kabiliyetini, (2) tek hücre seviyesinden birden fazla, ve bazı durumlarda sadece bir, özel hücre tipine farklılaşmayı ve (3) dokuların in vivo fonksiyonel yenilenmeyi ifade eder. Kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent ve oligo/ unipotent olarak gelişimsel potansiyellerine göre 20 alt sınıflara ayrılır. "Kendini yenileme", değiştirilmemiş yavru hücrelerini üretmek ve özel hücre tiplerini (gücü) üretmek için eşsiz bir kapasiteye sahip olan bir hücreyi ifade eder. Kendini yenileme iki şekilde gerçekleştirilebilir. Asimetrik hücre bölünmesi, ebeveyn hücrelerine özdeş olan bir adet yavru hücre ve ebeveyn hücrelerinden farklı olan ve bir ata ya da farklılaşmış bir hücre olan bir tane yavru hücre üretir. Asimetrik hücre bölünmesi hücre 25 sayısını artırmaz. Simetrik hücre bölünmesi iki özdeş yavru hücre üretir. Hücrelerin "proliferasyonu" ya da "genişlemesi" simetrik olarak bölünen hücreleri ifade eder.

Burada kullanıldığı şekli ile "pluripotent" terimi, bir hücrenin, vücudun ya da somanın tüm soylarını (yani, embriyoya uygun) oluşturması yeteneğini ifade eder. Örnek olarak, embriyonik kök hücreler, üç mikrop katmanının, ektodermin, mezodermin ve endodermin her 30 birinden hücreler oluşturabilen bir pluripotent kök hücre türüdür. Burada kullanıldığı şekli ile "multipotent" terimi, bir yetişkin kök hücrelerinin bir soy çoklu hücre tiplerini oluşturma yeteneğini ifade eder. Örnek olarak, hematopoietik kök hücreler, örnek olarak, lenfoid ve miyeloid hücreleri gibi, kan hücreleri soyunun tüm hücrelerini oluşturabilir.

Burada kullanıldığı şekli ile "ata" ya da "ata hücreler" terimi, hücrelerin kendi kendini yenileme ve daha olgun hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu ifade eder. Pek çok ata hücre tek bir soyda farklılaşır, ancak oldukça geniş proliferatif kapasiteye sahip olabilir.

- 5 Hematopoietik kök hücreler (HSC'ler), bir organizmanın yaşam süresi boyunca olgun kan hücrelerinin tüm repertuarını üretebilen, hematopoietik ata hücrelere (HPC'ler) yol açmaktadır. "Hematopoietik kök hücre" ya da "HSC" terimi, miyeloid (örnek olarak, monositler ve makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, eritrositler, megakaryositler/ trombositler, dendritik hücreler dahil) ve lenfoid soylar (örnek olarak, T-hücreleri, B-hücreleri, NK-hücreleri) ve teknikte bilinen diğerleri bir organizmanın , (bakınız, Fei, R., et al., U.S. Patent No. 5,635,387; McGlave, et al., U.S. Patent No. 5,460,964; Simmons, P., et al., U.S. Patent No. 5,677,136; Tsukamoto, et al., U.S. Patent No. 5,750,397; Schwartz, et al., U.S. Patent No. 5,759,793; DiGuisto, et al., U.S. Patent No. 5,681,599; Tsukamoto, et al., U.S. Patent No. 5,716,827) tüm kan hücresi tiplerine yol açan çok hücreli kök hücrelere karşılık gelir. Öldürücü derecede ışınlanmış hayvanlara ya da insanlara nakledildiklerinde, hematopoietik kök ve ata hücreleri, eritroid, nötrofil makrofaj, megakaryosit ve lenfoid hematopoietik hücre havuzunu yeniden iskan edebilir.

- 20 Tercih edilen yapılanmalarda, kalıt aktarıma uğramış hücreler, kemik iliğinden, göbek kordonu kanından ya da periferik dolaşımdan izole edilen hematopoietik kök ve/ veya ata hücrelerdir. Özellikle tercih edilen yapılanmalarda, kalıt aktarıma uğramış hücreler, kemik iliğinden, göbek kordonu kanından ya da periferik dolaşımdan izole edilen hematopoietik kök hücrelerdir.

- 25 Buluşun hücreleri otolog/ otojenik ("kendiliğinden") ya da otolog olmayan ("kendiliğinden olmayan", örnek olarak, allojenik, sinojenik ya da ksenojenik) olabilir. Burada kullanıldığı şekli ile "otolog", aynı denekten gelen hücreler anlamına gelir. Burada kullanıldığı şekli ile "allojenik", kıyaslanan hücre ile genetik olarak farklılık gösteren aynı türün hücreleri anlamına gelir. Burada kullanıldığı şekli ile "sinojenik", kıyaslanan hücre ile genetik olarak tıpa tıp aynı olan farklı bir deneğin hücreleri anlamına gelir. Burada kullanıldığı şekli ile "ksenojenik", kıyaslanan hücre ile farklı bir türden olan hücreler anlamına gelir. Tercih edilen yapılanmalarda, buluşun hücreleri allojeniktir.

Burada kullanıldığı şekli ile, bir "denek", gen tedavisi vektörleri, hücre bazlı terapötikler ve burada başka bir yerde açıklanan metotlar ile tedavi edilebilen bir adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatinin bir semptomunu sergileyen herhangi bir hayvanı içerir. Uygun denekler (örnek olarak, hastalar), laboratuvar hayvanlarını (fare, sıçan, tavşan ya da gine

domuzu gibi), çiftlik hayvanlarını ve evsel hayvanları ya da evcil hayvanları (bir kedi ya da köpek gibi) içerir. İnsan olmayan primatlar ve tercihen insan hastalar dahildir. Tipik denekler, gen terapisi ile modüle edilebilen bir ya da daha fazla fizyolojik aktivitenin anormal miktarları ("normal" ya da "sağlıklı" bir denekten daha düşük ya da daha yüksek miktarlarda) sergileyen hayvanları içerir.

Burada kullanıldığı şekli ile "tedavi" ya da "tedavi etme" terimi, bir hastalık ya da patolojik durumun semptomları ya da patolojisi üzerinde herhangi bir yararlı ya da arzu edilen etkiyi içerir ve tedavi edilen hastalığın ya da durumun bir ya da daha fazla ölçülebilir marköründe en düşük düzeyde azalmaları içerebilir. Tedavi, isteğe bağlı olarak, hastalığın ya da durumun semptomlarının azaltılması ya da iyileştirilmesi ya da hastalığın ya da durumun ilerlemesinin geciktirilmesini içerebilir. "Tedavi", mutlaka hastalığın ya da durumun ya da bunlar ile ilişkili semptomların tamamen ortadan kaldırılmasını ya da iyileştirilmesini belirtmez.

Burada kullanıldığı şekli ile, "önlemek" ve "önlenmiş", "önleyen" vb. gibi benzer kelimeler, hastalık ya da durumun ortaya çıkma ya da tekrarlanma olasılığını önlemek, engellemek ya da azaltmak için bir yaklaşımı gösterir. Bu, aynı zamanda bir hastalık ya da durumun başlangıcını ya da tekrarlamasını geciktirmeyi ya da bir hastalık ya da durumun semptomlarının ortaya çıkmasını ya da tekrarlanmasını geciktirmeyi de kapsar. Burada kullanıldığı şekli ile "önleme" ve benzer kelimeler, aynı zamanda, hastalık ya da durumun başlangıcından ya da nüksetmesinden önce bir hastalığın ya da durumun yoğunluğunu, etkisini, semptomlarını ve/veya yükünü azaltmayı da içerir.

Burada kullanıldığı şekli ile "miktar" terimi, klinik sonuçlar da dahil olmak üzere yararlı ya da arzu edilen bir profilaktik ya da terapötik sonucu elde etmek için bir virüsün ya da kalıt aktarılmış terapötik bir hücrenin "bir miktar etkili" ya da "etkili bir miktar"ı anlamına gelir.

Bir "profilaktik olarak etkili miktar", arzu edilen profilaktik sonucu elde etmek için etkili olan bir virüs ya da kalıt aktarılmış terapötik hücre miktarına karşılık gelir. Tipik olarak fakat zorunlu olmamak ile birlikte, profilaktik bir doz, hastalığın erken evresinde ya da öncesinde bir denekte kullanıldığından, profilaktik olarak etkili miktar, terapötik olarak etkili miktardan daha azdır.

Bir virüsün ya da kalıt aktarılmış terapötik bir hücrenin "terapötik olarak etkili miktarı", bireyin hastalık durumu, yaşı, cinsiyeti ve ağırlığı gibi faktörlere ve kök ve progenitör hücrelerin bireyde arzu edilen bir tepkiyi ortaya çıkarma yeteneklerine göre değişebilir. Terapötik olarak etkili bir miktar aynı zamanda, virüsün ya da kalıt aktarıma tabi tutulmuş terapötik hücrelerin toksik ya da zararlı etkilerinin terapötik olarak faydalı etkilerden daha ağır bastığı bir

miktardır. "Terapötik olarak etkili miktar" terimi, bir deneği (örnek olarak, bir hasta) "tedavi etmek" için etkili olan bir miktarı içerir.

5 Tercih edilen bir yapılanmada, buluş, beyin mikroglial hücrelerine gelişme potansiyeli olan kalıt aktarılmış hücreler sağlar. Özel yapılanmalarda, hematopoietik kök hücreleri mevcut buluşun bir vektörü aracılığı ile kalıt aktarılmıştır ve adrenolökodistrofi ya da adrenomiyelonöropatiyi tedavinin bir metodunda kullanım içindir. Hematopoietik kök hücreler, beyin mikroglial hücrelerinin kökenidir ve bu neden ile tercih edilir.

10 Kalıt aktarıma uğramış hücreler, kemik iliği ablatif terapisine sahip olan ya da olmayan bir bireyde bir kemik iliği transplantının bir parçası olarak uygulanabilir. Bir yapılanmada, buluşun kalıt aktarılmış hücreleri kemoablatif ya da radyoablatif kemik iliği tedavisine maruz kalan bir kişiye bir kemik iliği transplantında uygulanır. Tercih edilen yapılanmalarda, denek genç bir erkektir.

15 Bir yapılanmada, kullanım, kalıt aktarılmış hücrelerin bir dozunun, bir deneğe intravenöz olarak verilmesini içerir. Tercih edilen yapılanmalarda, kullanım, kalıt aktarılmış hematopoietik kök hücrelerin bir deneğe intravenöz olarak uygulanmasını içerir.

20 Özel yapılanmalarda, kullanım, hastaların tek bir intravenöz dozda yaklaşık olarak 1×10^5 hücre/ kg, yaklaşık olarak 5×10^5 hücre/ kg, yaklaşık olarak 1×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 2×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 3×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 4×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 5×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 6×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 7×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 8×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 9×10^6 hücre/ kg, yaklaşık olarak 1×10^7 hücre/ kg, yaklaşık olarak 5×10^7 hücre/ kg, yaklaşık olarak 1×10^8 hücre/ kg ya da daha fazla kalıt aktarılmış hematopoietik kök hücre dozunun almasını içerir. Belirli bir yapılanmada, kullanım, hastaların yaklaşık olarak 1×10^5 hücre/ kg ile yaklaşık 1×10^8 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 1×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 1×10^8 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 1×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 9×10^6 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 2×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 8×10^6 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 2×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 8×10^6 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 2×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 5×10^6 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 3×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 5×10^6 hücre/ kg arasında, yaklaşık olarak 3×10^6 hücre/ kg ile yaklaşık olarak 4×10^8 hücre/ kg arasında, ya da hücre/ kg'nin herhangi araya giren bir doz miktarında kalıt aktarılmış hematopoietik kök hücrelerinin bir dozunun alması içermektedir.

Kalıt aktarıma uğramış hücreler, teknikte mevcut metotlar kullanılarak genişleme için sitokinler ile uyarılabilir. Çeşitli yapılanmalarda, kullanım, tedaviyi sürdürmek ya da arttırmak

için ihtiyaç duyulduğu kadarı ile, bu deneklere günler, aylar ya da yıllar boyunca 1, 2, 3, 4, 5 ya da daha fazla doz uygulanmaktadır.

Ozel yapılanmalarda, hematopoietik kök hücreler, bir denekte adrenolökodistrofi ve/ veya adrenomiyelonöropatiyi tedavi etmek, önlemek ya da iyileştirmek için kullanılacak olan bir polipeptidi, örnek olarak, ABCD1'i kodlayan bir gene işlevsel olarak bağlanan mikrogliyal hücreleri, içinde aktif olan bir başlatıcıyı, örnek olarak bir MND başlatıcısı, içeren buluşun bir vektörü ile kalıt aktarılır.

Mevcut buluş şimdi aşağıdaki örnekler ile daha ayrıntılı olarak tarif edilecektir. Bununla birlikte, bu buluş, birçok farklı biçimde yapılandırılabilir ve burada ortaya konan yapılanmalar ile sınırlı olduğu yorumlanmamalıdır; daha ziyade, bu yapılanmalar, bu açıklamanın eksiksiz ve tam olacağı şekilde sağlanmıştır ve buluşun kapsamını, teknikte uzman kişilere tam olarak iletacaktır.

ORNEKLER

ORNEK 1:

15 WPRE'YE SAHİP OLAN YA DA SAHİP OLMAYAN ABCD1 LENTİVİRAL VEKTORLERİNİN KULLANILMASI İLE NORMAL İNSAN HEMAPOİETİK KÖK HÜCRELERİNDEKİ GEN KALIT AKTARIMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Deneysel Genel Bakış:

İnsan ACBD1'i kodlayan bir cDNA'ya işlevsel olarak bağlı bir MND başlatıcısı içeren bir lentiviral vektör ve bir WPRE elemanı (bakınız Şekil 1; CG1711 MND-ALD) vektörü ticari geliştirme için mevcut değildir. Sonuç olarak, Başvuranlar, gelecekteki klinik çalışmaları ileriye taşımak üzere uygun bir lentiviral vektörü tanımlamak için bir vektör geliştirme programı üstlenmiştir. Ticari olarak kabul edilebilir vektör, vektör geliştirme programının bir sonucu olarak yapılmıştır ve MND başlatıcısına işlevsel olarak bağlı ABCD-1 genini 25 değiştirmemiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, WPRE'nin vektörden çıkarılması, insan hematopoietik hücrelerinde kalıt aktarım verimini ve transgen ekspresyonunu değiştirmemiştir. Hematopoietik hücreler üzerinde aşağıdaki deneyler dizisi, iki MND-ALD vektörünü, pLBP100 (bakınız Şekil 1 ve SEK ID N0: 1; WPRE çıkarılmış) ve WPRE'nin varlığına göre farklılık gösteren pLBP140'ı (bakınız Şekil 1; fonksiyonel WPRE'ye sahip olan) karşılaştırmak 30 için kısa ve uzun vadeli ata analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Lentiviral Vektör Yapıları

Tüm lentiviral vektörler, MND başlatıcısının kontrolü altında normal insan ATP bağlayıcı kaseti, alt aile D (ALD), üye 1 (ABCD1) cDNA'sı içermiştir. Şekil 1 ve Tablo 1, CG1711, pLBP100 ve pLBP140 MND-ALD vektörlerindeki farklı bileşenleri ve bunların konumlarını özetlemektedir.

Tablo 1: Vektör Özeti

	pLBP100	pLBP140	
HIV Kaynakları	HIV1 (NL4-3) Erişim #m19921	HIV1 (NL4-3) Erişim #m19921	
5'LTR:			
Hibrit/ WT	WT	WT	
R	+	+	
U5	+	+	
Gag sekansları:			
ORF bozulmuş	İki duraklı kodonlar	İki duraklı kodonlar	
Uzunluk	Nsi 1 alanına, 120 bp, daha uzun	Nsi 1 alanına, 120 bp, daha uzun	
RRE ve cPPT ve S/A	cPPT/CTS RRE (500bp)	cPPT/CTS RRE (500bp)	Vektörün bu alanı değişik gruplar tarafından eşsiz şekilde dizayn edilmiştir.
Başlatıcı	MND	MND	
ABCD-1 sek	Nt. 346-2638	Nt. 346-2638	Erişim no. NM_000033 -
5'UT	+	+	
3'UT	-	+	
WPRE	Hayır	Evet (mutasyona uğramış)	
SIN 3'LTR	+	+	Aynı delesyon
Poli A	U5 yerine Sentetik tavşan β -globin poli A (r β gpA)	U5 yerine Sentetik tavşan β -globin poli A (r β gpA)	Sentetik (r β gpA), LTR nükleotit sekanslarının çoğunu kaldırmak sureti ile kendi kendine inaktive

			etmenin başka bir derecesini eklemektedir.
--	--	--	--

Kalıt Aktarım

5 Lentiviral pLBP100 ve pLBP140 süpernatantları, 293T hücrelerinin 5-plazmidler ile kalsiyum fosfat transfeksiyonu ile üretilmiştir (pLBP100 ya da pLBP140 vektörleri, HPV 275 - gag-pol, ψ N 15 - VSV-G env, p633 - rev, HPV601 - tat). Konsantre pLBP100, ultrasantrifüj işleminden sonra elde edilmiştir, SCGM (CellGenix Inc., Germany GMBH) ortamına yeniden verilmiştir ve tek kullanımlık kriyoflakonlar içinde -70 °C'de dondurularak saklanmıştır. Enfeksiyöz titreler, kalıt aktarım 3T3 hücrelerinin akış sitometrik analizinden belirlenmiştir.

10 İnsan hematopoietik kök hücrelerinin kalıt aktarımı için pLBP100 ve pLBP140 lentiviral vektör karşılaştırması, Tablo 2'de özetlenen dört ayrı deney arasında gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler için prosedürler ve analizler, sırası ile Şekil 2 ve 3'te gösterilmiştir.

Tablo 2: Deneysel Özet

Deney	CD34+ Hücre Kaynağı	MND-ALD Vektörü	LV Parti No.	Titre (TU/mL)	MOI	RN	Kültür Analizleri
072010 (BBB6)	Lonza: Taze BM Lonza: Parti# OF3668C	pLBP100	100701	1.3×10^8	12	-	Sıvı ve CFC
		pLBP140	100717	1.9×10^7	8.6	-	
081010 (BBB8)	AllCells: Taze mPB Parti# A2186	pLBP100	100701	1.3×10^8	25	-	Sıvı ve CFC
		pLBP140	100724	1.0×10^8	25	-	
091410 (BBB9)	AllCells: Donmuş mPB Parti# A2186	pLBP100	100820	1.2×10^8	25	-	Sıvı ve CFC
		pLBP140	100730	1.3×10^8	25	-	
080610	Lonza: Taze BM Lonza: Parti# OF3739B	pLBP100	100701	1.3×10^8	25	+	Sıvı, CFC ve LTC-IC
		pLBP140	100724	1.0×10^8	25	+	

5 Taze insan kemik iliği (BM) CD34 + hücreleri (Lonza, Walkersville, MD) ya da taze ya da dondurulmuş insan G-CSF mobilize periferik kan (mPB) CD34+ hücreleri (AllCells, LLC, Emeryville, CA) 1×10^6 hücre/mL hücre konsantrasyonunda insan rekombinant IL-3 (60 ng/ml), Flt-3L (100 ng/ml), TPO (100 ng/ml) ve SCF (100 ng/ml) (Peprotech) ile takviye edilmiş olan SCGM'de 18 saat süre ile yıkanmış ve kültürlenmiştir.

10 Hücreler daha sonra, uzaklaştırılmış, yıkanmış ve SCGM (sahte kontrol) ya da pLB100 ya da pLBP140 süpernatantlarının aynı sitokin konsantrasyonları ile desteklenmiş olan 8.6 ila 25 MOI'lerinde (nihai titre (1.7 ila 5.0×10^7 TU/ml arasında) 2×10^6 hücre/mL'lik bir konsantrasyonunda düz tabanlı 96 kuyucuklu plakalarda tekli (deney 080610) ya da üçlü (deneyler 072010, 081010 ve 091410) 200 µL hacimlerde yeniden askıya alınmışlardır ve 8µg/ml protamin sülfür virüs ile birlikte eklenmiştir. Deney 080610'da, kalıt aktarımlar, 4 °C'de gece boyunca inkübasyon ile 20 µg/mL retronektin (Takara Bio Inc, Shiga, Japonya) ile önceden kaplanmış 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir.

Kısa süreli ata analizleri

15 Virüs ilavesinden 24 saat sonra, hücreler yıkanmış ve koloni oluşturan hücreler (CFC'ler) için ya (1) aynı konsantrasyonda sitokin ile takviye edilmiş tekrar askıya alınmış SCGM ortamı ve 21 gün boyunca daha fazla inkübe edilmiş ya da (2) MethoCult H4434 ortamında (Stem Cell Technologies) 1ile kültürlenmiştir.

20 Total miyeloid (CFU-GM) ve eritroid (BFU-E) kolonileri 14. günde numaralandırılmıştır ve hücreler PBS içinde süspansiyon edilmiştir, yıkanmıştır ve DNEASy kiti (QIAGEN) ($1-2 \times 10^6$ canlı hücre) ile genomik DNA hazırlanmıştır.

Uzun süreli kültürü başlatan hücre (LTC-IC) analizi

25 Sekiz 96 kuyucuklu plaka, % 10 fetal sığır serumu ile takviye edilmiş Alfa ortamında fare kemik iliği stromal hücre hattı MS-5 ile aşılantır ve hemen hemen birbirine yapıştıklarında gama ışını (30 Gy) ile ışınlanmışlardır.

30 Işınlamadan iki gün sonra, önceden belirlenmiş MS-5 stromal katmanları, her biri 16 kuyucuklu çeşitli dilüsyonlarda (16 kuyucukta kuyucuk başına 2000 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 1000 hücre, 6 kuyucukta kuyucuk başına 500 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 250 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 125 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 62 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 31 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 16 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 8 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 4 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 2 hücre, 16 kuyucukta kuyucuk başına 1 hücre) 200 µL StemSpan SFEM

(Serum içermeyen Ortam, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) içinde insan CD34+ test hücreleri ile aşılanmıştır. İlave 100,000 CD34 + hücreleri, MS-5 besleyici hücreler üzerinde 5 hafta boyunca yığın halinde kültürlenmiştir. Her hafta, 100 µL orta, 100 µL taze StemSpan SFEM ile değiştirilmiştir. 5 hafta sonra, kültürler toplanmıştır ve tüm içerikler daha sonra 14 günlük koloniler büyümesi için Methocult™ GF+ H4434 (12 kuyucuklu plakaların her bir gözüne 500 µL metil selüloz) içinde tohumlanmıştır. Daha sonra tek tek koloniler koparılmıştır ve ekstraksiyondan sonra genomik DNA'nın varlığını doğrulayan pozitif bir kontrole sahip olmak için vektörde gag sekanslarına yönlendirilen primerler ve genomik sekansa (Epo geni) yönlendirilen primerler kullanılarak sonraki PCR analizi için DNA ekstre edilmiştir (SOP # GTX/RE/PBM/M-023 ve LTGC/RE/PBM/M-07). LTC-IC'nin frekansları ve % 95 güven aralıkları, L-calc yazılımı, 1.1 sürümü (Stem Cell Technologies) kullanılarak hesaplanmıştır.

Vektör kopya sayısı (VCN) belirlenmesi

Hücre başına ortalama VCN, seyreltmeden ve PBS içinde yıkandıktan sonra metilselüloz kültürlerinde sıvı kültürlerden ya da havuzlanmış koloni hücrelerinden alınan DNA preparatları üzerinde kantitatif (gerçek zamanlı) PCR'den (QPCR) belirlenmiştir. QPCR, ABI reaktifleri ve 96 kuyucuklu ABI Prism 7000 Sekans Algılama Sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir.

İnsan gag probu ve primerler, vektörü nicellemek için kullanılır:

20 GAG-F (ileri primer) 5' ggagctagaacgattcgcagttta 3'

GAG-R (ters primer) 5' ggttgtagctgtcccagttattgtc 3'

GAG-P (prob, antisens) 5'-(FAM)-acagccttctgatgtctctaaaaggccagg-(TAMRA)-3'

İnsan beta aktin probu ve primerler, normalizasyon için genomik DNA'yı ölçmek için kullanılır:

Prob:5' VIC-cctggcctcgctgtccacctcca-TAMRA İleri -5' tccgtgtggatcggcggctcca 3'

25 Ters-5' ctgcttgctgatccacatctg 3'.

Birbirinden ayrılmış genomik DNA'nın 1/100'ü (yaklaşık 50 ila 100 ng arasında), Mutlak Nicelme programı ve varsayılan termal döngü programı ile 25 ul'lik bir reaksiyonda 1x TaqMan® Universal Master Mix, 0.72uM'lik her bir primer ve 0.35uM prob kullanılarak analiz edilmiştir.

30 **Akış sitometrisi ile transgen ekspresyonu**

ABCD1 (ALDP) proteininin ekspresyonu, fare anti-insan ALDP (ABCD1) monoklonal antikorunu (Clone 1D6, Lot # LV1383343, Chemicon) kullanarak sabit ve geçirgenleştirilmiş hücreler üzerinde (Sabit ve Geçirgenleştirilmiş Reaktifleri A ve B, kat. No. GAS001 & GAS002, Invitrogen) gerçekleştirilmiştir, ardından PE-konjuge sıçan anti-fare IgG1 mAb (klon A85-1, BD Pharmingen) ile boyanmıştır. Fare IgG1 monoklonal antikor klonu MOPC-21 (BioLegend) bir izotip kontrolü olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz

Her bir deneydeki grup değerlerinin karşılaştırılması örneklem büyüklüğünün yeterli olduğu ($n = \geq 3$) durumlarda, iki kuyruklu parametrik olmayan Mann-Whitney U-testi (GraphPad Prism v. 3.0) kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlılık, 0.05'in altında bir değerde belirlenmiştir.

SONUÇLAR

Ata hücre frekansları üzerindeki etkileri

Fonksiyonel miyeloid (CFU-GM) ve eritroid (BFU-E) atalarının verimi, Şekil 4'teki dört deneyin tamamı için karşılaştırılmıştır ve birinci deney setinde üçlü kalıt aktarımlar için pLBP100 veya pLBP140 süpernatantlarının eklenmesinin önemli bir etkisinin olmadığını göstermiştir (deneyler 072010, 081010 ve 091410). Tekli kalıt aktarımlar için altı set metilselüloz kültürünün karşılaştırıldığı ikinci deney seti (deney 080610) için, pLBP100 ilavesi ile miyeloid atalarda anlamlı bir artış gözlenirken, eritroid kolonilerinin veriminde pLBP100 ile tedaviden sonra önemli bir azalma görülmüştür ve pLBP140 kalıt aktarımından sonra daha da azalmıştır.

Daha ilkel LTC-IC'nin frekansları, iki lentiviral vektör ile kalıt aktarım sonrası ortalamada daha düşük olmuştur (Şekil 5), ancak % 95 güven aralıkları çakıştıkça, bu farklılıklar anlamlı olmamıştır ($p > 0.05$).

Vektör PCR ile kalıt aktarım verimliliği

35 gün boyunca sıvı kültürde tutulan hücrelerden izole edilen genomik DNA'nın gerçek zamanlı PCR analizi, ikinci deney setinde pLBP140 ile karşılaştırıldığında pLBP100 için tüm zaman noktalarında daha yüksek tahmini bir vektör kopya sayısını (VCN) göstermiştir (Şekil 6A).

Bu, aynı zamanda metil selüloz kültürlerinde büyüyen havuzlanmış CFC'ler için daha yüksek ortalama VCN'yi göstermiştir ve aynı deneydeki vektör pozitif miyeloid kolonilerinde de

artmıştır (Şekil 6B ve C). Bununla birlikte, ilk deney setinin üçlü deneyleri arasındaki karşılaştırma, havuzlanmış kolonilerin VCN'sinde ya da vektör için pozitif olarak test edilen kolonilerin yüzdesinde anlamlı bir fark göstermemiştir.

5 Şekil 7, ortalama VCN ve vektör pozitif miyeloid kolonilerinin, her iki vektör grubu için daha yüksek VCN'yi (1.1'e karşı 0.4 kopya) ve pozitif kolonilerin oranına sahip olan pLBP100 kalıt aktarılmış hücreler için 5 haftalık LTC-IC'den sonra azaldığını göstermektedir (% 51'e karşı % 35).

10 **Akış sitometrisi ile ALDP transgen ekspresyonu**

Anti-ALDP antikoru ile hücre içi olarak lekelenmiş hücrelerin floresan profillerinin örnekleri, Şekiller 8A1 ve A2'deki histogramlarda gösterilmektedir, bunlardan, pozitif yüzde (ilgili sahte kontrollerin % 0,5'inden daha fazlasında saptanmıştır) ve ortalama floresan yoğunlukları (MFI) Şekil 8B ve C'de belirlenmiştir ve sunulmuştur. Transgen ekspresyonu seviyesi, 15 deneylerde pLBP140 grupları ile karşılaştırıldığında, pLBP100 için ortaya çıkan hücrelerin daha yüksek ortalama yüzde oranındaki deneyler 072010 ve 080610 arasında değişmiştir. Ancak, bunun tersi deney 091410 ve deney 081010'daki karşılaştırılabilir seviyeler için gözlenmiştir. Üçlü deneyler arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, ne ALDP+ hücrelerinin ne de MFI değerinde önemli bir farklılık göstermemiştir ($p > 0.05$).

20 **SONUÇLAR:**

Klinik öncesi pLBP100 lentiviral vektörünün iki preparasyonu ve pLBP140 vektörünü içeren WPRE'nin üç preparasyonu kullanılarak ve kemik iliğinden ya da GCSF ile mobilize periferik kandan kaynaklanan normal insan CD34+ hücrelerinin kalıt aktarımlarını içeren dört ayrı deney arasındaki karşılaştırmalar yapılmıştır. Deney 080610'daki miyeloidde bir artış ve 25 eritroid ataların bir azalma dışında, ne erken atalar ne de daha ilkel LTC-IC'ler için süpernatantların önemli bir toksisitesi ortaya çıkmamıştır. Ortalama VCN'ye ya da miyeloid kolonileri ya da LTC-IC içeren vektörün oranına göre pLBP140 için düşük kalıt aktarım etkinliklerine yönelik bir eğilim görülmüştür, ancak bu, yeterli örnek büyüklüğüne sahip (n=3) deneyler için istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. İki vektör tarafından verilen transgen 30 ekspresyonu seviyesi, pLBP100'den gelen ALDP+ hücrelerinin daha yüksek bir yüzdesini gösteren iki deney ve pLBP140'a kıyas ile daha düşük bir yüzde gösteren bir deney ile karışık sonuçlar vermiştir. Bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır.

Genel olarak, WPRE'nin MND-ALD vektörüne eklenmesi avantajı ortaya çıkmamıştır. Dolayısıyla, mevcut buluşun vektörleri, WPRE içeren vektörlere kıyas ile artırılmış güvenlik ve üstün etkinlik eşitliği sağlar. Ayrıca, sonuçlar, buluşun vektörlerinin daha fazla geliştirme ve klinik uygulama için uygun olduğunu göstermektedir.

5 ORNEK 2:

ALD YETERSİZ PRİMER İNSAN FİBROBLASLARINDA ALD PROTEİN YETERSİZLİĞİNİN FONKSİYONEL DÜZELTMESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Deneysel Genel Bakış

10 Çok uzun zincirli yağlı asitlerin (VLCFA), özellikle de C26 zincirinin birikmesi, sıklıkla ALD'nin biyokimyasal "ayırt edici"si olarak adlandırılır. Hubbard, Mol Genet. Metab. 97:212-220 (2009).ABCD1 cDNA içeren retroviral vektörler ile yetersiz hücrelerin kalıt aktarımı fonksiyonel ALD proteini (ALDP) seviyelerini geri yükler ve VLCFA seviyelerinin azalması ile sonuçlanır. Bu, ALD hastalarından primer fibroblast hatları da dahil olmak üzere farklı hücre popülasyonlarında gösterilmiştir.

15 Kennedy Krieger Enstitüsü'nde (Baltimore, MD) geliştirilen C26:0 lizo-PC testi (LPC testi), sıvı kromatografi ve tandem kütle spektrofotometresi ile VLCFA'yı ölçer. Bu metot yeni doğan kan lekeleri için geliştirilmiş ve ayrıca plazma ve kültürlü deri fibroblastlarında da doğrulanmıştır. Bu örnekte, AL26 hasta fibroblastlarında biyokimyasal yetersizliğin fonksiyonel düzeltilmesini göstermek için C26:0 lizo-PC testi kullanılmıştır. Bu deneyin amacı
20 vektör modifiye edilmiş ALD yetersiz fibroblast hücrelerinde VLCFA seviyelerinin azaltılmasında pLBP100 (p100) ve pLBP140 (p140) vektörlerinin etkinliğini karşılaştırmaktır.

Hücre hatları

Birincil insan fibroblast hücreleri GM04496 ve AG01440 Coriell Hücre Deposu'ndan (Camden, NJ, ABD) elde edilmiştir.GM04496 hücreleri, ABCD1 geninin bilinmeyen bir mutasyonuna sahip olan bir ALD negatif hastadan izole edilmiş transforme edilmemiş insan
25 fibroblastlarıdır. AG01440 hücreleri normal insan fibroblastlarıdır. Hücreler, nemlendirilmiş bir inkübatörde 37 °C'de % 5 CO₂'de % 15 FBS'ye (HyClone FBS, GIBCO Life Technologies) sahip olan DMEM (GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA) içinde büyütülmüştür.

TF-1 hücreleri (ATCC® Number CRL-2003™), kemik iliği eritro-lösemisinden türetilen bir
30 insan lenfoblast hattıdır. Hücreler, % 10 FBS'ye sahip olan RPMI-1640 (GIBCO Life Technologies) içinde büyütülmüştür.

Lentiviral vektörler üretmek için kullanılan 293T hücreleri (Stanford Üniversitesi), % 10 FBS'ye sahip olan DMEM içinde büyütülmüştür.

Lizo-PC testi için kalıt aktarım protokolü ve kaplama

Alt konflüent hücreler, 14 ila 16 saat arasında bir süre boyunca ortam + 8µg/ml polibren (Hexadimethrine Bromide, Sigma, St Louis MO) içinde viral süpernatant ile kalıt aktarılmıştır. Taze ortam ertesi gün değiştirilmiştir. Kalıt aktarımdan henüz 3 gün sonra, hücrelerin çoğunluğu 12 kuyucuklu plakalarda üç kopya halinde (lipit ekstraksiyonu için 2 replikat ve protein analizi için bir tane) kaplanmıştır. (Falcon # 35-3043). Eş değer sayıda normal kontrol hücresi (293T, AG01440 ya da TF-1) de aynı zamanda kaplanmıştır ya da peletlenmiştir. Hücre tekli katmanları iki kez IX HBSS tamponu ile (GIBCO Life Technologies) yıkanmıştır ve -20 °C'de in situ dondurulmuştur. Donma metodu ilk olarak Kennedy Krieger'de test edilmiş ve taze hücre mono katmanlarının hasadı ile karşılaştırılabilir olduğu belirlenmiştir. Geri kalan hücreler kültürde tutulmuştur.

Genomik DNA izolasyonu ve vektör kopya sayısı (VCN) tayini

LPC testi için kaplandıktan sonra kalan hücreler, DNA izolasyonu ve VCN analizi için kalıt aktarım sonrası en az 9. güne kadar genomik DNA hasadı için kültürde tutulmuştur. Lipit ve Protein ekstraksiyonu Kennedy Krieger Enstitüsü'nde tamamlanmıştır.

SONUÇLAR:

4496 hücrelerinin Lizo-PC analizleri ve çeşitli normal ve negatif kontroller

4496 hücreleri ve normal fibroblast 1440 hücreleri analiz için kaplanmıştır. ALDP, immün boyama ve akış sitometrisi ile TF-1 hücrelerinde ve 293 hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu hücreler, aynı zamanda, bazal C26:0LPC seviyeleri için alternatif pozitif (yani, Normal ALDP fenotip) kontrolleri olarak da tahlil edilmiştir. Numuneler dört bağımsız analizde analiz edilmiştir.

C26:0LPC'nin taban seviyeleri, normal fenotipe sahip hücrelerde 3 ila 50 pmol/mg protein arasında bir aralıkta değişmiştir ve 4496 hücreleri, her analizde yüksek seviyelere sahip olmuşlardır. Genel olarak, normal hücrelerde 4496 hücrelerine kıyas ile C26:0LPC seviyelerinde en az 5 kat fark (oran 0.2'nin altında) olmuştur. Bu oran, hasta kan lekeleri için rapor edilen sonuçlara benzer olmuştur.

p100 ve p140 ile kalıt aktarılmış 4496 hücrelerinin karşılaştırılması

4496 hücreleri p100 ve p140 ile kalıt aktarılmıştır. Hücreler, burada tarif edildiği gibi VLCFA ve VCN için analiz edilmiştir. LizoPC testi sonuçları Tablo 3'te gösterilmiştir. Yinelene kuyucukların ortalaması sahte kalıt aktarılmış hücrelere normalize edilir. VLCFA düzeltmesinin VCN'ye karşı sahteye oranı Şekil 10'da gösterilmiştir. VCN, <1 kopyaya azaldıkça, hücre popülasyonunun, kalıt aktarıma tabi tutulmamış hücreler ve hücre başına 1 ya da 2 vektör kopya içeren hücrelerin karışımı olması beklenir; bu neden ile VLCFA'nın azalması beklenmektedir (Şekil 10).

10 Tablo 3: Lenti-D p100 ve LWp140 ile kalıt aktarılmış 4496 hücrelerinde C26:0LPC sonuçları

	MOI	Toplam pmoleC26:0LPC/mg protein (çoğaltma kuyucukları)		Çoğaltma kuyucuklarının ortalaması	Sahte txd'ye oran
Sahte txd 4496		50.53	58.94	54.73	1.00
Lenti-D p100	3	8.82	8.47	8.65	0.16
	1	11.05	12.57	11.81	0.21
	0.3	20.59	25.57	23.08	0.42
p140	3	15.55	10.81	13.18	0.24
	1	10.35	15.37	12.86	0.23
	0.3	22.74	33.34	28.04	0.51
Normal 293T		6.98	6.75	6.87	0.12

0.2'lik oran, sahte-txd 4496 hücrelerine kıyas ile normal fenotipe sahip hücrelerin seviyesi olarak belirlenmiştir. VCN >-1.5 olduğunda, 4496 hücrelerinde VLCFA birikimi, her iki vektör için normal hücrelerin seviyesine düzeltilmiştir. Düzeltmede azalma eğilimi, VCN 1.0 ila 0.6 arasındaki her iki vektör ile de mevcuttur.

15 **SONUÇLAR:**

Kennedy Krieger Enstitüsü'nde (Hubbard 2009) gerçekleştirilen C26:0 lizo-PC testi, sıvı kromatografi ve tandem kütle spektrofotometrik metot ile VLCFA ile ölçülmüştür, C26 birikimi olan ALD hasta hücre hattı GM04496 hücrelerinde biyokimyasal yetersizliği doğrulamıştır. p100 ve p140 ile kalıt aktarımdan sonra, hücreler, akış sitometrisi (veriler gösterilmemiştir) ile gösterildiği gibi ALDP ifadesi için pozitif ve ortalama VCN > 1.5 olan hücreler, VLCFA birikiminin normal bir fenotipe sahip hücrelerin seviyesine tam düzeltilmesini göstermiştir. Eşlenik sonuçlar, p100 ve p140 ile kalıt aktarılan hücreler karşılaştırıldığında, WPRE sekanslarından yoksun olan p100'ün etkinliğini desteklediğinde elde edilmiştir.

SEKANS LİSTESİ

10 <110> bluebird bio, Inc. Denaro, Maria Joann Finer, Mitchell Howard Veres, Gabor

<120> GENE THERAPY VECTORS FOR ADRENOLEUKODYSTROPHY AND
ADRENOMYELONEUROPATHY

15 <130> BLBD-003/01WO

<150> US 61/495,857

<151> 2011-06-09

20 <160> 3

<170> Windows Version 4.0 için FastSEQ

<210> 1

25 <211> 2297

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ccagccccag tcctacgcy gcagccagcc caggtgacat gccggtgctc tccaggeccc 60
ggccttgccy ggggaacacg ctgaagcgca cggccgtgct cctggccctc ggcgcctatg 120
gagccccaaa agtctacccc ttggtgcgcc agtgcctggc cccggccagg ggtcttcagg 180
cgccccccgg ggagcccacg caggaggcct ccggggtcgc ggcggccaaa gctggcatga 240
accgggtatt cctgcagcgg ctctgtgyc tctgcggct gctgttcccc cgggtcctgt 300
gccgggagac ggggctgctg gccctgcact cggccgcctt ggtgagccgc accttctgt 360
cggtgtatgt gcccgcctg gacggagggc tgcccgcctg catcgtccgc aaggaccocg 420
gggcttttg ctggcagctg ctgcagtggc tctcatcgc cctccctgct accttcgtca 480
acaqtgccat ccgttaacctg gagggccaac tgccctgtc gttccgcagc cgtctggtgg 540
cccacgccta ccgctctac ttctccagc agacctacta cggggtcagc aacatggacg 600
ggcggcttcg caaccctgac cagtctctga cggaggacgt ggtggccttt gcggcctctg 660
tggccacct ctactccaac ctgaccaagc cactcctgga cgtggtctg acttctaca 720
ccctgcttcg ggcggcccg cccctgtag cggcacaagc ctggccctcg gccatcgccg 780
gcctcgtggt gtctctcac gccaacgtgc tgcgggctt ctgccccag ttccggggagc 840
tggtagcaga ggaagcggc cggaggggg agctgcgcta catgcactcg cgtgtggtgg 900
ccaactcoga ggagatcggc ttctatggg gccatgaggt ggaqctggcc ctgctacagc 960
gctectacca ggacctggcc tcgcagatca acctcatcct tctggaacgc ctgtggtatg 1020
tcatgctqga qcagttctc atgaagtatg tgtggagcgc ctccggcctg ctcatggtgg 1080
ctgtccccat catcactgcc actggctact cagagtcaga tgcagaggcc gtgaagaagg 1140
cagccttqga aaagaaggag gaggagctgg tgagcggagc cacagaagcc ttcactattg 1200
cccgaacct cctgacagcg gctgcagatg ccattgagcg gatcatgtcg tctacaagg 1260
aggtgacoga gctggctggc tacacagccc ggtgcaoga gatgttccag gtatttgaag 1320
atgttcagcg ctgtcacttc aagaggccca gggagctaga ggacgctcag ggggggtctg 1380
ggaccatagg ccggtctggt gtcctgtgg agggccccct gaagatccga ggcaggtgg 1440
tggatgtgga acaggggatc atctgcgaga acatccccat cgtcacgccc tcaggagagg 1500
tggtaggtggc cagcctcaac atcagggtgg aggaaggcat gcatctgctc atcacagccc 1560
ccaatggctg cggcaagagc tccctgttcc ggatcctggg tgggctctgg cccacgtacg 1620
gtggtgtgct ctacaagccc cccccagc gcatgttcta catcccagc aggccctaca 1680
tgtctgtggc ctccctgcgt gaccaggtga tctaccoga ctcaqtggag gacatgcaa 1740
ggaagggcta ctggagcag gacctggaag ccactcctga cgtcgtgac ctgcaccaca 1800
tctgcagcgg gagggaggt tgggaggtca tgtgtgactg gaaggacgtc ctgtcgggtg 1860
gcaagaagca gagaatcggc atggcccga tgttctacca caggcccaag tacgccctcc 1920
tggatgaatg caccagccc gtgagcatcg acgtggaagg caaqatctc caggcggcca 1980
aggacgoggc cattgcctg ctctccatca cccaccggcc ctccctgtgg aaataccaca 2040
cacacttgct acagttcgat ggggaggcgg gctggaagt cagaagctg gactcagctg 2100
cccgcctgag cctgacggag gagaagcagc ggctggagca gcagctggcg ggcattccca 2160

agatqcagcg gcgcctccag gagctctgcc agatcctggg cgaqcccgctg gccccagcgc 2220
atgtgccggc acctagccc caaggcctg gtggcctcca ggtgcctcc acctgactcg 2280
agggggggcc cggtagcc

```

5 <210> 2

<211> 2238

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10 <400> 2

```

atgccggtgc tctccaggcc ccggccctgg cgggggaaca cgctgaagcg cacggccgtg 60
ctectggccc tcgcggccta tggagcccac aaagtctacc ccttgggtcg ccagtgcctg 120
gccccggcca ggggtcttca ggcgcccggc ggggagocca cgcaggaggc ctccggggtc 180
gcggcggcca aagctggcat gaaccgggta ttectgcagc ggctectgtg gctectggg 240
ctgctgttcc ccgggtcct gtgccgggag acggggctgc tggccctgca ctcgccggcc 300
ttggtgagcc gcaccttct gtgggtgtat gtggcccggc tggacggaag gctggcccgc 360
tgcatcgtec gcaaggacc gcgggctttt ggctggcagc tgctgcagtg gctcctcatc 420
gcectccctg ctaccttct caacagtgcc atccgttacc tggagggcca actggccctg 480
tcgttcggca gccgtctggt gggccacggc tacccgctct acttctccca gcagacctac 540
taccgggtca gcaacatgga cgggcggtt cgcaacctg accagtctct gacggaggac 600
gtggtggcct ttgcccctc tgtggcccac ctctactcca acctgacca gccactcctg 660
gacgtggctg tgacttecta caccctgctt cgggcgccc gctcccgtgg agccggcaca 720
gcctggccct cggccatcgc cggcctcgtg gtgttecta cggccaactg gctgcgggcc 780
ttctcgcccc agtctgggga gctgggtggca gaggaggcgc ggcggaaggg ggagctgcgc 840
tacctgcact cgcgtgtggt gcccactcgc gaggagatcg ccttctatgg gggccatgag 900
gtggagctgg cctgctaca gcgtcctac caggacctgg cctcgcagat caacctcatc 960
cttctggaac gectgtggtg tgttatgctg gaggcagttc tcatgaagta tgtgtggagc 1020
gcctcgggcc tgctcatggt ggctgtcccc atcatcactg ccactggcta ctcagagtca 1080
gatgcagagg ccgtgaagaa ggcagccttg gaaaagaag aggaggagct ggtgagcgag 1140
cgcacagaag ccttcaactat tgcccgcnaac ctctgcagc cggctgcaga tgccattgag 1200
cggatcatgt cgtcgtacaa ggaggtgacg gagctggctg gctacacagc ccgggtgcac 1260
gagatgttcc aggtatttga agatgttcag cgtgtcact tcaagaggcc caggagctc 1320
gaggacgctc aggcggggtc tgggaccata ggcggctctg gtgtccgtgt ggagggccc 1380
ctgaagatcc gagccaggt ggtggatgtg gaacagggga tcatctgca gaacatcccc 1440
atcgtcacgc cctcaggaga ggtgggtggtg gccagcctca acatcagggt ggaggaaggc 1500
atgcatctgc tcatcacagg cccaatggc tgcggcaaga gctccctgtt ccggatcctg 1560
ggtgggtctt ggcccacgta cgggtggtgt ctctacaagc ccccaccca gcgcatgttc 1620
tacctccgc agaggcccta catgtctgtg ggctccctgc gtgaccaggt gatctaccgg 1680
gactcagtg aggacatgca aaggaagggc tactcggagc aggacctgga agccatcctg 1740
gacgtcgtgc acctgcacca catcctgcag cgggaggag gttgggaggc tatgtgtgac 1800
tggaaggacg tctgtcggg tggcgagaag cagagaatcg gcatggcccg catgttctac 1860
cacaggcca agtacgcct cctggatgaa tgcaccagcg ccgtgagcat cgacgtgga 1920
ggcaagatct tccagcggc caaggacggc ggcattgcc tgctctccat caccacggg 1980
ccctccctgt ggaatatcca cacacactg ctacagttcg atgggagggg cggctggaag 2040
ttcgagaagc tggactcagc tgcccgcctg agcctgacgg aggagaagca gccgctgga 2100
cagcagctgg cgggcattcc caagatgcag cggcgcctcc aggagctctg ccagatcctg 2160
ggcgaggcgg tggccccagc gcatgtgccc gcaacctagc cgcaaggccc tgggtgcctc 2220
cagggtgect ccacctga 2238

```

<210> 3

<211> 399

<212> DNA

5

<213> Yapay sekans

<220>

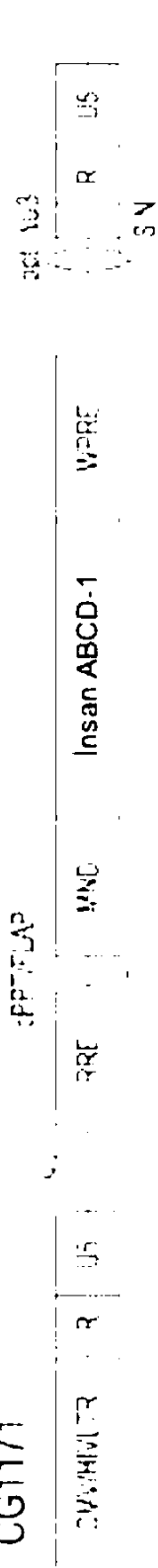
<223> a MND başlatıcı sekans

10 <400> 3

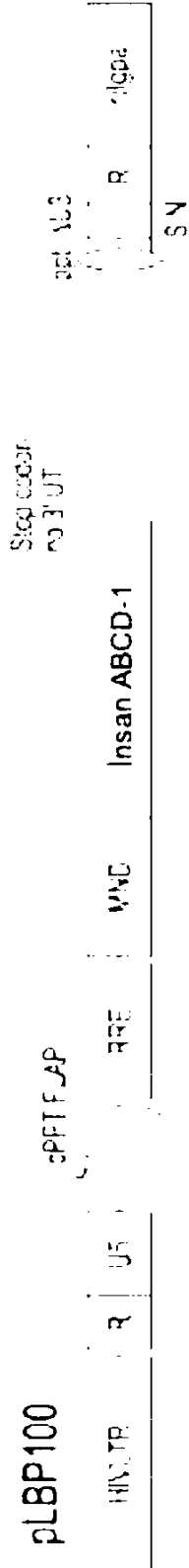
tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct 60
aggatcaagg ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggta 120
agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagttggaa cagcagaata tgggccaac 180
aggatatctg tggtaaagcag ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggccccag 240
atgcggtccc gcctcagca gtttctagag aacctcaga tgtttccagg gtgcccacag 300

gacctgaaat gaccctgtgc ottatttgaa ctaaccaatc agttcgcttc tcgcttctgt 360
tcgcgcgctt ctgctccccg agctcaataa aagagccca 399

CG1171



PLBP100

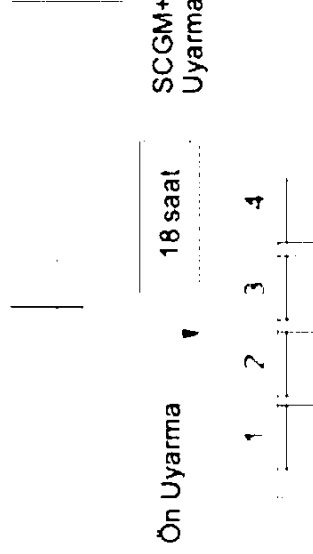


PLBP140

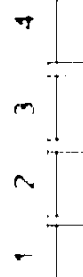


ŞEKIL 1

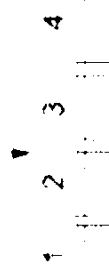
İnsan BM' siya da
mPB CD34+
Hücreleri



SCGM+ Sitokinler içinde Ön Uyarma

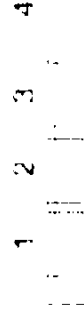


SCGM + Sitokinler + protamin
SO₂ içinde belirtilmiş MOI'de
Lentiviral sup. Eklenmesi



4. ila 10. günler
arasında Sıvı Kültür

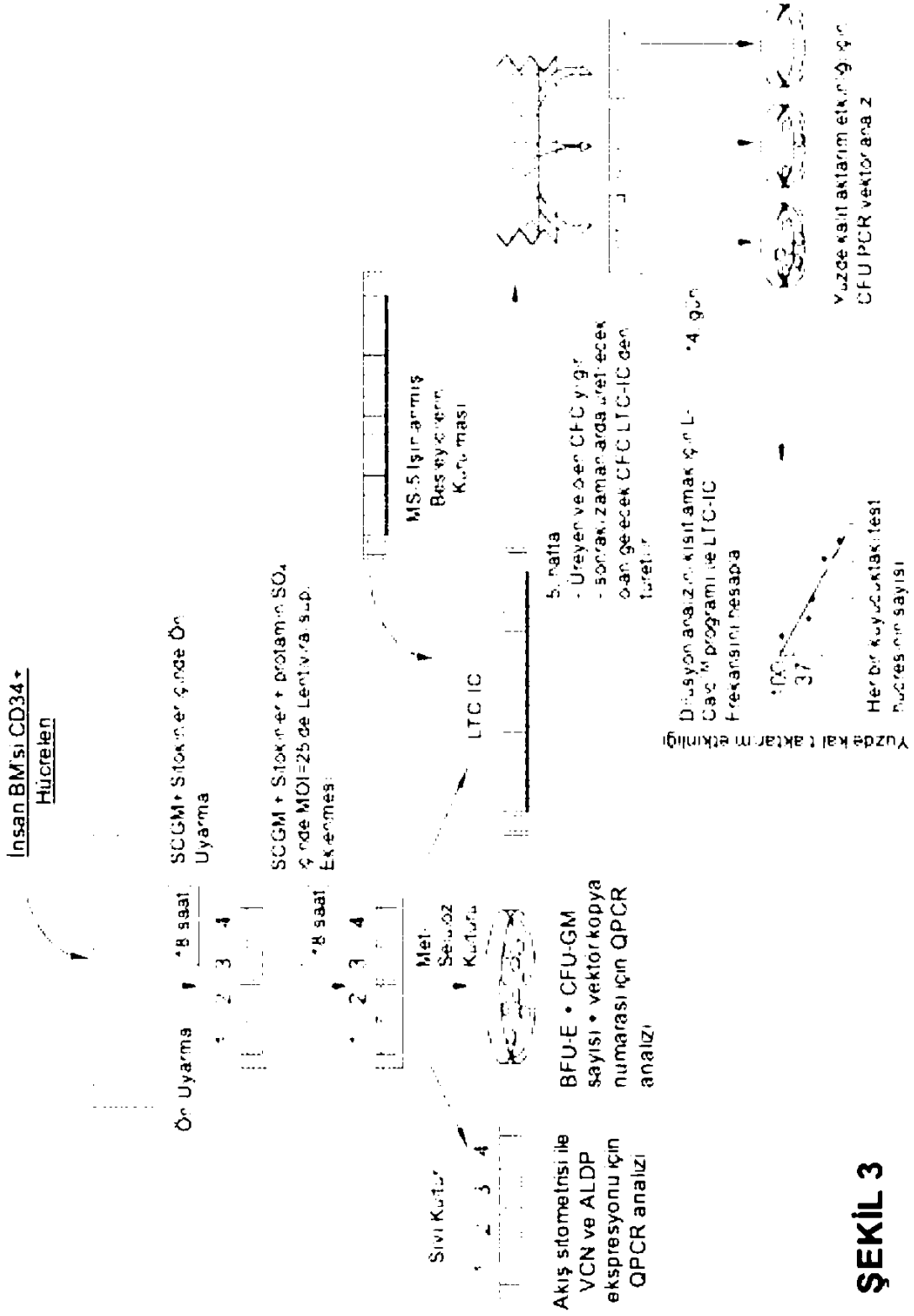
Metil Selüloz Kültürü
- 14 gün



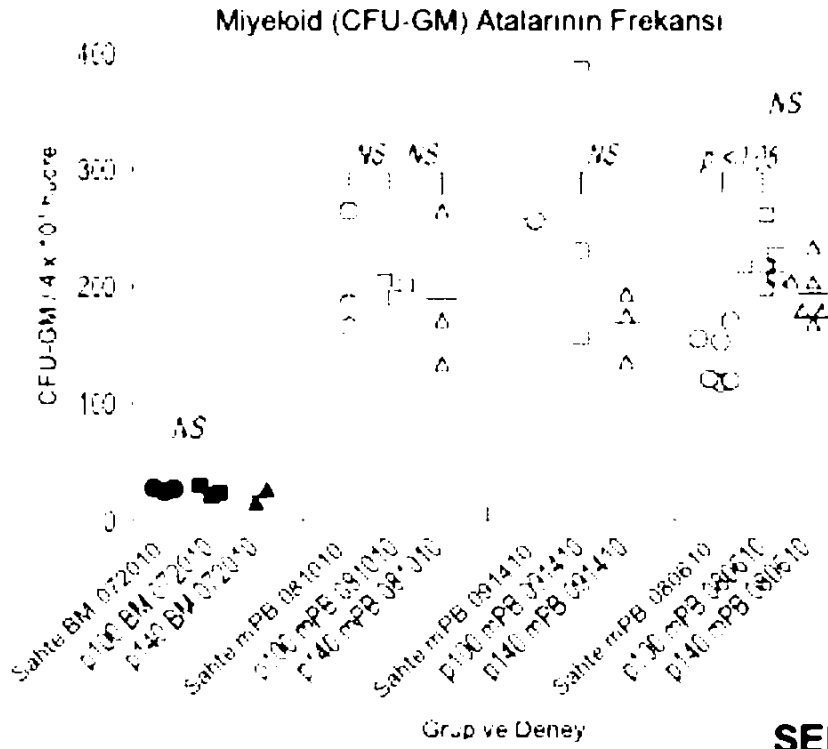
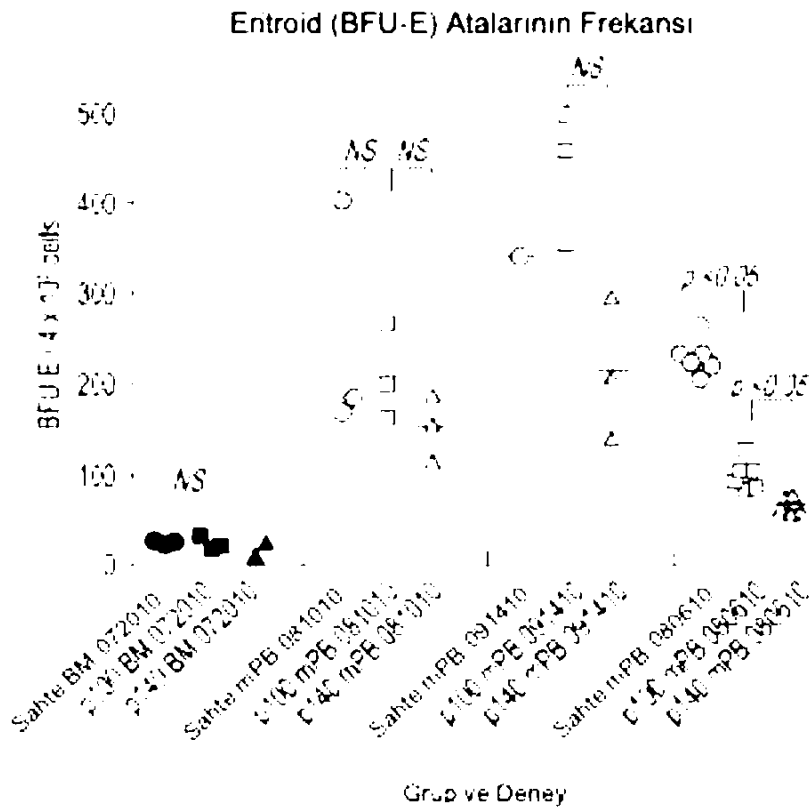
Akış sitometrisi ile VCN ve
ALDP ekspresyonu için
QPCR analizi

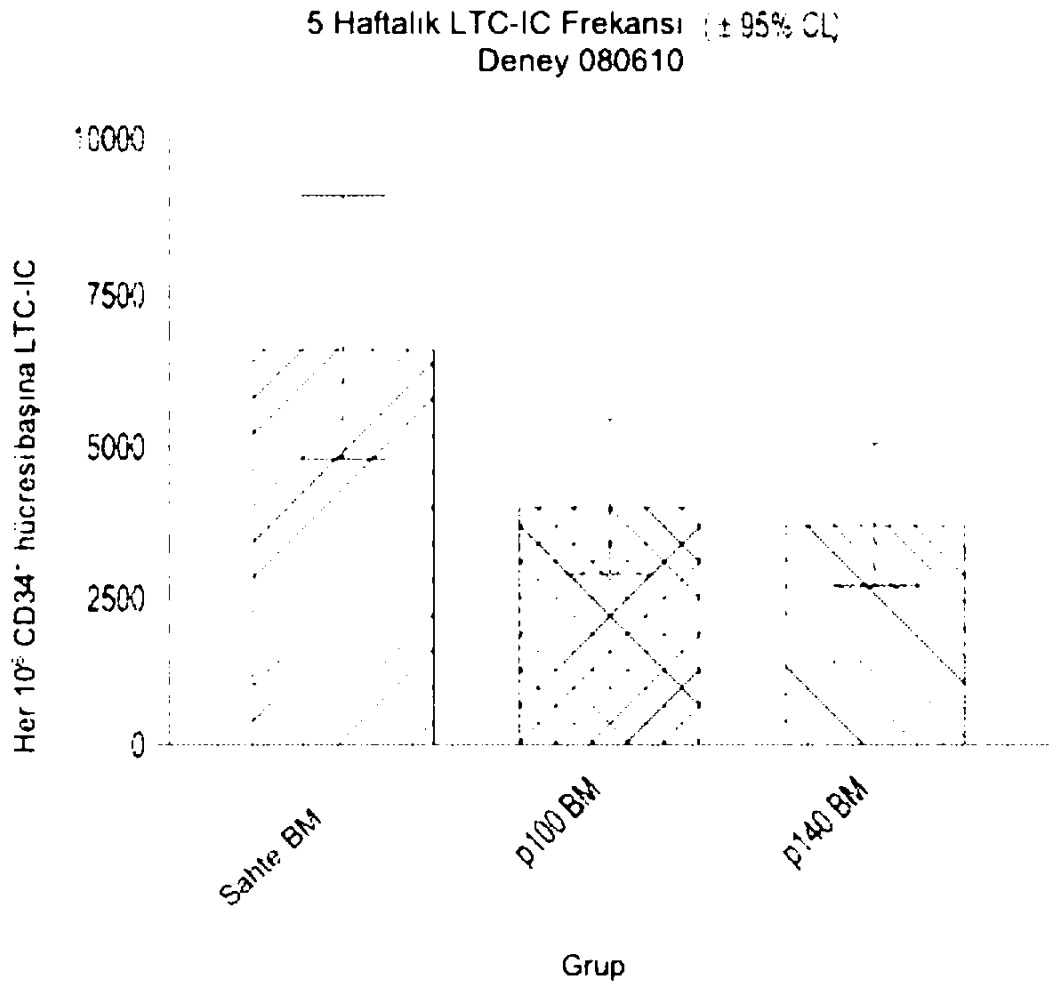
BFU-E + CFU-GM
sayısı + vektör kopya
numarası için QPCR
analizi

ŞEKİL 2

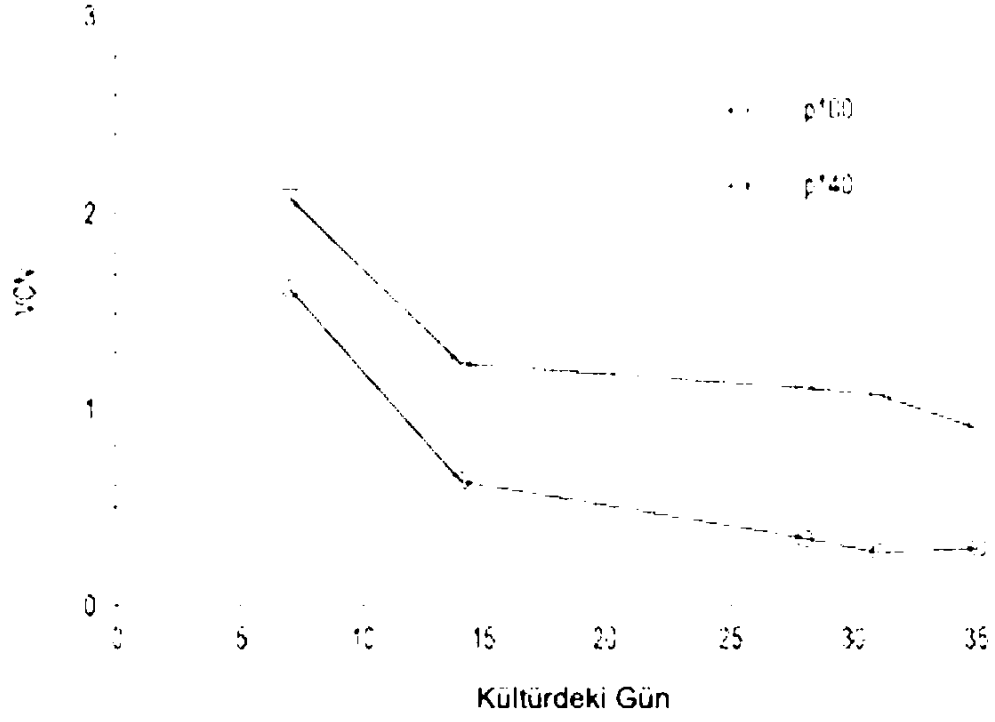


ŞEKİL 3

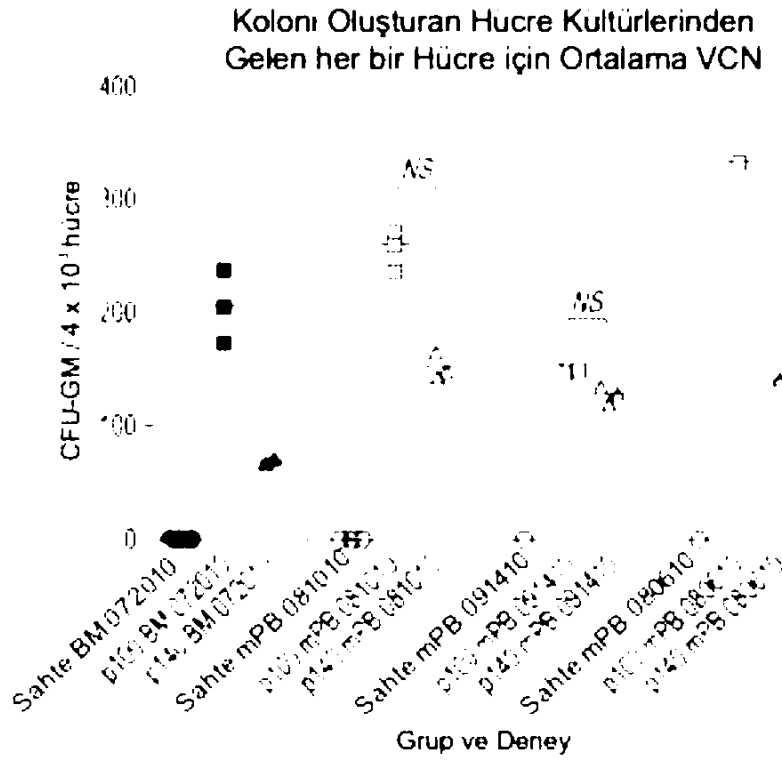
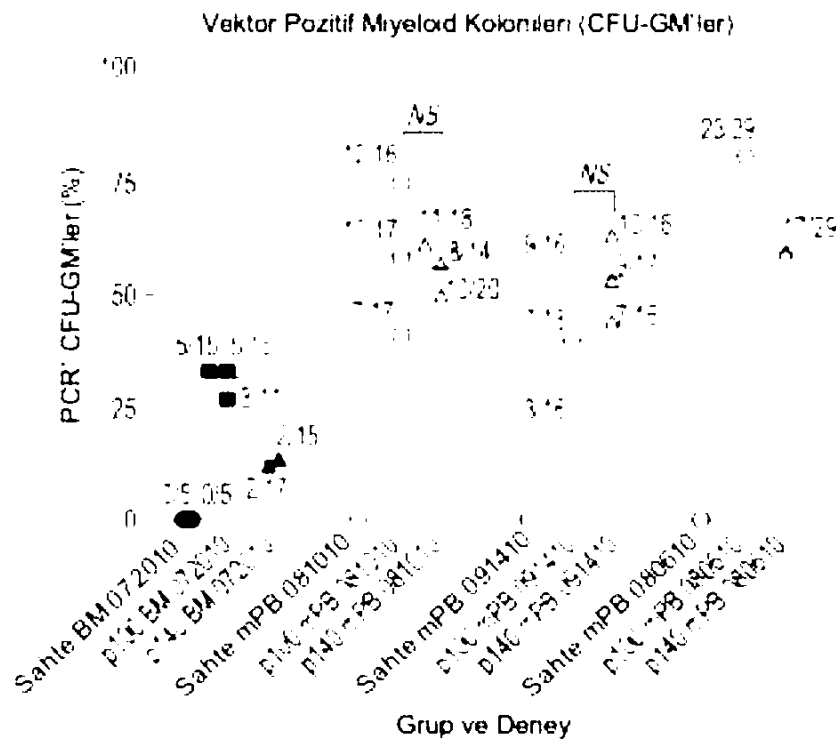
**ŞEKİL 4A****ŞEKİL 4B**

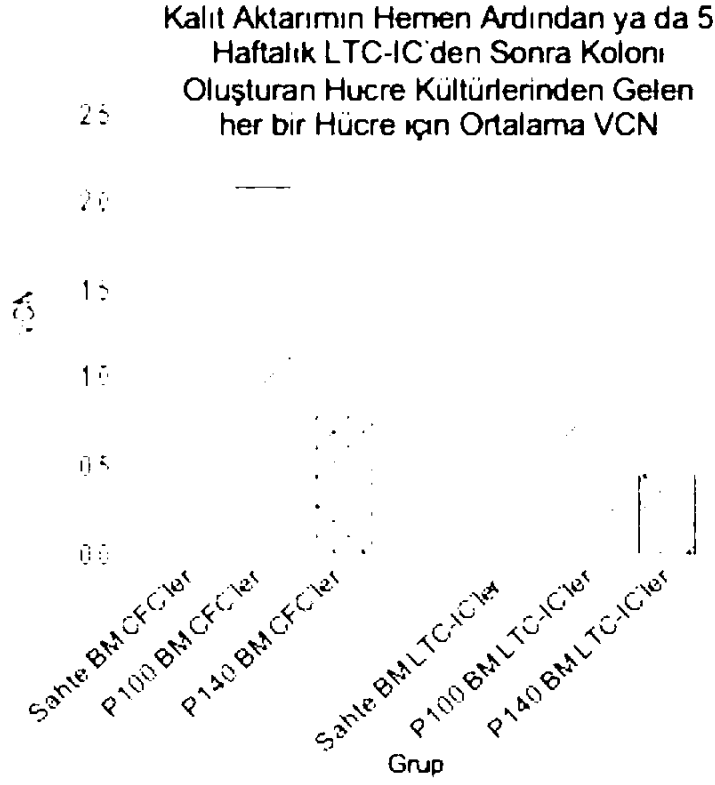
**ŞEKİL 5**

Sıvı Kültürdeki her bir Hücre için Ortalama VCN
Deney 080610

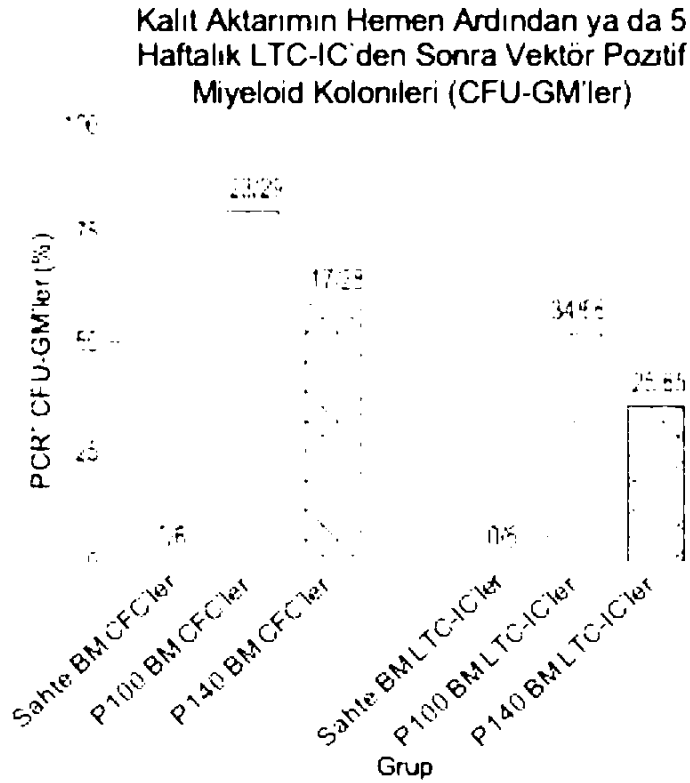


ŞEKİL 6A

**ŞEKİL 6B****ŞEKİL 6C**

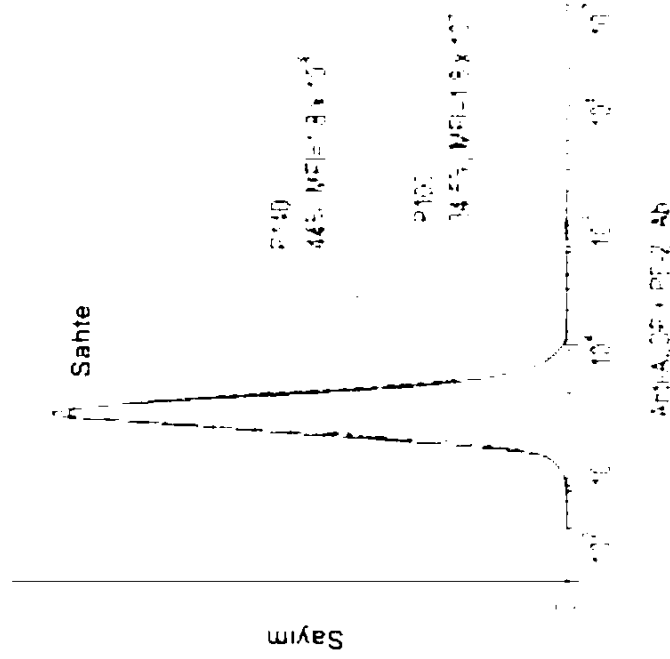


ŞEKİL 7A

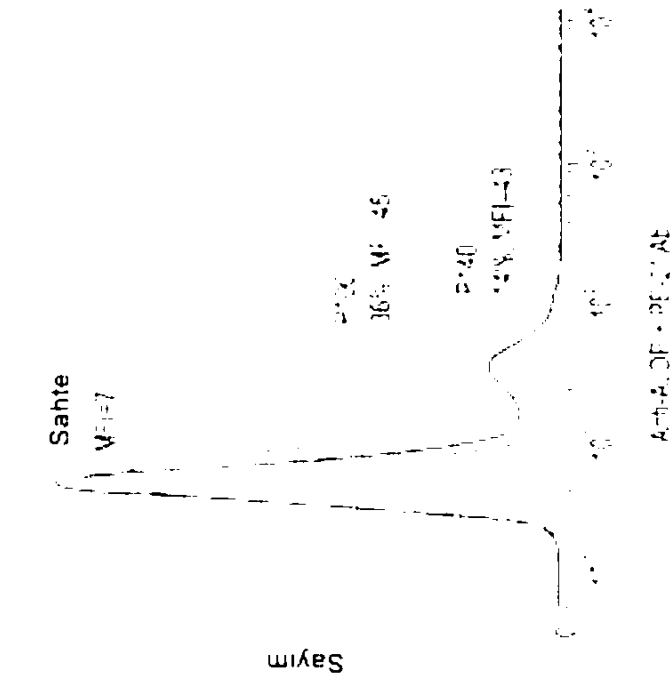


ŞEKİL 7B

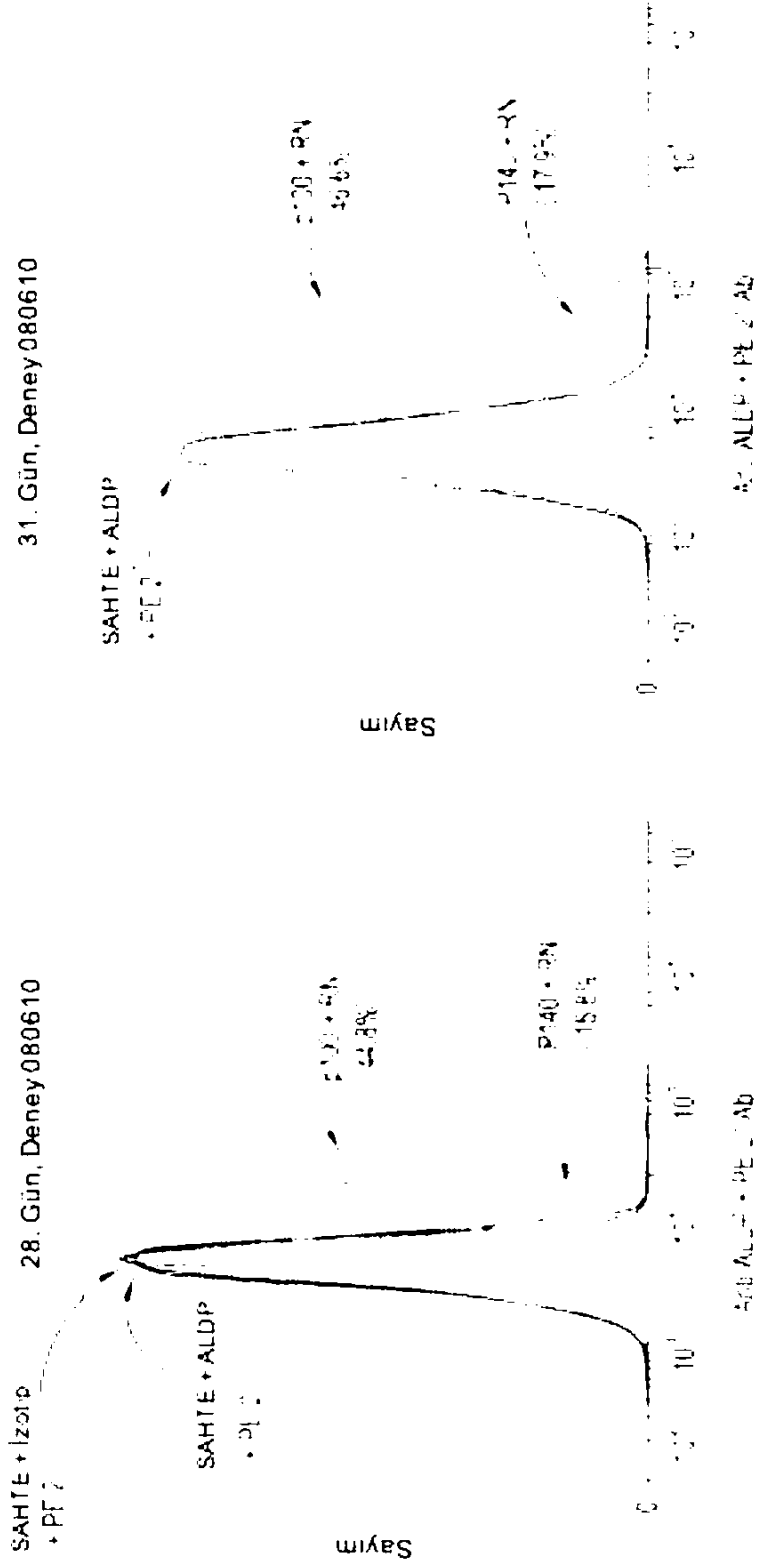
7. Gun, Deney 091410



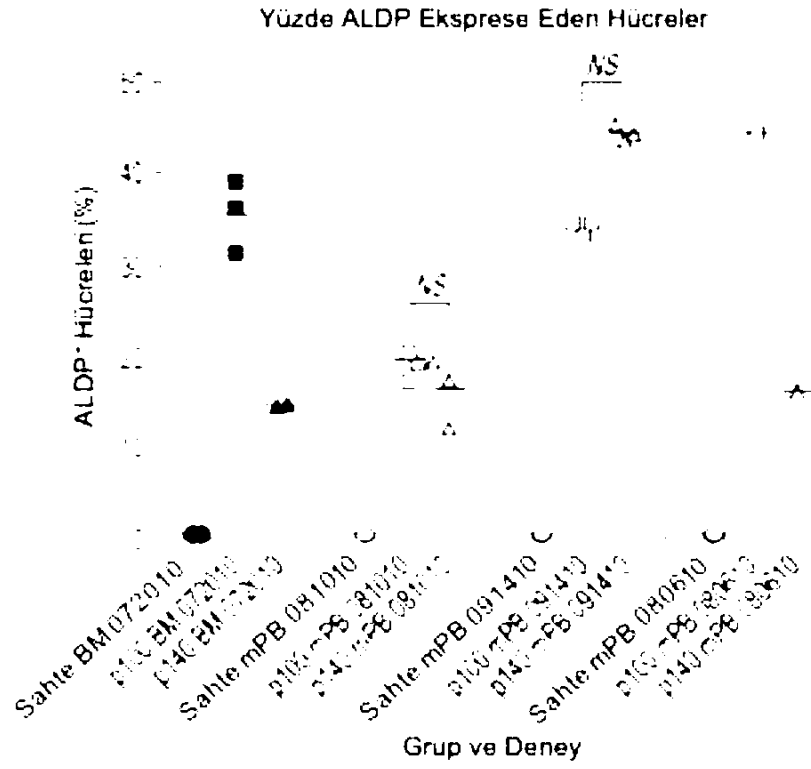
7. Gun, Deney 072010



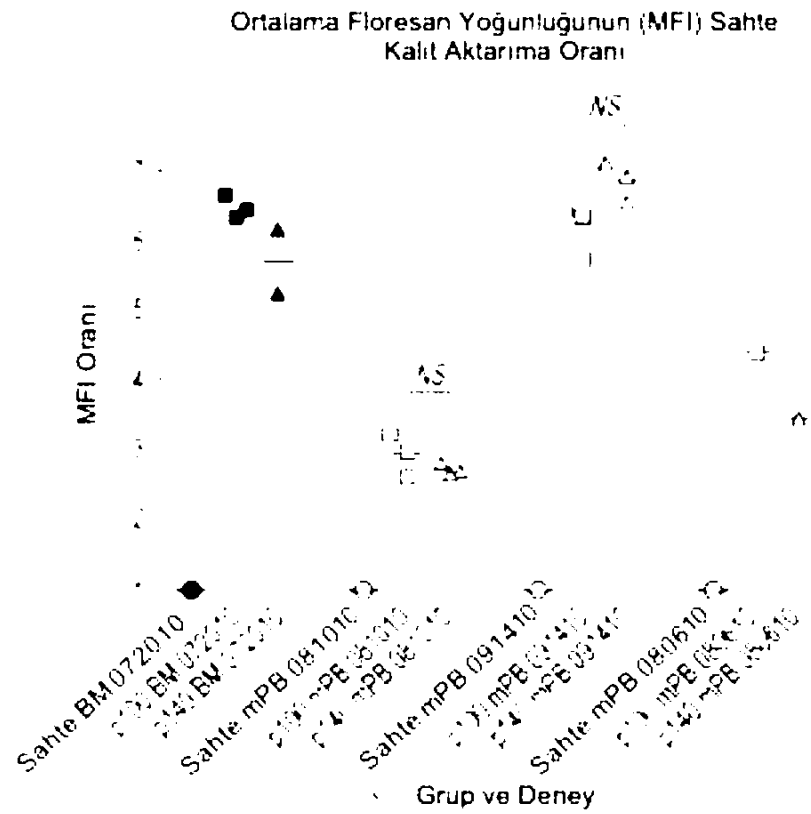
ŞEKİL 8A1



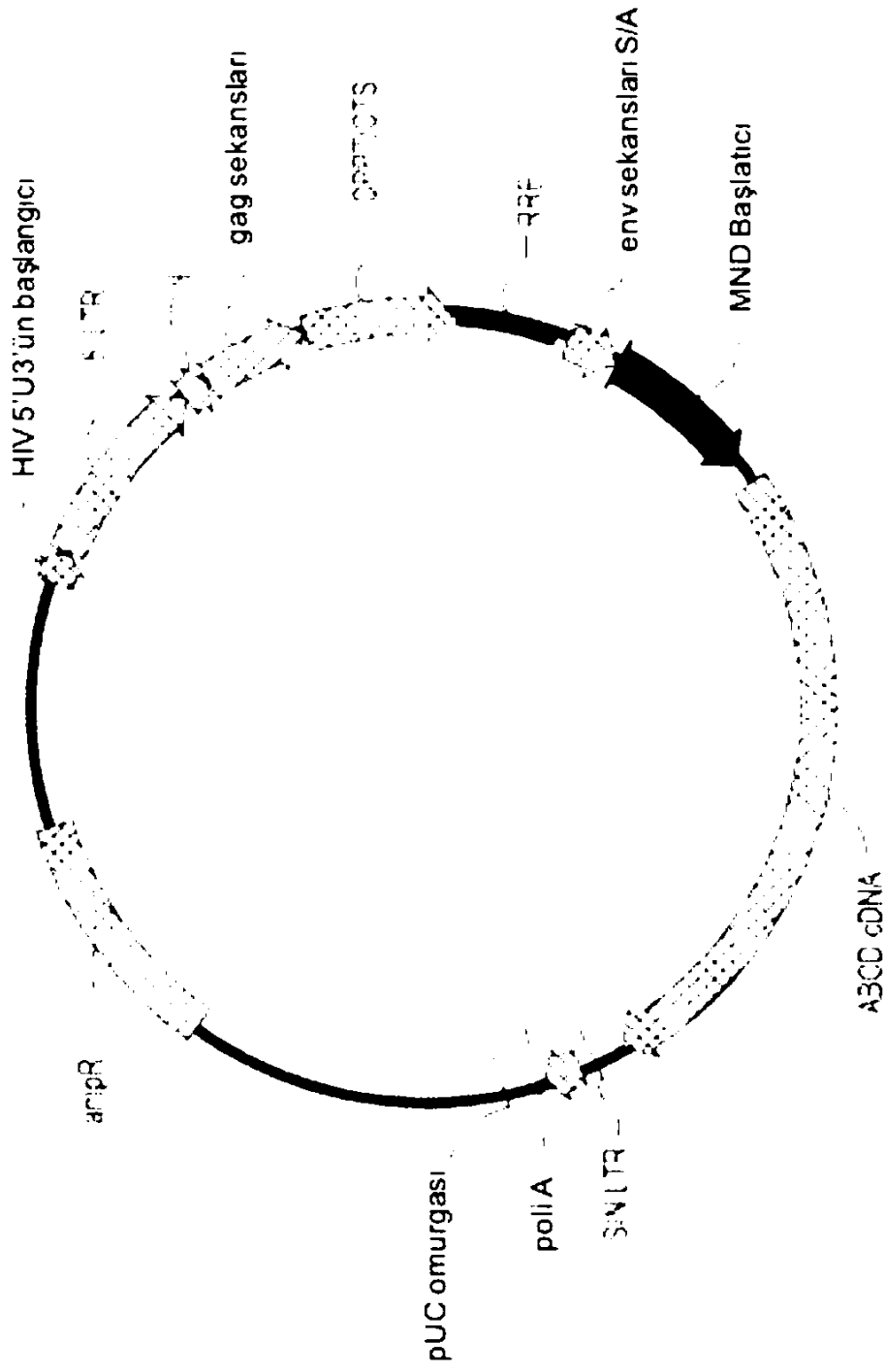
ŞEKİL 8A2



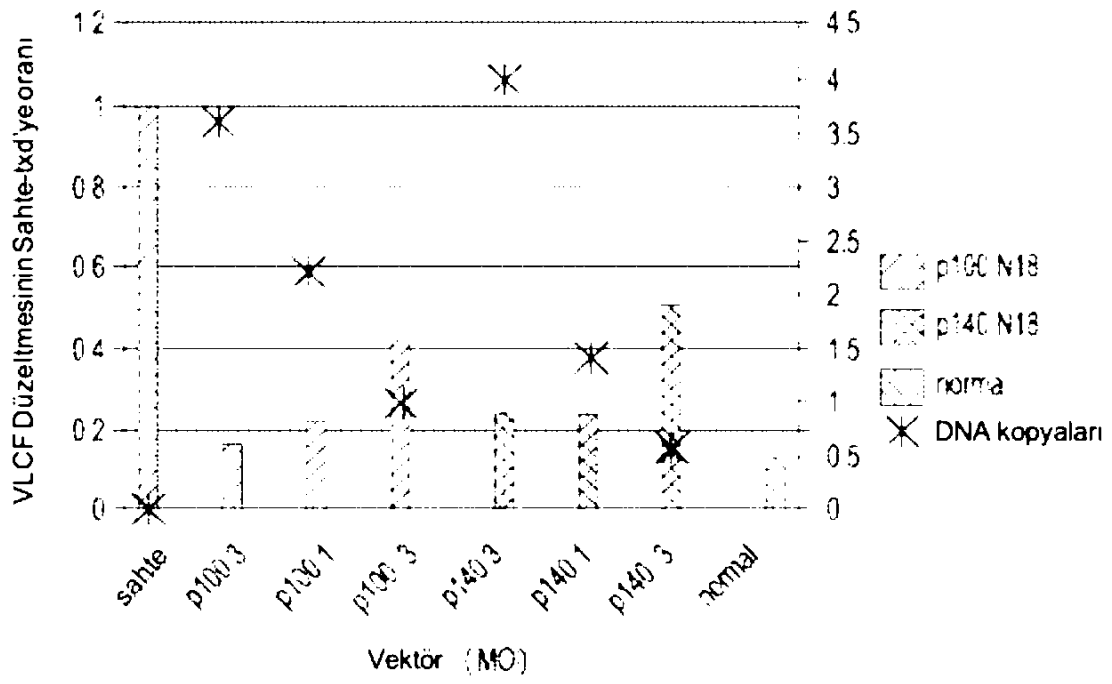
ŞEKİL 8B



ŞEKİL 8C



ŞEKİL 9



ŞEKİL 10