



المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia



الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

براءة اختراع

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

سانجامو ثيرابيوتكس، إنك.
SANGAMO THERAPEUTICS, INC.

بتاريخ : 1444/05/24 هـ
الموافق : 2022/12/18 م

براءة اختراع رقم : SA 11728

عن الإختراع المسمى :

بنيات خاصة بالكبد وطرق استخدامها , VIII مجموعات التعبير الوراثي للعامل

LIVER-SPECIFIC CONSTRUCTS, FACTOR VIII EXPRESSION CASSETTES AND METHODS OF USE THEREOF

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

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

مجموعات التعبير الوراثي للعامل VIII، بنيات خاصة بالكبد وطرق استخدامها

**LIVER-SPECIFIC CONSTRUCTS, FACTOR VIII EXPRESSION CASSETTES
AND METHODS OF USE THEREOF**

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يُعد الكشف الحالي في مجال العلاج الجيني، وبشكل خاص التوصيل المُستهدف لبنيات مُشفرة للتعديل الوراثي للكبد للتعبير عن بروتينات مفيدة (علاجية) liver for expression of beneficial (therapeutic) proteins. وبشكل خاص، يتعلق الكشف بعلاج أمراض سيولة الدم treatment of hemophilias مثل سيولة الدم أ Hemophilia A. 5

يُمكن استخدام العلاج الجيني Gene therapy للتعديل الجيني لخلية ليكون لديها واحدة أو أكثر من الحينات غير النشطة و/ أو للتسبب في جعل الخلية تُعبر وراثيًا عن مُنتج لم يتم انتاجه مُسبقًا في هذه الخلية (على سبيل المثال، بواسطة إدخال تعديل وراثي و/ أو تصحيح متوالية داخلية المنشأ). تتضمن الأمثلة على استخدامات إدخال التعديل الوراثي إدخال واحدة أو أكثر من الجينات التي تُشفّر واحدة أو أكثر من البروتينات العلاجية الجديدة، إدخال متوالية تشفير تُشفّر بروتين يكون مفقود في الخلية أو في الفرد، إدخال جين من النوع غير المعالج في خلية تحتوي على متوالية جين مطفر mutated gene sequence ، و/ أو إدخال متوالية تُشفّر حمض نووي encodes a structural nucleic acid مركبي مثل microRNA أو siRNA. تتضمن الأمثلة على التطبيقات المفيدة لـ: "تصحيح" متوالية داخلية المنشأ تعديلات طفرات الجين المرتبطة بالمرض، تعديلات في المتواليات المُشفرة لمواقع اللصق sequences encoding splice sites ، تعديلات في متواليات مُنظمة و/ أو تعديلات مُستهدفة لمتواليات مُشفرة للخصائص التركيبية لبروتين protein . 10 15

يُقدم نقل الجين الكبدي Hepatic gene transfer وسيلة فعالة لتوصيل جينات معدلة وراثيًا للخاضع لعلاج و/ أو الوقاية من الإضطرابات المختلفة، تتضمن سيولة الدم واضطرابات تخزين ليزوسومية lysosomal. أنظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 9,150,847 20

والمنشورات الأمريكية أرقام 20130177983 و 20140017212. تم وصف النواقل الخاصة بالعلاج الجيني الموجه للكبد. أنظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الدولية رقم

2014064277 ؛ 2009130208؛ والاوروبية رقم 2451474-1ب ، ، Chuah et al. ،

Nair et al. (2014) Blood ؛ و (2014) Molecular Therapy, 22, 1605-1613

5 123:3195-3199. يُمكن أن تتضمن هذه النواقل متواليات إنترون فيروس دقيق فئزاني من النوع

غير المعالج (MVM). أنظر، على سبيل المثال، Haut and Pintel (1998) J. Virol.

.72:1834-1843; Haut and Pintel (1998) Virol. 258:84-94

في الثدييات الكاملة، هناك آليات معقدة يُمكن تنظيمها إما بتنشيط أو تثبيط الأعضاء الخلوية للجهاز المناعي. على سبيل المثال، يتم إنشاء خلايا شجيرية dendritic cells (DCs) كممثلات

10 رئيسية في الإتزان بين التنشيط المناعي مقابل المقاومة المناعية. وتُعد هذه الخلايا هي أكثر

الخلايا قوة في تقديم مولد الضد في الجهاز المناعي وبشكل خاص الاحتجاز ومولدات الضد

الحالية لخلايا T الأصلية. يتفاعل DCs غير الناضج مع مولدات الضد القوية من خلال

مستقبلات خاصة مثل مستقبلات شبيهة الناقوس حيث يتم إحضار مولد الضد في الخلية بواسطة

احتساء دقيق. ثم يتم تكسير مولد الضد إلى بيبتيديات صغيرة يتم تقديمها إلى خلايا T بواسطة

15 المعقدات المتوافقة نسيجياً الكبرى. بالإضافة إلى ذلك، يفرز DCs الناضج وسطاء الالتهاب مثل

IL-1 β ، IL-12، IL-6، و TNF التي تعمل لتنشيط الخلايا T. على صعيد آخر، يلعب DCs

دور في مقاومة الجسم لبعض مولدات المضاد للاحتفاظ بالمقاومة المركزية وال طرفية. تكون DCs

مولدات التحمل Tolerogenic (toIDC) لديها كميات منخفضة من إشارات التحفيز المشترك

على أسطح الخلية ولديه تعبير منخفض للوسائط الإلتهابية الموصوفة أعلاه. ومع ذلك، تقوم

20 toIDCs بالتعبير الوراثي عن كميات كبيرة من السيتوكينات المضادة للالتهاب مثل IL-10

وعندما تتفاعل هذه الخلايا مع خلايا T الأصلية، يتم توجيه الخلايا T لتُصبح خلايا T المُنظمة/

مُعطلة (CD8+ Tregs) become anergic/regulatory T cells. في الحقيقة، تم

توضيح أنه يتم تحسين هذه العملية عند التحفيز المتكرر للخلايا T مع DCs غير

الناضجة/المولدة للمقاومة. يتم تحديد عدة عوامل تعمل بالتنسيق مع toIDCs لإحداث أنواع

25 مختلفة من Tregs. على سبيل المثال، يؤدي التعريض المشترك لخلايا T الأصلية مع toIDCs

و HGF، بيبتيډ VIP، TSLP أو فيتامين D3 إلى حث CD4+CD25+Foxp3+ Tregs،
التعرض المشترك مع TGF-β أو IL-10 يؤدي إلى Tr1 T regs والتعرض المشترك مع
الكورتيكو إسترويدات، راباميسين، حمض الريتينويك يُمكن أن يؤدي إلى CD4+/CD8+ Tregs
(Raker et al (2015) Front Immunol 6:art 569 and Osorio et al (2015))
5 (Front Immunol 6: art 535).

تعتبر سيولة الدم مثل سيولة الدم أ وسيولة الدم ب، هي اضطرابات جينية لنظام تجلط الدم،
يتصف بالنزيف في المفاصل والأنسجة الرخوية، كما يتصف بالنزيف الحاد في أي موقع يتعرض
للصدمة أو القيام بجراحة. لا يُمكن تمييز سيولة الدم أ إكلينيكيًا عن سيولة الدم ب، لكن يكون
العامل VIII (FVIII أو F8) ناقص أو غائب في سيولة الدم أ بينما يكون العامل IX (FIX أو
F.IX) ناقص أو غائب في مرضى سيولة الدم ب. يُشفر الجين F8 جليكوبروتين البلازما الذي
10 يدور بالارتباط مع عامل فان ويلبراند في صورته غير النشطة. عند إصابة السطح، تبدأ سلسلة
التجلط الداخلية ويتم إطلاق FVIII من المعقد ويصبح نشطًا. تعمل الصيغة النشطة مع العامل IX
لتنشيط العامل X ليصبح Xa النشط، مما يؤدي إلى تغير في الفيبرينوجين إلى فيبرين وإحداث
تجلط. أنظر، Levinson et al. (1990) Genomics 7(1):1-11. يكون 40 – 50% من
15 مرضى سيولة الدم أ لديهم إنقلاب كروموسومي يتضمن F8 إنترون 22 (المعروف أيضًا بـ
IVS22). يحدث الانعكاس بواسطة عودة الارتباط الجيني داخل الكروموسوم بين متواليات 9.6
كيلو قاعدة داخل الإنتررون 22 للجين F8 وواحدة من متواليات من أصل معكوس مرتبطتين
ارتباط وثيق موجودة عند حوالي 300 كيلو قاعدة أسفل الجين F8 gene، مما يتسبب في
انعكاس الإكسونات 1 إلى 22 فيما يتعلق بالإكسونات 23 إلى 26. أنظر، Textbook of
20 Hemophilia, Lee et al. (eds) 2005, Blackwell Publishing. يكون مرضى سيولة
الدم أ لديهم نقص في F8 يتضمن طفرات الموقع النشط، وطفرات هوائية وطفرات مغلطة.
إكلينيكيًا، يتم تقييم مرضى سيولة الدم أ وتقسيمهم إلى طبقات اعتمادًا على كم عدد المرات التي
عاني فيها المريض من نوبات نزيف، كم استغرقت هذه النوبات. يعتمد هذين الوصفين مباشرة
على كمية بروتين FVIII في دم المريض. وبشكل نموجي يكون مرضى سيولة الدم الشديدة لديهم
25 أقل من 1% من مستوي FVIII الطبيعي في الدم، يُظهروا نزيف بعد الإصابة وغالبًا نزيف عفوي

في مفاصلهم. يكون المرضى متوسطي الإصابة لديهم 1 - 5% من مستوى FVIII الطبيعي بينما المرضى ذو الإصابة الطفيفة لديهم 6% أو أكثر من FVIII الطبيعي ولديهم نوبات نزيف فقط بعد الإصابة الشديدة، الصدمة أو الجراحة (-) Kulkarni et al (2009) Haemophilia 15:1281-90). يتم علاج المرضى بسيولة الدم أ باستبدال بروتين FVIII المشتق إما من بلازما بشري أو يتم انتاجها بعودة الارتباط الجيني حيث يعتمد تكرار العلاج على نمط النزيف وشدة سيولة الدم. 5 يتلقى المرضى بسيولة الدم أ الشديدة علاج وقائي بشكل منتظم للوقاية من حدوث نزيف بينما المرضى الأقل حدة في الإصابة يُمكنهم تناول العلاج فقط حسب الحاجة بعد الإصابة.

تم وصف العلاج الجيني لمرضى سيولة الدم أ أو ب، يتضمن إدخال بلازميد plasmid أو نواقل vectors أخرى على سبيل المثال الفيروسات المرتبطة بالغدية Adeno-associated virus (AAV) المشفرة لبروتينات FVIII أو F.IX الوظيفية. (أنظر، على سبيل المثال، براءات الاختراع 10

الأمريكية أرقام 6,936,243؛ 7,238,346 و 6,200,560؛ ج Shi et al. (2007)

Thromb Haemost. (2):352-61; Lee et al. (2004) Pharm. Res. 7:1229-1232; Graham et al. (2008) Genet Vaccines Ther. 3:6-9; Manno et al. (2003) Blood 101(8): 2963-72; Manno et al. (2006) Nature Medicine

12(3): 342-7; Nathwani et al. (2011) Mol Ther 19(5): 876-85; Nathwani 15 McIntosh et al. (2013) و et al. (2011); N Engl J Med. 365(25): 2357-65 Blood 121(17):3335-44). ومع ذلك، في هذه البروتوكولات، يظل تكوين الأجسام المضادة المثبطة مضاد-العامل VIII أو IX (مضاد FVIII أو مضاد F.IX)، والأجسام المضادة ضد ناقل التوصيل هي المشكلة الأكبر لعلاج سيولة الدم المعتمد على استبدال FVIII و F.IX. أنظر،

على سبيل المثال، Scott & Lozier (2012) Br J Haematol. 156(3):295-302. 20

ومع ذلك، هناك حاجة لعديد النيوكليوتيدات الخاصة بالكبد (بنيات تعبير وراثي ونماذج وحدات نسخ) التي توجه التعبير الوراثي لواحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا (تتضمن الجينات المعدلة وراثيًا التي تُشفّر واحدة أو أكثر من البروتينات المفقودة في سيولة الدم) في خلايا الكبد بمستويات مرتفعة.

الوصف العام للاختراع 25

- يصف الاختراع الحالي تركيبات وطرق للتعبير الوراثي عن جين معدل وراثيًا في خلية كبد. يُمكن التعبير الوراثي عن جين معدل وراثيًا خارج الكروموسوم (يصبوغيًا) *chromosomally* (*episomally*) أو يُمكن إدخاله في جينوم خلية الكبد (على سبيل المثال، اندماج مستهدف يحدث بواسطة إنزيم النيوكلياز، على سبيل المثال في موقع الأليومين). في بعض التجسيديات، يُشفر الجين المعدل وراثيًا بروتين متضمن في مجموعة تسلسل التجلط. في تجسيديات مفضلة، يُشفر الجين المعدل وراثيًا عديد بيبتيدي *FVIII polypeptide*. تتسبب التركيبات والطرق الوصوفة هنا في هذا الاختراع في مستويات مرتفعة من إنتاج البروتين في المعمل وفي جسم الكائن الحي، يتضمن عند مستويات كافية لعرض تأثيرات (علاجية) ذات الصلة إكلينيكيًا في جسم الكائن الحي.
- 5
- في أحد الجوانب، يصف الاختراع الحالي بنية التعبير الوراثي عن عديد نيوكليوتيد *polynucleotide* تشمل متوالية فاصلة واحدة على الأقل تشمل متوالية عازلة *insulator* *sequence* ، متوالية مُحسنة خاصة كبدية *liver-specific enhancer sequence* على سبيل المثال، متوالية مُحسنة سبرين 1 *Serpin 1* من النوع غير المعالج أو المطفر *wild-type or mutated* ، متوالية محفزة *promoter sequence* على سبيل المثال، معزز الترانشيترين *wild-type or mutated transthyretin (TTR)* من النوع غير المعالج أو المطفر) وناقل على سبيل المثال، إنزيم النيوكلياز و/أو بروتين علاجي مثل افتقاد بروتين و/أو نقص في سيولة الدم أو مرض تخزين ليزوسومي). في تجسيديات معينة، تشمل بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد أيضًا متوالية إنترون (على سبيل المثال، فيروس دقيق من النوع غير المعالج أو المطفر لمتوالية إنترون فأر *wild-type or mutated minute virus of mice (MVM)*). في تجسيديات معينة، تشمل مجموعة التعبير الوراثي لعديد النيوكليوتيد متواليتين فاصلة تحيطان متوالية مُحسنة خاصة بالكبد، متوالية معززة، متوالية الإنترون والجين المعدل وراثيًا واختياريًا، إشارة عملي إضافة عديد الأدينيل. يُمكن استخدام أي متوالية (متواليات) عازلة، تتضمن على سبيل المثال لا الحصر أي متوالية عازلة مُطفرة أو من النوع غير المعالج (على سبيل المثال، واحدة أو أكثر من متواليات أرقام: 28، 29، 30 و/أو 38 في أي توليفة). في تجسيديات معينة، تشمل بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد *CRMSBS1* (المتوالية رقم: 37) أو *CRMSBS2* (المتوالية رقم: 34) التي تُصمم عديد النيوكليوتيد *polynucleotide*.
- 10
- 15
- 20
- 25

في جانب آخر، يصف الاختراع الحالي بنية تعبير عديد نيوكليوتيد يشمل متوالية مُحسنة خاصة كبدية (على سبيل المثال، متوالية مُحسنة سبرين 1 من النوع غير المعالج أو المطفر)، متوالية محفزة على سبيل المثال، معزز ترانسثيريتين من النوع غير المعالج أو المطفر (TTR) - wild type or mutated transthyretin (TTR) promoter ، متوالية إنترون كما هو موضح في أي من المتواليات رقم: 15، 16 أو 17 وناقل معدل وراثيًا (على سبيل المثال، إنزيم نيوكلياز و/ أو بروتين علاجي مثل إفتقاد بروتين و/ أو نقص في سيولة الدم أو مرض تخزين ليزوسومي). في تجسيديات معينة، تشمل مجموعة التعبير الوراثي لعديد النيوكليوتيد أيضًا متوالية فاصلة واحدة على الأقل تشمل متوالية عازلة و/أو إشارة عملية إضافة عديد الأدينيل polyadenylation signal .

في جانب آخر، يصف الاختراع الحالي بنية تعبير عن عديد النيوكليوتيد تشمل متوالية مُحسنة خاصة كبدية به طفرات عند المواقع 1، 5، 14، 32 و/ أو 39 الخاصة بأي من المتواليات أرقام: 1-13 (على سبيل المثال، كما هو موضح في المتوالية رقم: 35 أو 36)، متوالية محفزة (على سبيل المثال، معزز الترانسثيريتين wild-type or mutated transthyretin (TTR) من النوع غير المعالج أو المطفر)، وناقل على سبيل المثال، بروتين علاجي و/ أو إنزيم اليوكلياز و/ أو بروتين علاجي مثل افتقاد بروتين و/أو نقص في سيولة الدم أو مرض تخزين ليزوسومي . في تجسيديات معينة، تشمل بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد أيضًا متوالية إنترون (على سبيل المثال، فيروس دقيق من النوع غير المعالج أو المطفر لمتوالية إنترون فأر wild-type or mutated minute virus of mice (MVM) و/ أو متوالية فاصلة واحدة على الأقل تشمل متوالية عازلة و/أو إشارة عملية إضافة عديد الأدينيل polyadenylation signal .

في جوانب أخرى، يتم تقديم ناقل الفيروسات المرتبطة بالغدية Adeno-associated virus (AAV) يشمل أي بنيات التعبير عن عديد النيوكليوتيد الموصوف هنا في هذا الاختراع (على سبيل المثال، الذي فيه تكون بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد ما بين التكرارات النهائية المقلوبة 5' و 3' (ITRs) للناقل AAV).

في جوانب أخرى، يُقدم الاختراع الحالي تركيبات صيدلانية تشمل واحدة أو أكثر من نواقل AAV و/ أو واحدة أو أكثر من بنيات التعبير عن عديد النيوكليوتيد كما هو مذكور هنا في هذا الاختراع.

كما يُقدم الاختراع الحالي أيضًا طرق لتوفير بروتين لخاضع للعلاج في حاجة لذلك، تشمل الطريقة

إعطاء كبد الخاضع للعلاج بنية تعبير عن عديد نيوكليوتيد، ناقل الفيروسات المرتبطة بالغدية

Adeno-associated virus (AAV) أو تركيبة صيدلانية كما هو موصوف هنا للخاضع

للعلاج، حيث يشفر الجين المعدل وراثيًا البروتين ويتم إنتاج البروتين في الخاضع للعلاج. في

5 تجسيّدات معينة، يتم إدخال الجين المعدل وراثيًا في الجينوم الخاص بالخلية الكبدية في الخاضع

للعلاج. اختياريًا، تشمل الطريقة أيضًا إعطاء واحدة أو أكثر من إنزيم النيوكلياز للخاضع للعلاج،

حيث يشق إنزيم النيوكلياز جين الألبومين داخلي المنشأ ويتم إدخال الجين المعدل وراثيًا في جين

الألبومين داخلي المنشأ. يتم تقديم أيضًا طرق التعديل الجيني لخلية لتتضمن جين معدل وراثيًا

(على سبيل المثال، التي تُنتج بروتين)، تتضمن طرق إدخال الجين المعدل وراثيًا في الخلية

10 (يصبوغيًا أو اندماجيًا يتضمن الاندماج المُستهدف الذي يتوسطه إنزيم النيوكلياز). أيضًا يتم تقديم

طرق لحث مقاومة في ثديي لبروتين علاجي، الطريقة تشمل تعديل جيني لخلية (على سبيل

المثال، خلية يتم تعديلها لإنتاج بروتين كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع) في خاضع للعلاج

كما هو موصوف هنا وعلاج واحدة أو أكثر من الإسترويدات و/ أو مثبطات الخلية B بحيث

يصبح الثديي مقاوم للبروتين العلاجي.

15 في أحد الجوانب، يتم وصف بنية تعبير عن عديد نيوكليوتيد تشمل متوالية مُحسنة (على سبيل

المثال، متوالية مُحسن سيرين 1 من النوع غير المعالج أو المطفر)، متوالية محفزة (على سبيل

المثال، معزز الترانسكربت (TTRm) من النوع غير المعالج أو المطفر) والجين المعدل وراثيًا

واختياريًا، متوالية إضافة عديد الأدينيل (على سبيل المثال، متوالية إضافة عديد الأدينيل

signal peptide (SPA) synthetic polyadenylation sequence) و/ أو بيبتيدي إشارة

20 (SP). في تجسيّدات معينة، تشمل بنية التعبير الوراثي أيضًا متوالية إنترون على سبيل المثال،

النوع غير المعالج أو المطفر لمتوالية إنترون فأر wild-type or mutated minute virus of

mice (MVM) من نوع غير المعالج أو متوالية MVM مُطفر و/ أو إنترون استقطابي). في

تجسيّدات معينة، تشمل بنيات التعبير الوراثي في الإتهام 5' إلى 3'، متوالية مُحسنة، متوالية

محفزة، متوالية إنترونية، ناقل (يشمل اختياريًا بيبتيدي إشارة)، وإشارة إضافة عديد الأدينيل.

- يُمكن أن تتضمن مجموعة التعبير في أي ناقل فيروسي أو غير فيروسي، على سبيل المثال لا الحصر نواقل بلازميدية، ناقل فيروس غدي، نواقل الارتداد الفيروسي، ونواقل مرتبطة بالغدة adeno associated vector (AAV). في تجسيد مفضل، يتم تنفيذ بنية التعبير الوراثي على بنية AAV ويشمل أيضًا 5' و ITRs3 ' يحيط بنيات التعبير الوراثي كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع. اختياريًا، يُمكن أن تتضمن جزيئات عازلة (فاصلة) أيضًا بين واحدة أو أكثر من مكونات بنية التعبير الوراثي، على سبيل المثال، بين 5' ITR والمُحسن و/ أو بين إشارة إضافة عديد الأدينيل و 3' ITR. في بعض التجسيديات، تشمل المناطق العازلة (الفاصلة) أذرع مماثلة لتسهيل الاندماج المستهدف. في تجسيديات معينة، تكون البنية عبارة عن بنية كما تم توضيحها في أي من الأشكال 1، 2، 4، 6، 7، 10، 19، 20 أو 25. يتم عرض بنيتين توضيحتين في المتواليات رقم: 34 وفي المتواليات رقم: 37. سيتضح أنه يُمكن دمج المكونات المفردة (معزز، عازل (عوازل)، مُحسن، جين معدل وراثيًا) في أي توليفة مع مكونات أخرى مثل الموصوفة هنا في هذا الاختراع.
- في أي من عديد النيوكليوتيدات الموصوفة هنا في هذا الاختراع، يُمكن أن يكون المُحسن مُشتق من مُحسن السيرين-1. في تجسيديات معينة، يكون المُحسن عبارة عن متواليات من نوع غير معالج. في تجسيديات أخرى، يشمل المُحسن واحدة أو أكثر من التعديلات مقارنة بالنوع غير المعالج، على سبيل المثال مُحسن السيرين 1 يحتوي على واحدة أو أكثر من تعديلات عديد النيوكليوتيد كما هو موضح في الشكل 5، تعديلات عديد النيوكليوتيد عند واحدة أو أكثر من الوحدات البنائية 1، 5، 14، 32 و/ أو 39 الموضحة في أي من المتواليات أرقام: 1-13. في تجسيديات معينة، يشمل مُحسن السيرين 1 تعديلات عند المواقع 1، 5، 14 و 32 الخاصة بأي من المتواليات أرقام: 1 - 13 بينما في التجسيديات الأخرى، يشمل مُحسن السيرين 1 تعديلات عند المواقع 1، 14، 32 و 39 أو أي من المتواليات أرقام: 1 - 13. يتم توضيح متواليات مُحسن توضيحية في المتواليات رقم: 35 و 36. في بعض التجسيديات، يشمل عديد النيوكليوتيدات الموصوفة هنا في هذا الاختراع 1، 2، 3، 4، 5 أو أكثر من عناصر مُحسنة. في تجسيديات معينة، تكون 1، 2، 3، 4، 5 أو أكثر من العناصر المُحسنة مطابقة حيث يتم استخدام التجسيديات الأخرى، أكثر من نوع واحد من العنصر المُحسن.

يُمكن أن يشمل أي من عديد النيوكليوتيدات الموصوفة هنا في هذا الاختراع اختياريًا متوالية إنترن. في تجسيدات معينة، تتضمن بنية التعبير الوراثي متوالية إنترن استقطابي، على سبيل المثال كما هو موضح في اللوحات السفلية للأشكال 6 و 7. يكون الإنترن الاستقطابي-T عبارة عن إصدار مقطوع للإنترن الاستقطابي في pCI-neo (GenBank U47120). يكون

- 5 الإنترن الاستقطابي في pCI-neo عبارة عن موقع مانح القطعة 5' من جين جلوبيولين - البشرية، وموقع مستقبل 3' ونقطة التفرع للمنطقة المتغيرة ثقيلة السلسلة لجين الجلوبيولين المناعي. يحتوي إنترن الإستقطاب - T على 45 زوج من القواعد حذف بين مانح القطعة 5' ونقطة التفرع. في تجسيدات أخرى، تتضمن بنية التعبير الوراثي متوالية إنترن MVM مُطرقة (على سبيل المثال، واحدة أو أكثر من الطفرات الموضحة في الأشكال 12، 13 و 14 (متواليات أرقام: 15 - 17)).
- 10 بدلاً من ذلك، يُمكن أن تفتقد بنيات التعبير الوراثي متوالية إنترونية، على سبيل المثال كما هو موضح في البنيات الموضحة في الألواح الوسطى للأشكال 6، 7، 19 و 20.

- يُمكن أن تتضمن بنيات التعبير الوراثي للاختراع أيضًا متواليات عازلة مُثلى بين AAV ITRs ومجموعة التعبير الوراثي. في تجسيدات معينة، تشمل بنية التعبير الوراثي مناطق عازلة (فاصل) (على سبيل المثال Ins1 و Ins3، المتواليات أرقام 15 أو 28 والمتواليات أرقام: 17 أو 30، (على التوالي)، و Ins2 (المتواليات أرقام: 16 أو 29). في تجسيدات معينة، تشمل بنية التعبير Ins4 (المتوالية رقم: 38). يُمكن استخدام أي من المتواليات العازلة في أي من الموقع 5' أو 3'، ويُمكن استخدام أي توليفة من المتواليات العازلة داخل بنية التعبير الوراثي. ويُفضل بشكل خاص هو التوليفات ل Ins1 في الموقع 5' و Ins3 في الموقع 3'.

- تتضمن بنيات التعبير الوراثي كما هي موصوفة هنا في هذا الاختراع أيضًا وتعبير وراثيًا عن واحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا. يُمكن التعبير الوراثي عن أي جين (جينات) معدلة وراثيًا باستخدام عديد النيوكليوتيدات الموصوف هنا في هذا الاختراع، يتضمن، على سبيل المثال لا الحصر، الجينات المعدلة وراثيًا التي تشفر اصدارات وظيفية لبروتينات تفتقد أو لديها نقص في أي مرض جيني، تتضمن، على سبيل المثال لا الحصر، اضطرابات تخزين ليزوسومي (على سبيل المثال، Neimann-Pick's، Hurler's، Hunter's، Fabry's، Gaucher's، بيلة الفينيل كيتون (PKU) Phenylketonuria) إلخ، اضطرابات أيضية metabolic disorders، و/
- 25

- أو اضطرابات بالدم blood disorders مثل سيولة الدم hemophilias واعتلالات الهيموجلوبين hemoglobinopathies ، إلخ، أنظر، على سبيل المثال، المنشور الأمريكي رقم 20140017212 و 20140093913؛ براءات الاختراع الأمريكية أرقام 9,255,250 و 9,175,280. تتضمن الأمثلة غير المحدودة على البروتينات التي يُمكن التعبير الوراثي عنها كما هو مذكور هنا في هذا الاختراع فيبرينوجين fibrinogen ، بروثرومبين prothrombin ، عامل النسيج tissue factor ، العامل V، العامل VII، العامل VIII، العامل IX، العامل X، العامل XI، العامل XII عامل هاجمان Hageman factor ، العامل XIII عامل تثبيت الفيبرين fibrin-stabilizing factor ، عامل فان ويلبراند von Willebrand factor ، بريكالين high molecular weight kininogen ، كينينوجين ذو وزن جزيئي عالي (العامل Fitzgerald)، فيبرونيكتين fibronectin ، مضاد الثرومبين III antithrombin ، العامل المشترك هيبارين II heparin cofactor ، بروتين C، بروتين S، بروتين Z، مثبط البروتياز المرتبط ببروتين Z، بلازمينوجين plasminogen ، ألفا 2-مضاد البلازمين alpha 2-antiplasmin ، منشط البلازمينوجين النسيجي tissue plasminogen activator ، اليوروكيناز urokinase ، مثبط منشط البلازمينوجين-1 plasminogen activator inhibitor-1 ، مثبط منشط البلازمينوجين-2، جلوكو سيربروسيداز plasminogen activator inhibitor-2 ، (GBA) glucocerebrosidase ، α -جالاكتوسيداز α -A ، (GLA) galactosidase A ، إندورونات سلفاتاز (IDS) iduronate sulfatase ، أيدورونيداز (IDUA) iduronidase ، حمض الإسفنجيو ميليناز acid sphingomyelinase ، (SMPD1) ، (MTRR ، MMADHC (C2orf25) ، MMACHC ، MMAB ، MMAA ، MTR ، LMBRD1 ، إنزيم البروبيونيل-CoA كربوكسيلاز (PCC) propionyl-CoA carboxylase (الوحدات الفرعية PCCA و/ أو PCCB)، بروتين ناقل جلوكوز-6-فوسفات protein or (G6PT)glucose-6-phosphate transporter أو جلوكوز-6-فوسفاتاز ، (ApoB ، (LDLR) LDL receptor ، (G6Pase) glucose-6-phosphatase ، PCSK9 ، LDLRAP-1 ، بروتين ميتوكونديري mitochondrial protein مثل NAGS إنزيم التخليق N-أسيتيل جلويتامات N-acetylglutamate synthetase ، CPS1 إنزيم التخليق 25 كاربامويل فوسفات I carbamoyl phosphate synthetase I ، و OTC أورنيثين ترانس

- كرياميلاز ornithine transcarbamylase ، ASS إنزيم تخليق الأرجينينو حمض السكسينيك
argininosuccinic acid synthetase ، ASL إنزيم حمض الأرجينينو سكسيناز لبياز
argininosuccinase acid lyase و/أو بروتين ARG1 أرجيناز ، و/أو عائلة
حامل مادة مُذابة 25 25 Solute carrier family 25 ، حامل أسبارتات/
5 جليوتامات aspartate/glutamate carrier ، UGT1A1 أو UDP جلوكيورونسيل ترانسفيراز
عديد البيبتيد A1 A1 glucuronosyltransferase polypeptide ، إنزيم الفيوماريل أسيتو
أسيتات هيدرولياز (FAH) fumarylacetoacetate hydrolyase ، بروتين أنيلين-جليوكسيلات
أمينو ترانسفيراز (AGXT) alanine-glyoxylate aminotransferase ، بروتين إنزيم اختزال
جليوكسيلات/ إنزيم اختزال هيدروكسي بيروفات glyoxylate reductase/hydroxypyruvate
10 reductase (GRHPR) ، بروتين جين الترانس ثيريتين (TTR) transthyretin gene ،
بروتين ATP7B protein ، بروتين الفينيل ألانين هيدروكسيلاز phenylalanine
hydroxylase (PAH) ، بروتين إنزيم تحلل بروتين دهني (LPL) lipoprotein lyase ، إنزيم
النيوكلياز المعدل وراثيًا، عامل النسخ المعدل وراثيًا و/ أو شظية متغيرة لجسم مضاد مفردة السلسلة
مُعدلة وراثيًا (جسم ثنائي، جملي، إلخ). في تجسيد مُفضل آخر، يُشفر الجين المعدل وراثيًا عديد
15 بيبتيد FVIII. في بعض التجسيديات، يشمل عديد البيبتيد FVIII polypeptide حذف المجال B.
في بعض التجسيديات، تتضمن واحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا متواليات تُشفر إنزيم
النيوكلياز المعدل وراثيًا (على سبيل المثال، أنظمة ZFNs ،TALENs ،TtAgo،
و CRISPR/Cas). في تجسيديات أخرى، تضمن الجينات المعدلة وراثيًا متواليات تُشفر عوامل
النسخ المعدلة وراثيًا (على سبيل المثال أنظمة ZFP-TFs ،TALE-TFs ، CRISPR/Cas-
20 TF). يُمكن أن تتضمن الجينات المعدلة وراثيًا أيضًا متواليات تُشفر جسم مضاد مفرد السلسلة
خاص بالهدف محل الإهتمام. بالإضافة إلى ذلك، يُمكن أن يتضمن الجين المعدل وراثيًا متواليات
تُشفر RNA تركيبية (على سبيل المثال RNAi ،shRNA ،miRNA).
- في جوانب معينة، يتم إدخال عديدات النيوكليوتيد كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع في خلية
حيث يتم الاحتفاظ بهم يصبوغيًا أثناء توجيه التعبير الوراثي للجين المعدل وراثيًا. في جوانب
25 أخرى، يتم إدخال بنيات التعبير الوراثي عشوائيًا في جينوم الخلية التي تم إدخالهم فيها. في جوانب

إضافية يتم إدخال بنيات التعبير الوراثي الموجهة للتعبير الوراثي للجين المعدل وراثيًا في جينوم بواسطة الإندماج المُستهدف الذي يحدث بواسطة إنزيم النيوكلياز nuclease.

5 في جوانب أخرى، يتم تقديم طرق للتعبير الوراثي عن واحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا في خلية كبدية، تشمل الطرق إدخال واحدة أو أكثر من بنيات التعبير الوراثي كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع في الخلية حيث يتم التعبير الوراثي عن الجين المعدل وراثيًا في الخلية. في تجسيّدات معينة، يتم حمل بنية التعبير الوراثي على ناقل فيروسي أو غير فيروسي، ويُفضل ناقل AAV (على سبيل المثال AAV2 أو AAV2/6).

10 في جانب آخر، يتم تقديم طريقة للتعبير الوراثي عن واحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا في حيوان على قيد الحياة، تشمل الطرق إعطاء واحدة أو أكثر من مجموعات التعبير الوراثي كما هو موصوف هنا في الحيوان الحي. في تجسيّدات معينة، يتم إعطاء مجموعات التعبير الوراثي لكبد حيوان حي. في تجسيّدات معينة، يتم حمل بنية التعبير الوراثي على ناقل فيروسي أو غير فيروسي، ويُفضل ناقل الفيروسات المرتبطة بالغذية Adeno-associated virus (AAV) (على سبيل المثال AAV2، AAV2/6 أو AAV2/8).

15 في بعض التجسيّدات، يُقدم الاختراع طرق وتركيبات للتعبير الوراثي عن مستويات ذات صلة علاجية لواحدة أو أكثر من البروتينات العلاجية من واحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا. في تجسيّدات معينة، يتسبب التعبير الوراثي عن بنية جين معدل وراثيًا تُشفّر بروتين استبدال في 1% من المستويات الطبيعية للبروتين الذي تم إنتاجه، بينما في الآخرين، يتم إنتاج 2%، 3%، 4%، 5%، 10%، 15%، 20%، 30%، 50%، 80%، 100%، 150%، 200% أو أكثر من المستويات الطبيعية للبروتين. في بعض التجسيّدات المفضّلة، يُشفّر الجين المعدل وراثيًا بروتين

20 FVIII وكمية ذات الصلة علاجياً للبروتين. في بعض التجسيّدات، كنتيجة لاستخدام الطرق والتركيبات الخاصة بالاختراع، يكون مريض بشري لديه كمية مرتفعة من بروتين علاجي في الدم الخاص به مما ينتج عنه نقص في الأعراض الإكلينيكية. في جوانب معينة، يتسبب إنتاج البروتين العلاجي بواسطة الطرق والتركيبات الموصوفة هنا في مريض بشري في نقص زمن التجلط بعد الإصابة مقارنة بمريض لم يتم معالجته أو مقارنته بالمريض قبل العلاج. في بعض الجوانب،

يتطلب مريض بشري يتم معالجته بالطرق والتركيبات الخاصة بالاختراع كمية منخفضة من العلاج البديل عن مريض لم يتم معالجته أو مقارنته بمريض قبل العلاج.

- 5 في بعض التجسيديات، يُمكن استخدام الطرق والتركيبات الخاصة بالاختراع كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع لإحداث مقاومة في نديي لبروتين علاجي بحيث تظل مستويات البروتين العلاجي التي تم تشفيرها بواسطة الجين المعدل وراثيًا عند مستويات ذات صلة علاجية بعد ارتفاع مؤقت في أجسام مضادة لبروتين مضاد علاجي. ومن ثم، يتم تقديم طريقة لإحداث مقاومة لبروتين علاجي في خاضع للعلاج، تشمل الطريقة تعديل جيني لخلية في خاضع للعلاج باستخدام الطرق كما هي موصوفة هنا في هذا الاختراع (على سبيل المثال، حيث تنتج الخلية بروتين علاجي)، معالجة اختيارية لخاضع للعلاج بتركيبات إضافية (على سبيل المثال، إسترويدات و/ أو مثبطات الخلية B) حيث يصبح الحيوان مقاوم للبروتين العلاجي. في بعض التجسيديات، يتم إدخال (إندماج) للبروتين العلاجي في خلايا مُستقبلة في نفس وقت العلاج بإسترويد مثبط مناعي أو مثبط الخلية B، حيث في حالات أخرى، لا يتم إعطاء مواد مُعدلة مناعية للحيوان. في بعض الحالات، يتم إعطاء عامل مُعدل مناعي فقط لو تم توليد أجسام مضادة لبروتين مضاد علاجي. في حالات أخرى، يتم منع العامل المُعدل للمناعة بعد فترة من الزمن.
- 15 في جانب آخر، يتم تقديم تركيبات صيدلانية تشمل واحدة أو أكثر من الخلايا، بنيات التعبير الوراثي و/ أو إنزيم النيوكلياز الاختياري الموصوف هنا في هذا الاختراع.
- 20 في جوانب معينة، يتم تقديم طرق وأنظمة للإندماج المُستهدف لمجموعة التعبير المرثي الخاص بالكبد. تشمل الطرق والأنظمة إعطاء واحدة أو أكثر من مجموعات التعبير الوراثي كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع وإعطاء واحدة أو أكثر من إنزيمات النيوكلياز الخاصة بجين مُستهدف للخلية. بعد انشقاق يحدث بواسطة إنزيم النيوكلياز للجين المُستهدف، يتم إدخال مجموعة التعبير الوراثي في الجين عن طريق آليات مستقلة عن التماثل أو معتمدة على التماثل. في تجسيديات معينة، يكون الجين المُستهدف عبارة عن جين ألبومين داخلي المنشأ.
- بالنسبة للاندماج المُستهدف الذي يتوسطه إنزيم النيوكلياز nucleases لبنيات التعبير الوراثي الخاصة بالاختراع الحالي، يُمكن استخدام أي إنزيم نيوكلياز، يتضمن على سبيل المثال لا الحصر،

واحدة أو أكثر من إنزيمات نيوكلياز إصبع الزنك zinc finger nucleases (ZFNs)،
TALENs، إنزيم نيوكلياز CRISPR/Cas و/ أو إنزيم نيوكلياز TtAgo، حيث يتم اندماج بنية
التعبير الوراثي في المنطقة (جين) التي تم شقها بواسطة إنزيم (إنزيمات) النيوكلياز. في تجسيدات
معينة، يتم استخدام واحدة أو أكثر من أزواج إنزيمات النيوكلياز. يُمكن إدخال إنزيمات النيوكلياز
5 في صيغة mRNA أو يُمكن إعطاءها في الخلية باستخدام نواقل فيروسية أو غير فيروسية. في
بعض الجوانب، يُمكن توصيل عديدات نيوكليوتيدات إنزيم النيوكلياز بواسطة فيروس lentivirus
أو بواسطة فيروس lentivirus غير الإندماجي. في جوانب أخرى، يُمكن توصيل مجموعة التعبير
الوراثي بواسطة قليات الوحدات DNA و/أو AAV.

10 في جانب آخر، يتم تقديم طرق لتوفير واحدة أو أكثر من البروتينات الوظيفية التي تفتقد أو لديها
نقص في ثديي، أو في رئيسيات، مثل رئيسيات بشرية، مثل مريض بشري بمرض (على سبيل
المثال، مرض أبيض، مرض تخزين ليزوسومي lysosomal storage disease (LSD)،
إعتلال هيموجلوبيني hemoglobinopathy و/ أو سيولة الدم hemophilia، على سبيل المثال
لعلاج المرض بواسطة الإمداد ببروتين (بروتينات) مفتقد أو ناقص في الخاضع للعلاج. في جانب
آخر، يتم تقديم طرق لتوفير بروتين وظيفي لعلاج اضطراب يكون فيه البروتين مفقود، ناقص أو تم
15 التعبير عنه بشكل شاذ. في تجسيدات أخرى، تشمل الطرق إعطاء مجموعة تعبير وراثي يُشفر
بروتين علاجي مفيد في الوقاية من أو علاج اضطراب. في جانب آخر، يتم وصف طرق هنا في
هذا الاختراع لتوفير بروتين علاجي لعلاج اضطراب حيث يكون البروتين العلاجي عبارة عن جسم
مضاد ذو سلسلة مفردة. في تجسيدات معينة، تشمل الطرق إعطاء مجموعة تعبير وراثي (على
سبيل المثال، ناقل AAV) كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع لكبد خاضع للعلاج في حاجة
20 لذلك. في تجسيدات أخرى، تشمل الطريقة إعطاء خلية مُعدلة (تُعبّر جينيًا عن إصدار وظيفي
لبروتين تم التعبير عنه بشكل شاذ في خاضع للعلاج من مجموعة تعبير كما هو موصوف)
للخاضع للعلاج. ومن ثم، يُمكن إدخال خلية معزولة في الخاضع للعلاج (علاج الخلية خارج جسم
الكائن الحي) أو يُمكن تعديل الخلية عندما تكون جزء من الخاضع للعلاج (في جسم الكائن
الحي).

- في أي من التركيبات والطرق الموصوفة، يُمكن حمل مجموعات التعبير الوراثي و/أو إنزيم النيوكلياز على ناقل AAV، يتضمن على سبيل المثال لا الحصر AAV1، AAV3، AAV4، AAV5، AAV6، AAV8، AAV9 و AAVrh10 أو AAV نوع كاذب مثل AAV2/8، AAV8.2، AAV2/5 و AAV2/6 وما شابه. في تجسيديات معينة، يتم توصيل عديدات النيوكليوتيد (بنيات التعبير الوراثي و/ أو إنزيم النيوكلياز) باستخدام نفس أنواع الناقل AAV. في 5 تجسيديات أخرى، يتم توصيل عديد النيوكليوتيدات باستخدام أنواع نواقل AAV مختلفة. يُمكن توصيل عديدات النيوكليوتيدات باستخدام واحدة أو أكثر من النواقل. في تجسيديات معينة، يتم توصيل عديدات النيوكليوتيدات بواسطة الإعطاء داخل الوريد (على سبيل المثال، وريد داخل الباب الكبدي) في الكبد الخاص بحيوان سليم. في تجسيديات أخرى، يتم توصيل عديد النيوكليوتيدات بواسطة الإعطاء في الوريد في وريد محيطي. 10
- في أي من التركيبات والطرق الموصوفة هنا في هذا الاختراع، يُمكن أن يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا بروتين F8، على سبيل المثال عامل VIII محذوف المجال-B (BDD-F8). في تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا بروتين عامل IX. في تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا بروتين العامل VII. في 15 تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا بروتين العامل X. في بعض التجسيديات، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا جلوكوسبروسيداز. في تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا α جالاكتوسيداز. في تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا أيديورونات-2-سلفاتاز. في تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا ألفا-L-أيديورونيداز. في 20 تجسيديات أخرى، يشمل البروتين المُشفر بواسطة الجين المعدل وراثيًا إسفنجيو ميلين فوسفو داي إستراز. في بعض التجسيديات، يُشفر الجين المعدل وراثيًا جسم مضاد مفرد السلسلة. في تجسيديات أخرى، يُشفر الجين المعدل وراثيًا RNA تركيبية. في أي من التركيبات والطرق الموصوفة هنا في هذا الاختراع، يشمل الجين المعدل وراثيًا أيضًا مُنظم نسخ بينما في الآخرين، لا يشمل ويتم تنظيم النسخ بواسطة منظم داخلي المنشأ. في جانب آخر، تشمل الطرق الخاصة بالاختراع تركيبية 25 لمعالجة علاجية لخاضع للعلاج في حاجة لذلك. في بعض التجسيديات، تشمل التركيبية خلايا

جذعية تم تعديلها وراثيًا تشمل إنزيم النيوكلياز الخاص المأوي بأمان جين معدل وراثيًا يُشفر العامل VII، F8، F.IX، العامل X، GBA، GLA، IDS، IDUA، جسم مضاد مفرد السلسلة و/ أو بروتين SMPD1 أو شظية وظيفية و/ أو جزء منها. في تجسيديات أخرى، تشمل التركيبات خلايا جذعية تم تعديلها والتعبير عن جين معدل وراثيًا يُشفر العامل VII، F8، F.IX، العامل X، 5 GBA، GLA، IDS، IDUA، الجسم المضاد مفرد السلسلة و/ أو بروتين SMPD1 أو شظية وظيفية و/ أو جزء منها.

يُمكن ممارسة الطرق الموصوفة هنا في هذا الاختراع في المعمل، خارج جسم الكائن الحي أو في جسم الكائن الحي. في تجسيديات معينة، يتم إدخال التركيبات في الثدي حي، سليم. يُمكن أن يكون الثديي عند أي مرحلة من التطوير عند زمن التوصيل، على سبيل المثال، بدائي، جنيني، حديث الولادة، طفلي، حديث السن أو بالغ. بالإضافة إلى ذلك، يُمكن أن تكون الخلايا المُستهدفة سليمة أو مريضة. في تجسيديات معينة، يتم توصيل واحدة أو أكثر من التركيبات في الوريد (على سبيل المثال، للكبد بواسطة وريد داخل باب الكبد، على سبيل المثال حقن وريد الذيل)، في الشريان، في الغشاء البريتوني، في العضلات، في متن الكبد (على سبيل المثال، بواسطة الحقن)، في الشريان الكبدي (على سبيل المثال، بواسطة الحقن)، و/ أو من خلال شجرة المرارة (على سبيل المثال، 10 بواسطة الحقن). 15

لاستهداف التركيبات لنوع معين من الخلية، على سبيل المثال، الصفائح الدموية، الأرومات الليفية، الخلايا الكبدية، إلخ، ترتبط واحدة أو أكثر من التركيبات التي تم إعطائها مع عامل استضافة يرتبط بشكل خاص بمستقبل على سطح الخلية. على سبيل المثال، يُمكن أن يترافق الناقل مع رابط (على سبيل المثال، جالاكتور) له مستقبلات على خلايا نظام كبدي معين. يُمكن أن يكون الترافق 20 تساهمي، على سبيل المثال، عامل الارتباط التعابري مثل الجليوتار أدهيد، أو غير تساهمي، على سبيل المثال، ارتباط رابط أفيديني بناقل بيوتينيلي. يتم تقديم صيغة أخرى للمترافق التساهمي بواسطة التعديل الوراثي للبلازميد المساعد AAV المُستخدم لتحضير مخزون ناقل بحيث تكون واحدة أو أكثر من بروتينات غلاف التشفير عبارة عن هجين لبروتين غلاف AAV الأصلي ورابط بروتين أو بيبتيدي، حيث يتم تعريض الربط للسطح الخاص بالجزئ الفيروسي.

يتم تقديم طاقم، يشمل واحدة أو أكثر من بنيات التعبير الوراثي، نواقل AAV، خلية و/ أو تركيبات صيدلانية تم وصفها هنا في هذا الاختراع أيضًا. يُمكن أن يتضمن الطاقم أحماض نووية تُشفر إنزيم النيوكلياز، (على سبيل المثال جزيئات RNA التي تُشفر ZFNs، TALENs أو Cas وبروتينات Cas المُعدلة، و RNAs الموجه)، أو جرعات متساوية من بروتينات النيوكلياز، خلايا، تعليمات لإجراء الطرق الخاصة بالاختراع، وما شابه.

ستوضح هذه الجوانب وجوانب أخرى للماهر في المجال في ضوء الكشف الحالي في مجموعته.

شرح مختصر للرسومات

الشكل 1 عبارة عن مخطط يوضح مجموعة عناصر الجين المعدل وراثيًا، والخطوات التي تم اتباعها لتحديد إنترونات ومُحسنات تم تحسينها.

الشكل 2 عبارة عن مخطط يوضح محفز TTRm الرئيسي و بنيات HLP مع العوازل 1-3 ("Ins1-3"). تشير SerpE إلى مُحسِّن سبرين من الجين SERPINA1 وهو عنصر تنظيمي خاص بسبرين الكبد. يشير TTRm إلى الحد الأدنى من محفز لبروتين ربط الثيروكسين. بينما يشير HLP إلى محفز الكبد الخاص المختلط (McIntosh et al., ibid). يشير hFVIII إلى الجين المعدل وراثيًا المحذوف من مجال العامل البشري VIII B. يشير SP إلى ببتيد الإشارة. بينما يشير ITR إلى تكرار النهاية المعكوسة. كما يشير SPA إلى متوالية تعدد إضافة الادينيل المُخلقة.

الشكل 3 عبارة عن رسم بياني يوضح ناتج بنيات AAV المختلفة التي تشتمل على متواليات عازلة مختلفة أو مناطق تحفيز. وأوضح الرسم البياني ناتج مُحسنة من Ins1-Ins3 مقارنة ب-Ins1 Ins2 في سياق محفز TTRm الرئيسي أو بنيات HLP hybrid liver promoter. تم إنتاج الفيروس في خلايا HEK293، تم جمع الناتج من مصنع خلايا (2CF). يشير SerpE إلى مُحسِّن سبرين من جين SERPINA1 وهو عنصر تنظيمي خاص بسبرين في الكبد. يشير TTRm إلى الحد الأدنى من محفز بروتين ربط الثيروكسين. يشير HLP إلى محفز كبدي خاص مختلط (McIntosh et al., ibid). يشير hFVIII إلى الجين المعدل وراثيًا المحذوف من مجال

العامل البشري VIII B. يشير SP إلى ببتيد الإشارة. بينما يشير ITR إلى تكرار النهاية المعكوسة. كما يشير SPA إلى متوالية تعدد إضافة الادينيل المُخلقة.

الشكل 4 عبارة عن مخطط يوضح اساسيات، والبنىات مع محسنات جديدة توصف ك CRMSBS1 و CRMSBS2، حيث يحمل كل منها جين معدل وراثيًا محذوف من مجال عامل VIII B البشري (عامل VIII-BDD). يشير "SerpE" إلى مُحسّن سربين من جين SERPINA1 وهو عنصر تنظيمي خاص بسربين في الكبد. يشير TTRm إلى الحد الأدنى من محفز بروتين ربط الثيروكسين. يشير "SBS" إلى مرجع سانجامو الداخلي الرقمي للعلوم الحيوية. يشير hFVIII إلى عامل جين VIII BDD المعدل وراثيًا البشري. يشير SP إلى ببتيد الإشارة. بينما يشير ITR إلى تكرار النهاية المعكوسة. كما يشير SPA إلى متوالية تعدد إضافة الادينيل المُخلقة. "Ins1" و "Ins3" كما هو موضح أعلاه في الشكل 2.

يوضح الشكل 5 (المتوالية رقم: 1 إلى 13) ترصيف جين SERPINA1 من أنواع متعددة باستخدام ترصيف ENCODE للأنواع المتعددة من جين SERPINA1. لا تظهر الوحدات البنائية المتطابقة (أشير إليها ب "."). المناطق المحددة بإطار المشار إليها من 1 إلى 5 هي مواقع التعديل في المتوالية. كما هو مبين بالأعمدة السوداء في اللوحة الوسطى عبارة عن مناطق حساسية DNase 1 في خلايا HepG2. يتضمن CRMSBS1 تغييرات في المواضع المحددة 1، 2، 3، و 4، ويتضمن CRMSBS2 التغييرات في المواضع المحددة 1 و 3 و 4 و 5. يشير "CRM" إلى الوحدة التنظيمية cis-. تشير "SBS1 / 2" إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية للبنيتين 1 و 2. المنطقة المحددة بالإطار باللون الرمادي الفاتح عبارة عن متواليات لجين SERPINA1 والتي تم حذفها.

الشكل 6 عبارة عن رسم تخطيطي يوضح CRMSBS1، وبنيتين مشتقتين من CRMSBS1 مع عدم وجود إنترون نوع غير المعالج أو المطفر لمتوالية إنترون فأر wild-type or (MVM) mutated minute virus of mice (CRMSBS1 لا يوجد إنترون)، أو إنترون خيمييري مشذب (CRMSBS1) chimeric intron إنترون خيمييري T-Chimeric Intron T، كل بنية بما في ذلك جين معدل وراثيًا لعامل VIII BDD. يشير "CRM" إلى العنصر التنظيمي cis. تشير "SBS" إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية. يشير "hFVIII" إلى

- العامل البشري VIII-BDD. يشير "SP" إلى ببتيد إشارة signal peptide . يشير "ITR" إلى تكرار النهاية المعكوسة. تشير "SPA" إلى متوالية إضافة الاديثيل المتعدد التخليقية synthetic poly adenylation sequence . "Ins1" و "Ins3" كما هو موضح أعلاه في الشكل 2.
- الشكل 7 عبارة عن رسم تخطيطي يوضح CRMSBS2، وبنيتين مشتقتين من CRMSBS2 مع 5 عدم وجود إنترون النوع غير المعالج أو المطفر لمتوالية إنترون فأر wild-type or mutated (MVM) minute virus of mice (CRMSBS2 لا يوجد إنترون)، أو إنترون خيمياري مشذب (CRMSBS1 إنترون خيمياري-T)، كل بنية بما في ذلك جين معدل وراثيًا لعامل VIII BDD. يشير "CRM" إلى العنصر التنظيمي cis. تشير "SBS" إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية. يشير "hFVIII" إلى العامل البشري VIII-BDD. يشير "SP" إلى ببتيد إشارة. يشير "ITR" إلى تكرار النهاية المعكوسة. تشير "SPA" إلى متوالية إضافة الاديثيل المتعدد التخليقية. "Ins1" و "Ins3" كما هو موضح أعلاه في الشكل 2.
- الشكلين 8 و 8ب هما عبارة عن رسمان بيانان يظهران في إنتاج عامل VIII BDD البشري المفروز داخل الجسم الحي بعد إعطاء التركيبات المشار إليها إلى الفئران. تم نقل فئران C57BL/6 مع 10×6 +12 جينوم ناقل/كجم من بنيات hFVIII-BDD AAV2/6. يُظهر الشكل 8 مستويات HFVIII-BDD المفروزة في اليوم 7 بعد الإعطاء ويظهر الشكل 8ب مستويات HFVIII-BDD المفروزة خلال مدة الدراسة التي تستغرق 28 يومًا. يظهر المحور y الايسر لكل رسم بياني نانوجرام/ملييلتر ويظهر المحور y الأيمن النسبة المئوية الطبيعية حيث 1 وحدة = 100% طبيعي = 200 نانوجرام/ملييلتر. *** تشير إلى $p < 0.001$ ، و تشير * إلى $p < 0.05$. يمثل كل شكل فردي داخل المجموعات النتائج من حيوان واحد.
- يوضح الشكلان 9أ و 9ب التعبير الكبدي الخاص ب F8-BDD cDNA بعد إعطاء ناقلات جينية كما هو موضح في الشكل 7. ويوضح الشكل 9أ مستويات mRNA لعامل VIII-BDD (hFVIII) كما تم تحليله من الأنسجة المشار إليها (المخ، القلب، الكلى والرئة والكبد والطحال والخصيتين). كما هو موضح، تم اكتشاف hFVIII-BDD mRNA فقط في الكبد وليس أي أنسجة أخرى من بنية F8-BDD cDNA الاساسي (رموز مفتوحة) أو CRMSBS2 بدون إنترون (رموز مملوءة). يوضح الشكل 9ب التوزيع الحيوي لجينوم ناقل الجينات vector

genome (VG) من نفس الأنسجة الموضحة في الشكل 9. يقوم النمط المصلي AAV2/6 بتحويل الكبد بشكل أساسي.

- الشكل 10 عبارة عن مخططات توضح بنية CRMSBS2، وبنيات إضافية (تسمى CRMSBS2 SBR إنترونات 1 أو 2 أو 3). تتضمن جميع التركيبات جين معدل وراثيًا لعامل BDD VIII البشري. يشير "CRM" إلى العنصر التنظيمي cis. تشير "SBS" إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية. يشير "hFVIII" إلى العامل البشري VIII-BDD. يشير "SP" إلى بيتيد إشارة. يشير "ITR" إلى تكرار النهاية المعكوسة. تشير "SPA" إلى متواليات إضافية الاديثيل المتعدد المصنعة. يشير "MVM" إلى متواليات إنترون النوع غير المعالج أو المطفر لمتواليات إنترون فأر wild-type or mutated minute virus of mice (MVM).
- الشكل 11 عبارة عن مخطط يوضح الفيروس الدقيق من النوع غير المعالج من إنترون فأري ("WT MVM")، بما في ذلك المتواليات الجزئية (المتواليات رقم: 14) وموقع المتبرعين والمستقبلين. يشير "D1" و "D2" إلى المتبرعين 1 و 2 على التوالي. تشير "A1" و "A2" إلى المستقبلين 1 و 2 على التوالي. يشير "IES" إلى متواليات محسنة للإنترون. انظر أيضاً، Haut and Pintel (1998) J. Virology 72:1834-1843 and Haut and Pintel (1998) Virology J., 258:84-94.
- يوضح الشكل 12 (المتواليات رقم: 15) نظرة عامة على التغيرات التي أجريت على إنترون MVM من النوع غير المعالج في إنترون 1SBR المستخدم في البنات الموصوفة هنا. تم تحديد التغيرات بالإطار باللون الرمادي وتتضمن: طفرة طفيفة إلى مستقبل نقطة فرعية محتملة 1 potential branch point acceptor 1 (PBPA1)؛ مسار متعدد البيريميدين poly-pyrimidine tract لموقع مستقبل متحول جينياً 1، A1PPT (-)؛ موقع مستقبل متحول وراثياً 1، و A1 (-)؛ موقع مستقبل نقطة فرعية محتملة 2 مُحسّن، PBPA2 (+)؛ مسار موقع مُستقبل 2 متعدد البيريميدين ، A2PPT (+، 8T) بإضافة المزيد من ثيميدين thymidines (T)؛ موقع المُستقبل 2 محسن، A2 (+).

يوضح الشكل 13 (المتوالية رقم: 16) نظرة عامة على التغييرات التي أجريت على إنترون النوع غير المعالج أو المطفّر لمتوالية إنترون فأر wild-type or mutated minute virus of mice (MVM) من النوع غير المعالج في إنترون SBR 2 المستخدم في البنيات كما هو موصوف هنا. تم تحديد التغييرات بالإطار باللون الرمادي وتتضمن: طفرة صغرى لمستقبل نقطة فرعية محتملة 1 (PBPA1)؛ مسار متعدد البيريمدين لموقع مستقبل متحول جينياً 1، (A1PPT) 5 (-)؛ موقع مستقبل متحول وراثياً 1، A1 (-)؛ مسار متعدد البيريمدين لموقع مستقبل مقوى 2، A2PPT (+) ، 8T) عن طريق إضافة المزيد من ثيميدين (T)؛ موقع المستقبل 2 محسن، A2 (+).

يوضح الشكل 14 (المتوالية رقم: 17) نظرة عامة على التغييرات التي أجريت على إنترون MVM من النوع غير المعالج في إنترون SBR 3 المستخدم في البنيات كما هو موصوف هنا. تم تحديد التغييرات بالإطار باللون الرمادي وتتضمن: طفرة في متوالية المُحسِن الإِنترُونِي الغني بـ G، IES ko؛ طفرة صغرى لمستقبل نقطة فرعية محتملة 1 (PBPA1)؛ مسار متعدد البيريمدين لموقع مستقبل متحول وراثياً 1، (A1PPT) (-)؛ موقع مستقبل متحول وراثياً 1، A1 (-)؛ مسار متعدد البيريمدين لموقع مستقبل مُقَوَّى 2، A2PPT (+) ، 9T) عن طريق إضافة المزيد من ثيميدين (T)؛ موقع المستقبل 2 محسن، A2 (+). 15

الشكلان 15 أ و 15 ب يوضحان عامل VIII B البشري المفروز المحذوف منه المجال داخل الجسم الحي في الفئران بمتواليات الإنترون الجديدة. يحتوي الشكل 15 على رسوم بيانية توضح مستويات العامل البشري (hFVIII) VIII المفروز المحذوف منه المجال B من الفئران، الممثلة إما نانومتر/ ملليلتر (المحور y الأيسر) أو النسبة المئوية العادية (المحور y الأيمن)، وحدة واحدة = طبيعي 100% = 200 نانوجرام / ملليلتر. تم نقل 6/C57BL فئران مع 10×6 + 12 جينوم ناقل/ كجم من بنيات AAV2/6 hFVIII كما هو موضح على المحور x. يوضح الشكل 15 أ مستويات hFVIII المفرزة في اليوم السابع. يوضح الشكل 15 ب قمة مستويات hFVIII المفرزة على مدار فترة الدراسة التي تستغرق 28 يوماً. تشير الأرقام إلى متوسط المستويات الطبيعية للنسبة المئوية لـ hFVIII للمجموعة.

- يبين الشكلان 16 أ و 16 ب أن التعبير الجيني عن cDNA FVIII-BDD خاص بالكبد. الشكل 16 عبارة عن رسم بياني يبين قيم ترميز mRNA للعامل البشري VIII (hFVIII) التي تم تحليلها من الأنسجة (المخ، القلب، الكلى، الرئة، الكبد، الطحال، الخصيتين) في الدراسة الممثلة في الشكل 15. تم الكشف عن mRNA في hFVIII فقط في الكبد وليس في أي من الأنسجة الأخرى من
- 5 إما بنية cDNA F8 ل الأمي (رموز مفتوحة) أو إنترون CRMSBS2 SBR 3 (رموز مملوءة). يوضح الشكل 16 ب التوزيع الحيوي للجينوم الناقل vector genome (VG) من نفس الأنسجة التي تم تحليلها في الشكل 16 أ. يقوم النمط المصلي AAV2/6 أساساً بتحويل الكبد جينياً كما سبق نشره.
- يوضح الشكلان 17 أ و 17 ب المستويات فوق الفسيولوجية للعامل البشري النشط بالإنزيم VIII-BDD 10 في بلازما الفئران المصابة بسيولة الدم من نوع (أ). يحتوي الشكل 17 على رسوم بيانية توضح مستويات العامل البشري VIII (hFVIII) النشط إنزيمياً المفرز المحذوف المجال B من فئران R593C المصابة بسيولة الدم من نوع (أ)، ممثلة بالنسبة المئوية العادية، وحدة واحدة = 100% طبيعي. تم نقل فئران R593C المصابة بسيولة الدم من نوع (أ) مع ما يقرب من $10 \times 7 + 12$ جينوم ناقل/كجم من بنية hFVIII-BDD AAV2/6 كما هو مشار إليه على المحور x. يوضح الشكل 17 أ مستويات نشاط hfVIII المفرزة في اليوم الرابع. يوضح الشكل 15 ب مستويات نشاط hfVIII التي تم إفرازها في اليوم 42. تشير الأرقام إلى متوسط المستويات الطبيعية للنسبة المئوية لـ hFVIII في المجموعة.
- الشكل رقم 18 عبارة عن رسم بياني يوضح أوقات النزف في فئران R593C المصابة بسيولة الدم من نوع (أ) التي تمت معالجتها باستخدام الحمض النووي الحلقي للأنترون 3 لـ F8 20 CRMSBS2 SBR. تدل النتائج على انخفاض كبير في مقدار الوقت لتحقيق وقف النزف الدموي ($p > 0.0001$) في الفئران المصابة بسيولة الدم بعد قطع وريد الذيل.
- الشكل 19 عبارة عن شكل تخطيطي يوضح CRMSBS1، وبنيات نموذجية جديدة بدون إنترون MVM، أو إنترون خيميري، جنباً إلى جنب الجين المعدل وراثياً للعامل VIII-B المحذوف المجال و Ins1-Ins3. يشير "CRM" إلى العنصر التنظيمي cis. تشير "SBS" إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية. يشير "hFVIII" إلى العامل البشري VIII. يشير "SP" إلى بيتيد

إشارة. يشير "ITR" إلى تكرار النهاية المعكوسة. تشير "SPA" إلى متوالية إضافة الادينيل المتعدد المصنعة. و "Ins1" و "Ins3" كما هو موضح أعلاه في الشكل 2.

الشكل 20 عبارة عن رسم تخطيطي يوضح CRMSBS2، وبنيات توضيحية جديدة بدون إنترون MVM، أو إنترون خيميري، أو إنترون SBR 3 جنباً إلى جنب الجين المعدل وراثياً للعامل VIII- B المحذوف المجال و Ins1-Ins3. يشير "CRM" إلى العنصر التنظيمي cis. تشير "SBS"

إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية. يشير "hFVIII" إلى العامل البشري VIII. يشير "SP" إلى ببتيد إشارة. يشير "ITR" إلى تكرار النهاية المعكوسة. تشير "SPA" إلى متوالية إضافة الادينيل المتعدد المصنعة. و "Ins1" و "Ins3" كما هو موضح أعلاه في الشكل 2.

الشكل 21 عبارة عن رسم بياني يوضح تقييم مستويات ونشاطات hFVIII بواسطة التعبير الجيني عن AAV F8 cDNA خراج لجسم الحي في خلايا HepG2. تمت إضافة AAV2 / 6 F8 cDNA (إنترون 3 CRMSBS2 SBR) إلى خلايا HepG2 بجرعات $10 \times 4.8 + 06$ ،

$10 \times 2.4 + 06$ ، $10 \times 1.2 + 06$ ، و $10 \times 0.6 + 06$ من الجينومات الفيروسية لكل خلايا $10 \times 1 + 05$ في طبق ذو 24 عين (يشار إليه بالوقت الايام t0). تم تحليل المواد الطافية لمستويات hFVIII ELISA، (معظم العمدان اليسرى) والنشاط عن طريق فحص تجلط APTT (معظم

العمدان اليمنى) وفحص النشاط المولد للون (العمدان الوسطى) في سبعة أيام (t7) بعد إضافة فيروس AAV2\6. أظهرت النتائج وجود علاقة جيدة بين مستويات ونشاطات hFVIII المفردة (تم تسجيلها ك وحدة/ مل على المحور الأيسر، و النسبة المئوية الطبيعية على محور y الأيمن، 1

وحدة/ مليلتر = طبيعي 100%). البيانات الموضحة عبارة عن ستة مكررات بيولوجية (عدد = 6). تمثل أعمدة الخطأ الخطأ المعياري للمتوسط.

الشكل 22 عبارة عن رسم بياني يوضح نواتج الإنتاج المحسن في سياق سلسلة إنترون CRMSBS1 أو CRMSBS2. تم إنتاج الفيروس في خلايا HEK293، وكانت النواتج من مصنعي خلايا (2 CF). يشير "CRM" إلى العنصر التنظيمي cis. تشير "SBS" إلى مراجع سانجامو الرقمية الداخلية للعلوم الحيوية. يشير "hFVIII" إلى العامل البشري VIII. يشير "SP"

إلى ببتيد إشارة. يشير "ITR" إلى تكرار النهاية المعكوسة. تشير "SPA" إلى متوالية إضافة الادينيل المتعدد المصنعة. و تشير Ins1 و Ins3 إلى عازل 1، وعازل 3، على التوالي.

- الشكل 23 عبارة عن رسم بياني يوضح مستويات إنتاج hFVIII-BD في فئران من النوع غير المعالج باستخدام أنماط مصلية AAV متعددة كما هو موضح. تم حقن ذكور فئران C57BL / 6 ويريدياً بـ $10 \times 6 + 10$ جينوم ناقل/ فأر ($\sim 10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/ كجم) لبنيات AAV2/5 و AAV2/9، أو $10 \times 6 + 10$ جينوم ناقل/ فأر ($\sim 10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/ كجم) و $10 \times 1.8 + 11$ جينوم ناقل/ كجم ($\sim 10 \times 7 + 12$ جينوم ناقل/ كجم) للبنيات AAV2/6 و AAV2/8. 5
- ويوضح الشكل hFVIII-BDD فوق المستوى الفسيولوجي في البلازما من جميع العينات عدا بعض الجرعات المنخفضة من AAV2/6 و AAV2/5.
- يمثل الشكل 24 رسماً بيانياً يوضح التعبير النسبي للجين المعدل وراثياً لـ hFVIII-BDD في الفئران غير المعالجة عندما تم توصيل الجينات المعدلة وراثياً عبر AAV2/6 المنقى إما بإنتاج HEK293 (HEK) أو عن طريق إنتاج الفيروسات العنقوية في خلايا Sf9 (Sf9). إستُخدمت الجينات المعدلة وراثياً لـ F8 cDNA الامي (الشكل 4). تم إعطاء ذكور فئران C57BL/6 cDNA الامي لـ F8 الامية عن طريق الحقن الوريدي الوريدي الذيلي tail vein بجرعة $10 \times 1.8 + 11$ جينوم ناقل/فأر ما يقرب من $10 \times 7 + 12$ جينوم ناقل/ كجم) من cDNA الامي لـ F8 AAV2/6 الناتج من خلايا HEK293 أو Sf9/rBV فيروس عصوي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant baculovirus. حقق العلاج باستخدام F8 cDNA الامية من خلايا HEK293 متوسط قيمة قصوى تساوي 142.1 ± 8.3 SEM (العدد = 8) (تم قياس hFVIII ELISA) لمستويات البلازما البشرية الطبيعية من FVIII. تم تحقيق مستوى مماثل يساوي 132.8 ± 18.6 SEM (العدد = 5) (مُقاس بواسطة ELISA hFVIII) بعد إعطاء F8 cDNS الامي (Sf9 / rBV) إلى الفئران. 15
- يوضح الشكلان 25 و 25 ب مستوى التعبير الجيني في فئران متبرع جيني CDNA إنترون 3 SBR CRBSBS2 (Ins1-Ins3). الشكل 25 عبارة عن شكل تخطيطي للمتبرعين، وهو ما يظهر أيضاً في الشكل رقم 10. يوضح الشكل 25 ب كمية hFVIII-BDD القابلة للاكتشاف في البلازما، ويُعبر عن كل منها بنانوجرام/ مل ونسبة مئوية طبيعية (في البلازما البشرية الطبيعية). تم حقن ذكور فئران C57BL/6 عن طريق الوريد بجرعة $10 \times 1.8 + 11$ جينوم ناقل/ فأر ($\sim 10 \times 7 + 12$ جينوم ناقل/ كجم) من AAV2/6 CRMSBS2 SBR إنترون 3 cDNA (العدد = 25

8). تظهر النتائج المعروضة متوسط مستويات قمة hFVIII-BDD في البلازما لفئران C57BL / 6 المقاسة بواسطة ELISA hFVIII.

يوضح الشكلان 26 أ و 26 ب مخطط الجرعات لـ FVIII-BDD البشري في العديد من دراسات الرئيسيات غير البشرية (NHP) non-human primate ، بما في ذلك الدراسات مع إزالة كل مثبتات المناعة في اليوم 103. يوضح الشكل 26 نظرة عامة على جرعات ريتوكسان و سوليو-ميدرول. تم حقن ريتوكسان (Rituxan 10 مجم/كجم؛ بالحقن الوريدي) قبل إعطاء مادة الاختبار بينما تم حقن ميثيل بريدنيزولون (سولو-ميدرول) (methylprednisolone (Solu-Medrol) (10 مجم/كجم؛ بالحقن العضلي) بصورة يومية حتى اليوم 103. يوضح الشكل 26 ب مخططات الجرعات للتجارب مع ما قبل و إضافة المادة ما بعد الاختبار ويظهر أيضا توقيت جرعات ريتوكسان وسوليو-ميدرول. اتبعت المجموعات 1-5 نظام تثبيط مناعي لحقن مادة ما قبل الاختبار، بينما اتبعت المجموعات 6-8 نظام تثبيط مناعي لحقن مادة ما بعد الاختبار. كانت مدة هذه الدراسة 56 يومًا.

الشكل 27 عبارة عن رسم بياني يوضح العلاقة بين نشاط ومستويات hFVIII في NHPs المعالجة بـ hF8 cDNA / 6 AAV2. كانت قرود الرباح تُعطى تركيبة محلول ملحي أو 10×6 12+ جينوم ناقل/كجم من hF8 cDNA / 6 AAV2 (ناقلات رئيسية). ويبين الشكل 27 الحيوانات الفردية لمجموعة ضبط التركيبة (المجموعة 1 ، الحيوانات ارقام 1101-1102) ، ومجموعة الجرعة 10×6 12+ جينوم ناقل / كجم (المجموعة 3، الحيوانات ارقام 3101-3103). في اليوم الرابع عشر بعد إضافة مادة الاختبار، تم تحليل مستويات ونشاط hFVIII في الدورة الدموية عن طريق نشاط تجلط ELISA أو APTT. تنعكس مستويات طبيعية لـ FVIII في قرد الرباح بما يقارب ~ 1 وحدة/ملييلتر (~100% طبيعي) في بيانات نشاط التجلط لمجموعة ضبط التركيبة لأن اختبار نشاط التجلط غير مخصص لـ FVIII البشري. تعتبر ELISA خاص لـ FVIII البشري بالإضافة إلى FVIII من قرود الرباح، كما هو متوقع ليس هناك مستويات hFVIII كما تم قياسها بواسطة ELISA في مجموعة ضبط التركيبة. في مجموعة حيوانات رقم 3: كان هناك مستويات أعلى من الطبيعي ونشاط hFVIII في الدورة الدموية، حتى 8 وحدة / مل (800 % طبيعي).

الأشكال 28 أ و 28 ب عبارة عن رسوم بيانية تبين نمط إنزيم الكبد في NHP المعالج بـ AAV hF8 cDNA. تم إعطاء قرود الريباح تركيبة محلول متعادل أو $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل / كجم من AAV2 / 6 hF8 cDNA (ناقلات رئيسية). تظهر المظاهر الممثلة للأنزيمات الكبدية في الحيوانات لمجموعة ضبط التركيبة (المجموعة 1، الحيوان رقم 1101)، ومجموعة جرعة $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل / كجم (المجموعة 3، رقم الحيوان 3102) كمؤشر على حالة الكبد. أظهرت إنزيم الالانين امينو ترانسفيراز (ALT) alanine aminotransferase و إنزيم اسبرتات امينو ترانسفيراز (AST) aspartate aminotransferase. كانت القيم المرجعية العليا المقبولة لتظل في نطاق طبيعي لقرود الريباح لإنزيم ALT هي 126 وحدة / لتر و 120 وحدة / لتر لإنزيم AST. تمت زيادة مستويات إنزيمات ALT/AST في كل من مجموعة ضبط التركيبة و مجموعة جرعة $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل / كجم من AAV hF8 cDNA (ناقلات رئيسية) بعد خزعة الكبد (كانت خزعة الكبد في اليوم 41)، والتي تشير إليها علامة النجمة. خلاف ذلك كان AAV hF8 cDNA جيد التحمل على مدار الدراسة (247 يوماً).

الأشكال من 29 أ إلى 29 د عبارة عن رسوم بيانية توضح ملخصاً لمستويات FVIII البشري في البلازما لدراسة NHP باستخدام المتبرعين بـ AAV التي تحمل بروتينات العامل donors 15 VIII carrying Factor (F8) المحذوف المجال B (FVIII-BDD). يوضح الشكل 29 أ نتائج حيوانات المجموعة 2 (AAV2 / 6، $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل / كجم) يوضح الشكل 29 ب نتائج حيوانات المجموعة 3 (AAV2/6، $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل / كجم)؛ يوضح الشكل 29 ج نتائج حيوانات المجموعة 4 (AAV2 / 8، $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل / كجم)؛ ويبين الشكل 29 د نتائج حيوانات المجموعة 5 (AAV2 / 8، $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل / كجم). يعتبر 1 وحدة / مليلتر من العامل VIII البشري طبيعي فسيولوجياً، وبالتالي يساوي 100% من عامل VIII البشري الطبيعي فسيولوجياً في الدورة الدموية.

الشكل 30 عبارة عن رسم بياني يوضح مستويات مولد ضد FVIII البشري العظمى فوق الدراسة التالية للعلاج في الرئيسيات غير البشرية (NHP) non-human primates مع البنات المشار إليها (في ناقلات AAV6 أو AAV8). عند مستويات جرعة $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل / مليلتر (عدد = 3)، تم تحقيق قيم عظمى من 111.0%، 493.9% و 840.0% (المتوسط الكلي

481.6 % كما تم قياسه باستخدام (ELISA hfVIII) من مستويات hfVIII الطبيعي في البلازما في البشر. وبجرعة أعلى تمثل $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3)، تم تحقيق قيم عظمى من 450.0 %، 625.6 % و 886.7 % [المتوسط العام يساوي 654.1 %] من مستويات hfVIII في البلازما. كانت قيمة المتوسط العام لـ AAV8 تساوي 147.1 %.

- 5 الأشكال من 31 إلى 31 ج عبارة عن رسوم بيانية توضح النتائج من قرود رباح فردية (عدد = 3؛ حيوانات ارقام 2101 ، 2102 و 2103) التي اعطيت جرعة منخفضة ($2E + 12$ جينوم ناقل/كجم، المجموعة 2) من AAV2/6-FVIII-BDD cDNA على مدى فترة 168 يوما بعد الجرعات. في جميع الرسوم البيانية الثلاثة، تظهر تركيزات FVIII-BDD في البلازما، كما تم قياسها باستخدام ELISA، بالإطار باللون الأسود. بالإضافة إلى ذلك، يتم عرض تركيزات الأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII (الموضحة بوحدات بئيسدا) في البلازما بالإطار باللون الرمادي. يمثل الخط الأفقي المنقط نقطة القطع في وحدة بئيسدا، والتي لا تعتبر القيم الأقل منها موجبة للأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII. تم إيقاف سوليو- ميدرول في اليوم 103 كما هو موضح في الخط المتقطع العمودي. يعرض كل رسم بياني نتائج قرد واحد: يعرض الشكل 31 الحيوان رقم 2101؛ يوضح الشكل 31 ب الحيوان رقم 2102 ؛ ويعرض الشكل 31 ج الحيوان رقم 2103.

- الأشكال من 32 إلى 32 ج عبارة عن رسوم بيانية توضح النتائج من قردة الرباح الفردية (العدد = 3 ، والحيوانات ارقام 3101 ، 3102 و 3103) التي تم اعطائها جرعة عالية ($10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم، المجموعة 3) من AAV2/6-FVIII-BDD cDNA خلال فترة زمنية من 168 يوماً بعد الجرعات. في جميع الرسوم البيانية الثلاثة، تظهر تركيزات FVIII-BDD في البلازما، كما تم قياسها باستخدام ELISA، بالإطار باللون الأسود. بالإضافة إلى ذلك، يتم عرض تركيزات الأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII (الموضح بوحدات بئيسدا) في البلازما باللون الرمادي. يمثل الخط الأفقي المنقط نقطة القطع في وحدة بئيسدا، والتي لا تعتبر القيم الأقل منها موجبة للأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII. تم إيقاف سوليو- ميدرول في اليوم 103 - المشار إليه بخط متقطع رأسي. يعرض كل رسم بياني نتائج قرد منفرد: يُظهر الشكل 32 أ الحيوان رقم 3101 ؛ الشكل 32 ب الحيوان رقم 3102 ؛ ويوضح الشكل 32 ج الحيوان رقم 3103.

- الأشكال من 33 إلى 33 عبارة عن رسوم بيانية توضح النتائج من قروود الرياح الفردية (عدد = 3، الحيوانات ارقام 4101، 4102، و 4103) بجرعة عالية (6×10 + 12 جينوم ناقل/كجم، المجموعة 4) من AAV2/8-FVIII-BDD cDNA خلال فترة زمنية 168 يوم بعد الجرعات. في الرسوم البيانية 33-33ج، تظهر تركيزات FVIII-BDD في البلازما، كما تم قياسها من خلال ELISA، بالإطار باللون الأسود. بالإضافة إلى ذلك، يتم عرض تركيزات الأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII (كما هو موضح في وحدات بئيسدا) في البلازما بالإطار باللون الرمادي. الشكل 33 عبارة عن "نسخة مكبرة" للقيم الأدنى في الرسم البياني للحيوان رقم 4103 (لاحظ أن المحور y في الأشكال 33 - 33ج ينتقل من صفر - 5 وحدة / مليلتر لمولد ضد FVIII بينما يظهر الشكل 33 من 0-1 وحدة / مليلتر من مولد ضد FVIII). يمثل الخط الأفقي المنقط نقطة القطع في وحدة بئيسدا، والتي لا تعتبر القيم الأقل منها موجبة للأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII. تم إيقاف سوليو - ميدرول في اليوم 103 - والمشار إليه بخط متقطع رأسي. يعرض كل رسم بياني النتائج لكل فرد بمفرده: يُظهر الشكل 33 حيوان 4101؛ يعرض الشكل 33ب الحيوان رقم 4102؛ تظهر الأشكال 33ج و 33د الحيوان رقم 4103.
- الأشكال من 34 إلى 34ه عبارة عن رسوم بيانية توضح النتائج من قردة الرياح الفردية (عدد = 3) التي أعطيت الجرعة العالية (6×10 + 12 جينوم ناقل/كجم، مجموعة 5) من AAV2/8-FVIII-BDD cDNA خلال فترة زمنية قدرها 168 يوما بعد الجرعات. في الأشكال 34-34ج، تظهر تركيزات FVIII-BDD في البلازما، كما تم قياسها باستخدام ELISA، بالإطار باللون الأسود. بالإضافة إلى ذلك، يتم عرض تركيزات الأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII (كما هو موضح بوحدات بئيسدا) في البلازما بالإطار باللون الرمادي. الأشكال 34د و 34ه عبارة عن "تكبير" للقيم الأدنى في الرسم البياني (لاحظ أن المحور y في 34أ - 34ج ينتقل من صفر - 5 وحدة / مليلتر لمولد ضد FVIII بينما يتحول المحور في 34د و 34ه من 0-1 وحدة / مليلتر من مولد ضد FVIII). يمثل الخط الأفقي المنقط نقطة القطع في وحدة بئيسدا، والتي لا تعتبر القيم الأقل منها موجبة للأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII. تم إيقاف سوليو - ميدرول في اليوم 103- والمشار إليه بخط متقطع رأسي. يظهر كل رسم بياني نتائج لقرود واحد (الحيوان رقم 5101: الشكل 34أ، حيوان رقم 5102: الشكل 34ب و حيوان رقم 5103: الشكل 34ج).

- الأشكال 35 و 35 عبارة عن رسوم بيانية توضح التحدي مع بيولوجيا hFVIII علاجية في الحيوانات التي تعبر عن hFVIII المعدل وراثياً. تم تحدي قرود الرباح من المجموعات 1 و 3 و 4 و 5 (ارقام تعريف الحيوانات: 1101، 3101، 3103، 4103، 5101، و 5102) مع hFVIII البيولوجية Xyntha®، التي تتكون من أربع جرعات وريدية أسبوعية بجرعة 25 وحدة/كجم من Xyntha®، المشار إليها في الأشكال 35 إلى 35 وكمثلث مقلوب. تزامنت تحديات Xyntha® مع الأيام 198، 205، 212، و 219 (بعد إضافة اختبار AAV hF8 cDNA في اليوم الصفري). نظراً لنصف العمر القصير لـ hFVIII وتجميع البلازما الأسبوعية، لم يكن هناك زيادة في مستويات hFVIII من hFVIII الحيوي Xyntha®. ومع ذلك، كان هناك زيادة في الأجسام المضادة المثبطة بعد التحدي بـ Xyntha® (تم قياسه بواسطة وحدات بئيسدا، BU) في مجموعة ضبط الصياغة 1 (انظر الحيوان رقم 1101 الذي لم يُعطى AAV hF8 cDNA، الشكل 35). كما هو موضح في الشكل 35، وصلت قيمة BU إلى ما يقرب من 0.9 وحدة بئيسدا بعد تحدي Xyntha®، المشار إليه بالمنطقة الرمادية في الرسم البياني. احتوي الحيوان رقم 3103 على مستويات مرتفعة من BU، حتى 3 وحدة بئيسدية / مليلتر لأسابيع عديدة، ولم يُحث التحدي البيولوجي الإضافي بـ hFVIII (المشار إليه بواسطة الخطوط الرأسية المتقطعة) أجساماً مضادة إضافية قابلة للكشف (BU) (الشكل 35 ب). لا توجد زيادة في الأجسام المضادة المثبطة BU في جميع المجموعات التي استقبلت AAV hF8 cDNA، وحافظت على مستويات hFVIII ثابتة (الأشكال 35 ج إلى 35 و، المشار إليها بواسطة الأسهم الرمادية). يوضح الشكل 35 ج أن مستويات hFVIII للحيوان رقم 3101 كانت دائمة لمدة 19 أسبوعاً عند ~150% من hFVIII الطبيعي، بينما يوضح الشكل 35 د أن مستويات hFVIII في الحيوان رقم 4103 كانت دائمة لمدة 19 أسبوعاً عند ~10% من hFVIII الطبيعي. يوضح الشكل 35 هـ أن مستويات hFVIII في الحيوان رقم 5101 كانت دائمة لمدة 19 أسبوعاً عند ~15% من hFVIII الطبيعي، بينما في الشكل 35 و، كانت مستويات hFVIII للحيوان رقم 5102 دائمة لمدة 19 أسبوعاً عند ~35% من hFVIII الطبيعي. يمثل الخط الأفقي المنقط نقطة القطع في وحدة بئيسدا، والتي لا تعتبر القيم الأقل منها إيجابية للأجسام المضادة المعادلة لـ FVIII. يمثل الخط المنقط العمودي إزالة سوليو- ميدرول في اليوم 103 بعد إعطاء مادة الاختبار في الأشكال 35 ب و 35 هـ و 35 و.

- يوضح الشكلان 36 و 36B التعبير الجيني لـ hVIII-BDD خارج الجسم الحي من موقع الألبومين الداخلي في خلايا HepG2. الشكل 36 عبارة عن رسماً بيانياً يظهر hFVIII-BDD المكتشف في المادة الطافية الخلوية لخلايا HepG2 بمرور الوقت (وقت = أيام) بعد إعطاء ZFNs المستهدفة للالبيومين (SBS #47171/47898 و AAV2/6-ZFN) و hFVIII-BDD 5
- HepG2 BDD cDNA AAV2/6-FVIII-BDD بدون إنترون) إلى خلايا HepG2 AAV2/6-FVIII-BDD التي تم إعطائها بجرعة $10 \times 3.0 + 0.4$ ، $10 \times 6.0 + 0.4$ ، $10 \times 1.2 + 0.4$ بالإضافة إلى AAV2/6-ZFN بجرعة $10 \times 3.0 + 0.5$. الشكل 36 ب هو رسم بياني يظهر hFVIII cDNA بمفرده (بدون ZFN). البيانات المعروضة هي من عدد = 3 مكررات بيولوجية. تمثل اعمدة الخطأ المعياري لمتوسط نسخ الخط المنقوط هو حد الكشف باستخدام ELISA hFVIII 10
- يمثل الشكل 37 رسماً بيانياً يُظهر الكشف المعلمي للتكامل المستهدف بواسطة جين hFVIII-BDD الناقل في موقع الألبومين الداخلي. تم الكشف عن التكامل المستهدف عن طريق PCR الكمي الذي يشتمل على موقع إدراج الالبيومين. تم وقوع النقطة 5، من بادئ PCR داخل موقع الألبومين البشري الداخلي، ويقع مجس PCR داخل ITR من مجموعة hFVIII-BDD و تقع 3' من البادئ داخل جين hFVIII-BDD الناقل. يتم تطبيع الأرقام المعروضة إلى الجين الشغال GAPDH 15
- يمثل الشكل 38 رسماً بيانياً يوضح مستويات مولد ضد FVIII بشري بعد العلاج في الرئيسيات غير البشرية (NHP) وفقاً للجدول الموضح في الشكل 26 ب. اتبعت المجموعات 1-5 نظام تثبيط مناعي (IS) لحقن مادة ما قبل الاختبار. عند مستويات جرعة $10 \times 6 + 11$ جينوم ناقل/كجم (العدد = 3، المجموعة 3)، تم تحقيق المتوسط العام للقيم العظمى بنسبة 5.7% (تم قياسه عن طريق ELISA hFVIII) في مستويات hFVIII الطبيعية في البلازما في البشر. كما تم التحقيق مع جرعة أعلى تمثل $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/كجم (العدد = 3، المجموعة 4)، كان المتوسط العام للقيم العظمى 56.4% وعند جرعة $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم (العدد = 3، المجموعة 5) كان المتوسط العام للقيم العظمى 229.0% (تم قياسه بواسطة ELISA HFVIII) من مستويات hFVIII في البلازما. تم تظليل المجموعة 7 و 8 باللون الرمادي التي اتبعت نظام

التشيط المناعي ما بعد الاختبار. عند مستوى الجرعة $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3، المجموعة 7) كان المتوسط العام للقيم العظمى 87.9%، بينما كان 101.7% بالنسبة لجرعة $12 + 6E$ جينوم ناقل/كجم (عدد=3، المجموعة 8). وكانت المجموعتان 1 و 6 عبارة عن مجموعات ضبط الصيغة، يشار إليها بوصفها صيغة.

5 الشكل 39 عبارة عن رسم بياني يوضح النتائج بعد إعادة إعطاء المواد محل الدراسة في المجموعة $10 \times 2 + 11$ جينوم ناقل/كجم التي تظهر في الشكل 38 باستخدام نفس نتائج النمط المصلي في مستويات مولدات ضد FVIII بشرية. المجموعة 2، التي تمثل الجرعة الأصلية $10 \times 2 + 11$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3)، فقد تم إعادة تجريعها بجرعة $10 \times 9 + 11$ جينوم ناقل/كجم (العدد = 3) في اليوم 56 من الدراسة (الشكل 26 ب). يتم عرض مستويات مولد ضد FVIII البشري في الدورة الدموية بعد إعادة التجريع بسبعة أيام، مع الإشارة لدائرة نصف مفتوحة (يوم 7 من الجرعة الجديدة $10 \times 9 + 11$ جينوم ناقل/كجم). جميع البيانات المتبقية هي نفسها ما تم تقديمه في الشكل 38 (المستويات العظمى اعتبارًا من اليوم 56 من الدراسة).

الأشكال 40 أ و 40 ب عبارة عن رسوم بيانية تُظهر الإنتاج والكشف عن hVIII خارج الجسم الحي من موضع الألبومين الداخلي. يُظهر الشكل 40 أ إجمالي مستويات hFVIII المكتشفة في المادة الطافية الخلوية HepG2 بعد إعطاء ZFNs المستهدفة للألبومين (albumin SBS) (#42906/43043) والحمض النووي الحلقي لhFVIII (إنترون 3 SBR CRMSBS2) إلى خلايا HepG2 (تم فحصها في اليوم 19). في هذا المثال، تم استخدام hFVIII cDNA في جرعات متزايدة من $10 \times 3.0 + 0.4$ ، و $10 \times 6.0 + 0.4$ ، و $10 \times 1.2 + 0.5$ ، بالإضافة إلى ZFN بجرعة $10 \times 3.0 + 0.5$. وكما هو مبين لhFVIII cDNA مع GFP (بدون ZFN) للسيطرة على مجموع الفيروسات المضافة إلى الخلايا، و hFVIII cDNA وحده (بدون ZFN)، ووجد ان كلا الأخيرين يدل على عدم القدرة او الكشف عن كمية قليلة من hFVIII المفرز. ويعود ذلك إلى تحلل hFVIII الملحق بالصبوغ قبل بناء كميات كافية من hFVIII المفرزة القابلة للكشف. البيانات المعروضة عبارة عن (العدد = 2) مكررات بيولوجية. تمثل أعمدة الخطأ عن الخطأ المعياري لمتوسط النسخ التقنية والبيولوجية. خط منقط عبارة عن حد hFVIII ELISA. يوضح الشكل 40 ب مستويات التكامل المستهدف للألبومين - hFVIII بواسطة NHEJ باستخدام PCR الكمي.

يقع 5' البادئ داخل موقع الألبومين البشري الداخلي، ويقع المجس داخل ITR من مجموعة hFVIII و 3' البادئ داخل hFVIII.

الوصف التفصيلي:

- 5 يُقدم الاختراع الحالي مجموعات التعبير الوراثي للتعبير الوراثي عن ناقل، وبشكل خاص في خلايا الكبد. يُمكن استخدام البنيات لتوصيل أي جين (جينات) معدلة وراثيًا لخلايا الكبد، في جسم الكائن الحي وفي المعمل ويُمكن استخدامه لعلاج و/أو الوقاية من أي مرض أو اضطراب حيث يُمكن تعديله بواسطة توفير واحدة أو أكثر من الجينات المعدلة وراثيًا. بشكل مختلف عن البنيات المستهدفة الكبدية المستخدمة في الوقت الحالي، تتضمن البنيات الموصوفة هنا في هذا الاختراع مُحسن مُعدل و/ أو متواليات إنترونية و، بالإضافة إلى ذلك، التعبير عن جين معدل وراثيًا
- 10 بمستويات مرتفعة جتى دون استخدام إنترون MVM. تكون هذه البنيات صغيرة جدًا، مما يسمح باستخدام ناجح مع الجينات المعدلة وراثيًا التي تم توصيلها بواسطة أنظمة ناقلة صغيرة مثل الفيروسات المرتبطة بالغدية Adeno-associated virus (AAV).
- 15 يُمكن استخدام البنيات الموصوفة هنا في هذا الاختراع للتعبير عن hFVIII BDD في كبد الرئيسيات غير الإنسان. اعتمادًا على الجرعة الأولية لمجموعة التعبير الوراثي AAV hF8 cDNA، وصلت مستويات hFVIII في البلازما إلى 800% من نسبة hFVIII في البلازما الطبيعية. باتباع هذه الجرعات المرتفعة الأولية، تم وضع عدة حيوانات للتعبير الوراثي 10 - 150% من المستويات الطبيعية لأعلى من ثمانية أسابيع. بالإضافة إلى ذلك، لا تزداد استجابة الجسم المضاد مضاد hFVIII في بعض الحيوانات عند التجربة ببروتين hFVIII المحقون (Xyntha®)، مقترحًا تطور مقاومة لبروتين hFVIII في هذ الحيوانات خلال فترة التجربة.
- 20 بشكل عام

تستخدم ممارسة الطرق، والتحضير واستخدام التركيبات الموصوفة هنا، ما لم يُشار إلى خلاف ذلك، التقنيات التقليدية في البيولوجيا الجزيئية، الكيمياء الحيوية، تحليل وتركيب الكروماتين chromatin، كيمياء حاسوبية، إستزراع خلوي، DNA ناتج عن عودة الارتباط الجيني والمجالات المتعلقة كما في داخل مهارة المجال. تم شرح هذه التقنيات بالكامل في المراجع. أنظر، على سبيل

المثال، Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. METHODS IN و Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999. 5 10

التعريفات

يتم استخدام المصطلح "حمض نووي"، "عديد النيوكليوتيد nucleic acid"، و"قليل النيوكليوتيد polynucleotide" بالتبادل ويشير لبوليمر ديوكسي ريبو نيوكليوتيد deoxyribonucleotide أو ريبونيوكلوتيد ribonucleotide، تشكيل خطي أو دائري، وعلى شكل شريط مفرد أو مزدوج. 15 لأغراض الوصف الحالي، ليس المقصود من هذه المصطلحات التقييد بطول البوليمر. يُمكن أن يشمل المصطلح نظائر معروفة لعديد النيوكليوتيدات الطبيعية، والنيوكليوتيدات التي يتم تعديلها في شق القاعدة، السكر و/أو الفوسفات على سبيل المثال سلسلة الفوسفوروثيوات phosphorothioate backbones . وبشكل عام، يكون نظير النيوكليوتيد الخاص لديه نفس خصوصية زوج القاعدة؛ للتوضيح، سيكون نظير A هو زوج القاعدة مع T. 20

يتم استخدام المصطلحات "عديد الببتيد polypeptide"، "ببتيد" و"بروتين" بالتبادل للإشارة إلى بوليمر الوحدات البنائية للحمض الأميني. يتم تطبيق المصطلح على بوليمرات الحمض الأميني التي فيها تكون واحدة أو أكثر من الأحماض الأمينية عبارة عن نظير كيميائي أو مشتق مُعدل للأحماض الأمينية الموجودة بشكل طبيعي المقابلة.

- يشير المصطلح "عودة الارتباط الجيني" إلى عملية تبادل المعلومات الجينية بين عديدي نيوكليوتيد، يتضمن على سبيل المثال لا الحصر، الاحتجاز بواسطة ارتباط الطرف غير المتجانس non-homologous end joining (NHEJ) وعودة الارتباط الجيني النظير. لأغراض هذا الوصف، يشير "عودة الارتباط الجيني المتجانس (HR) homologous recombination" إلى الصيغة الخاصة لهذا التبادل الذي يحدث، على سبيل المثال، أثناء إصلاح إنحلال الشريط لمزدوج في الخلايا بواسطة آليات إصلاح موجه التناظر.
- 5
- في طرق معينة لهذا الكشف، تقوم واحدة أو أكثر من إنزيمات النيوكلياز المستهدفة كما هو مذكور هنا في هذا الاختراع بتخليق كسور الشريط المزدوج للحمض النووي double-stranded break (DSB) في المتواليات المستهدفة على سبيل المثال، كروماتين خلوي cellular chromatin في موقع تم تحديده مسبقاً على سبيل المثال، جين الألبومين albumin gene.
- 10
- يتوسط DSB تكامل بنية كما هي مذكورة هنا في هذا الاختراع. إختيارياً، تكون البنية مماثلة لمتواليات النيوكليوتيد في منطقة الكسر. يُمكن تكامل بنية التعبير الوراثي جسدياً أو، بدلاً من ذلك، يتم استخدام مجموعة التعبير كقالب لإصلاح الكسر عن طريق عودة الارتباط الجيني المماثل، مما ينتج عنه إدخال كل أو جزء من متواليات النيوكليوتيد كما في مجموعة التعبير الوراثي في كروماتين الخلية. ومن ثم، يُمكن تعديل المتواليات الأولى في الكروماتين الخلوي و، في تجسيديات معينة، يُمكن تحويلها في متواليات موجودة في مجموعة التعبير. ومن ثم، يُمكن فهم استخدام المصطلحات "يستبدل" أو استبدال" على أنه يُمثل استبدال لمتواليات نيوكليوتيد واحدة بأخرى، (للتوضيح، استبدال متواليات في اتجاه النسخ المعلوماتي)، ولا يتطلب بالضرورة استبدال فيزيائي أو كيميائي لعدد نيوكليوتيد polynucleotide بالآخر.
- 15
- 20
- في أي من الطرق الموصوفة هنا في هذا الاختراع، يُمكن أن تحتوي متواليات النيوكليوتيد الخارجية ("بنية التعبير" أو "مجموعة التعبير" أو "ناقل") على متواليات متماثلة، ولكن ليست متطابقة، لمتواليات الجينوم في المنطقة محل الإهتمام، ومن ثم تحفيز عودة الارتباط الجيني المتماثل لإدخال متواليات غير متطابقة في المنطقة محل الإهتمام. ومن ثم، في تجسيديات معينة، تُظهر أجزاء مجموعة التعبير الوراثي التي تكون مماثلة للمتواليات في المنطقة محل الإهتمام نسبة تطابق المتواليات ما بين حوالي 80 إلى 99% (أو أي تكامل بينهم) للمتواليات الجينومية التي تم استبدالها.
- 25

في تجسيدات أخرى، تكون نسبة التماثل بين مجموعة التعبير والمتواليات الجينومية أعلى من 99%، على سبيل المثال لو اختلفت نيوكليوتيدة واحدة كما بين المناطق المتماثلة لمجموعة التعبير الوراثي والمتواليات الجينومية لأكثر من 100 زوج قاعدة متجاورة. في حالات معينة، يُمكن أن يحتوي جزء غير متماثل من مجموعة التعبير الوراثي على متواليات غير موجودة في المنطقة محل الإهتمام، 5 بحيث يتم إدخال المتواليات الجديدة في المنطقة محل الإهتمام. في هذه الحالات، تكون المتواليات غير المتماثلة مُحاطة بشكل عام بمتواليات من 50 - 1000 زوج من القواعد (أو أي قيمة صحيحة بينهم) أو رقم من أزواج القواعد أعلى من 1000، التي تكون مماثلة أو مطابقة للمتواليات في المنطقة محل الإهتمام.

يشير المصطلح "متوالية" إلى متوالية نيوكليوتيد بأي طول، يُمكن أن تكون الحمض النووي؛ كما 10 يُمكن أن تكون خطية، دائرية أو متفرعة ويمكن أن تكون عبارة عن شريط مفرد أو شريط مزدوج. يشير المصطلح "جين معدل وراثيًا" إلى متوالية نيوكليوتيد التي يتم إدخالها في الجينوم. يُمكن أن يكون الناقل بأي طول، على سبيل المثال ما بين 2 و 1000000000 نيوكليوتيدة في الطول (أو أي قيمة صحيحة ما بينهم أو أعلى منهم)، ويُفضل ما بين حوالي 100 و 100000 نيوكليوتيدة في الطول (أو أي عدد صحيح بينهم)، ومن المفضل أكثر ما بين حوالي 2000 و 20000 نيوكليوتيدة في الطول (أو أي قيمة بينهم). 15

يعتبر المصطلح "كروموسوم"، هو معقد كروماتين يشمل كل أو جزء من الجينوم الخاص بخلية. غالبًا يتم توصيف الجينوم الخاص بخلية بالنمط النووي، وهو عبارة عن تجميع كل الكروموسومات التي تشمل جينوم الخلية. يُمكن أن يشمل الجينوم الخاص بخلية واحدة أو أكثر من الكروموسومات. 20

يُعتبر المصطلح "يصبوغ" عن حمض نووي متكرر، معقد بروتين نووي أو تركيب آخر يشمل حمض نووي لا يُشكل جزء من النمط النووي الكروموسومي الخاص بخلية. تتضمن الأمثلة على 25 اليبصوغات البلازميدات وجينومات فيروسية معينة. يُمكن الاحتفاظ بالبنيات الخاصة بالكبد التي تم وصفها هنا في هذا الاختراع يصبوغيًا أو، بدلاً من ذلك، يُمكن أن يكون متكامل بشكل ثابت في الخلية.

- جزئ "خارجي" عبارة عن جزئ غير موجود بشكل طبيعي في خلية، لكن يُمكن إدخاله في خلية بواسطة واحدة أو أكثر من الطرق الجينية، الكيمياء الحيوية أو الطرق الأخرى. يتم تحديد الوجود الطبيعي في الخلية" بالنسبة لمرحلة التطوير الخاصة والظروف البيئية للخلية. ومن ثم، على سبيل المثال، يكون جزئ موجود فقط أثناء التطور الجنيني للعضلات هو جزئ خارجي بالنسبة لخلية العضلات البالغة. بالمثل، يكون جزئ مستحث بالصدمة الحرارية هو جزئ خارجي بالنسبة للخلية غير المصدومة بالحرارة. يُمكن أن يشمل جزئ خارجي، على سبيل المثال، إصدار وظيفي لجزئ داخلي مختل الوظيفة أو إصدار مختل الوظيفة لجزئ داخلي ذو وظيفة طبيعية.
- 5
- يُمكن أن يكون جزئ خارجي، من بين أمور أخرى، جزئ صغير، مثل الذي يتم توليده بواسطة عملية الكيمياء الاندماجية، أو جزئ ضخم مثل بروتين، حمض نووي، كربوهيدرات، دهون، بروتين نشوي، بروتين دهني، عديد السكاريد، أي مشتق مُعدل من الجزيئات المذكورة أعلاه، أو أي معقد يشمل واحدة أو أكثر من الجزيئات المذكورة أعلاه. تتضمن الأحماض النووية DNA و RNA، يُمكن أن تكون مفردة أو مزدوجة الشريط؛ خطية، متفرعة أو حلقة؛ ويمكن أن تكون بأي طول. تتضمن الأحماض النووية تلك التي تكون قادرة على تكوين أمينية مزدوجة، وثلاثية. أظنر، على سبيل المثال، براءات الاختراع الأمريكية أرقام 5,176,996 و 5,422,251.
- 10
- تتضمن البروتينات، على سبيل المثال لا الحصر، بروتينات إرتباط الحمض النووي، عوامل النسخ، عوامل إعادة تشكيل الكروماتين، بروتينات ارتباط الحمض النووي methylated، إنزيمات البوليمراز polymerases، الميثيلازات methylases، نازع الميثيل demethylases، أسيتيلازات acetylases، نازع الأسيتيل deacetylases، فوسفاتازات phosphatases، لاجينات ligases، ديوبيكويتينازات deubiquitinases، إنتجرازات integrases، إنزيمات عودة الارتباط الجيني recombinases، ليجيزات ligases، توبوأيزوميرازات topoisomerases، جيرازات gyrases وهيليكازات helicases.
- 15
- يُمكن أن يكون جزئ خارجي المنشأ عبارة عن نفس نوع الجزئ كجزئ داخلي، على سبيل المثال بروتين خارجي أو حمض نووي. على سبيل المثال، يُمكن أن يشمل جزئ نووي خارجي المنشأ جينوم فيروسي مُعدي، بلازميد أو يصبوغ تم إدخاله في خلية، أو كروموسوم غير موجد بشكل طبيعي في الخلية. تُعد طرق إدخال الجزيئات خارج الخلية في الخلايا معروفة للأشخاص
- 20
- 25

- الماهريين في المجال وتتضمن، على سبيل المثال لا الحصر، نقل يحدث بواسطة الدهون أي، الجسم الحال، بما في ذلك الدهون المتعادلة والكاتيونية cationic lipids ، التوصيل الكهربائي electroporation ، الحقن المباشر، اندماج الخلية، قذف بالجسيمات، الترسيب المشترك للكالسيوم فوسفات، نقل يتوسطه DEAE-دكستران dextran ونقل يتوسطه ناقل فيروسي viral vector-mediated transfer 5 . يُمكن أن يكون جزئ خارجي من نفس نوع الجزئ كجزئ داخلي لكن مشتق من أنواع مختلفة عن التي تم اشتقاق الخلية منها. على سبيل المثال، يُمكن إدخال متواليات حمض أميني بشري في سلالة خلية مشتقة في الأساس من فأر أو هامستر. تُعد طرق إدخال الجزيئات الخارجية في الخلايا النباتية معروفة للشخص الماهر في المجال وتتضمن، على سبيل المثال لا الحصر، تحول الخلية البدائية، كاربيد السيليكون silicon carbide (على سبيل المثال، WHISKERS™)، تحول يتوسطه Agrobacterium، نقل يحدث بواسطة الدهون 10 أي، جسم حال liposomes ، تتضمن دهون متعادلة وكاتيونية ، التوصيل الكهربائي، الحقن المباشر، اندماج الخلية، قذف بالجسيمات على سبيل المثال، باستخدام "بندقية الجين، ترسيب مشترك للكالسيوم فوسفات، نقل يتوسطه DEAE-دكستران ونقل يتوسطه ناقل فيروسي.
- على النقيض، يُعد جزئ "ذاتي المنشأ" هو الجزئ الموجود طبيعيًا في خلية خاصة في مرحلة تطور خاصة تحت ظروف بيئية خاصة. على سبيل المثال، يُمكن أن يشمل الحمض النووي ذاتي المنشأ اليصبوغي، جينوم الحبيبات الخيطية، كلوروبلاست أو العضيات الأخرى، أو حمض نووي يصبو غير موجود طبيعيًا. يُمكن أن تتضمن الجزيئات ذاتية المنشأ الإضافية بروتينات، على سبيل المثال، عوامل النسخ والإنزيمات. 15
- كما هو مُستخدم هنا في هذا الاختراع، يتضمن المصطلح "منتج حمض نووي خارجي المنشأ product of an exogenous nucleic acid " كل من منتجات عديد النيوكليوتيد وعديد البيبتيد، على سبيل المثال، منتجات النسخ عديد النيوكليوتيدات polynucleotides مثل RNA) ومنتجات الترجمة عديد البيبتيدات polypeptides. 20
- يكون "جزئ اندماج" عبارة عن جزئ الذي فيه يتم ربط إثنين أو أكثر من جزيئات الوحدة الفرعية، ويُفضل تساهميًا. يُمكن أن تكون جزيئات الوحدة الفرعية من نفس النوع الكيميائي للجزئ، أو يُمكن أن يكون عبارة عن أنواع كيميائية مختلفة للجزيئات. تتضمن الأمثلة على جزيئات الاندماج، على 25

سبيل المثال لا الحصر، بروتينات الاندماج (على سبيل المثال، اندماج بين مجال ربط بروتين الحمض النووي ومجال انشقاق)، اندماجات بين مجال ربط عديد نيوكليوتيد الحمض النووي (على سبيل المثال، sgRNA) المرتبط عمليًا بمجال إنشقاق، أحماض نووية اندماجية (على سبيل المثال، حمض نووي يُشفّر بروتين الاندماج .

5 يُمكن أن ينتج التعبير عن بروتين اندماج في خلية من توصيل بروتين الاندماج إلى الخلية أو عن طريق توصيل عديد نيوكليوتيد يُشفّر بروتين الاندماج لخلية، حيث يتم نسخ عديد النيوكليوتيد، ويتم ترجمة النسخة، لتوليد بروتين الاندماج. يُمكن تضمن التقطيع عبر الربط، انشقاق عديد البيبتيد وربط عديد البيبتيد أيضًا في التعبير الوراثي عن بروتين في خلية. يتم تقديم طرق لتوصيل عديد نيوكليوتيد وعديد بيبتيد للخلايا أيضًا في هذا الكشف.

10 يتضمن "جين" لأغراض الكشف الحالي، منطقة DNA تُشفّر منتج جيني (أنظر أدناه)، وكل مناطق DNA التي تُنظم انتاج منتج الجين، سواء ذلك أو دون أن تكون المتواليات المنظمة قريبة لمتواليات التشفير و/أو النسخ. وفقًا لذلك، يتضمن جين، على سبيل المثال لا الحصر، متواليات محفزة، المتوالية الانتهازية، متواليات منظمة للترجمة مثل مواقع ربط الريبوسوم ومواقع دخول الريبوسوم، مُحسنات، مُسببات الصمت الجيني، عوازل، عناصر ارتباط، أصول التكرار، مواقع ارتباط المطرس ومناطق التحكم في الموقع.

يشير "التعبير الجيني" لتحويل المعلومات، الموجودة في جين، في منتج جيني. يُمكن أن يكون منتج جيني عبارة عن منتج نسخ مباشر لجين (على سبيل المثال، mRNA، tRNA، rRNA، RNA ضد إتجاه النسخ، ريبوزوم، RNA تركيبية أو أي نوع آخر من RNA) أو بروتين تم انتاجه بواسطة نسخ mRNA. يُمكن أن تتضمن منتجات الجين أيضًا RNAs التي يتم تعديلها، بواسطة عمليات مثل التطويق، عملية إضافة عديد الأدينيل، عملية إضافة الميثيل methylation، والتحرير، والبروتينات التي تم تعديلها بواسطة، على سبيل المثال، عملية إضافة الميثيل، الأستلة، acetylation، الفسفرة phosphorylation، عملية إضافة اليوبيكويتين ubiquitination، عملية إضافة ADA-ريبوسيل، عملية إضافة الميرستيل myristilation، وعملية إضافة الجليكوسيل glycosylation .

يشير "تعديل" التعبير الجيني إلى تغيير في نشاط جين. يُمكن أن يتضمن تعديل التعبير، على سبيل المثال لا الحصر، تنشيط الجين وتثبيط الجين. يُمكن استخدام تحرير الجينوم (على سبيل المثال، إنشقاق، تعديل، تثبيط، طفرة عشوائية) لتعديل التعبير الوراثي. يشير التثبيط الجيني لأي اختزال في التعبير الجيني بالمقارنة بخلية لا تتضمن نظام ZFP ، TALE أو CRISPR/Cas كما هو موصوف هنا في هذا الاختراع. ومن ثم، يُمكن أن يكون تثبيط الجين جزئيًا أو كامل.

5

"منطقة محل الإهتمام" عبارة عن أي منطقة من كروماتين خلوي، مثل، على سبيل المثال، جين أو متوالية غير مشفرة داخل أو بالقرب من جين، التي فيها يكون من المرغوب الارتباط بجزئ خارجي المنشأ. يُمكن أن يكون الارتباط لأغراض انشقاق DNA المستهدف و/أو عودة الارتباط الجيني المُستهدف. يُمكن أن توجد منطقة محل الإهتمام في كروموسوم ، يصبوغ، جينوم عضوي organellar genome على سبيل المثال، ميتوكونديري mitochondrial ، يخضوري

10

chloroplast أو جينوم فيروسي مُعدي، على سبيل المثال. يُمكن أن تكون منطقة محل الإهتمام داخل منطقة التشفير الخاصة بجين، داخل مناطق غير مشفرة منسوخة مثل، على سبيل المثال، متواليات قائدة، متواليات السحب أو إنترونات، أو داخل مناطق غير منسوخة، إما منبع أو مصب المنطقة المُشفرة. يُمكن أن تكون المنطقة محل الإهتمام عبارة عن زوج نيوكليوتيد مفرد أو حتى 2000 زوج نيوكليوتيد في الطول، أو أي قيمة صحيحة من أزواج النيوكليوتيد nucleotide pairs.

15

تتضمن الخلايا "حقيقية النواة Eukaryotic"، على سبيل المثال، خلايا فطرية (مثل الخميرة yeast)، الخلايا النباتية، الخلايا الحيوانية، الخلايا الثديية والخلايا البشرية (على سبيل المثال، خلايا T)، تشمل الخلايا الجذعية (متعددة القدرة وعديدة القدرات).

يتم استخدام المصطلحات "رابطة عملية operative linkage" و"مرتبط عمليًا" (أو "مرتبط بشكل فعال) بالتبادل للإشارة إلى تجاور اثنين أو أكثر من المكونات (مثل عناصر المتوالية)، التي فيها يتم ترتيب المكونات بحيث يعمل المكونين معًا بشكل طبيعي ويسمح بإمكانية توسط واحدة على الأقل من المكونات لوظيفة يتم تنفيذها على واحد على الأقل من المكونات الأخرى. على سبيل التوضيح، ترتبط متوالية تنظيم النسخ، مثل محفز، عمليًا بمتوالية تشفير لو تحكمت متوالية تنظيم النسخ في مستوى نسخ التتابع المُشفر استجابة لوجود أو غياب واحدة أو أكثر من عوامل

25

منظمة للنسخ. يتم ربط متوالية تنظيم النسخ عمليًا بشكل عام في cis مع متوالية التشفير، لكن لا يحتاج أن يكون قريب مباشرة منه. على سبيل المثال، يكون مُحسن عبارة عن متوالية تنظيم النسخ المرتبطة عمليًا بمتوالية التشفير، حتى لم يكونوا متجاورين.

تُعد "شظية وظيفية functional fragment" من بروتين، عديد نيوكليوتيد أو حمض نووي
5 عبارة عن بروتين، عديد نيوكليوتيد أو حمض نووي تكون المتوالية الخاصة به غير مطابقة لبروتين كامل الطول، عديد بيبتيدي أو حمض نووي، مازال محتفظ بنفس الوظيفة كبروتين كامل الطول، عديد بيبتيدي أو حمض نووي. يُمكن أن تُظهر شظية وظيفية عدد أكثر، أقل، أو نفس العدد من الوحدات البنائية كجزئ أصلي مقابل، و/ أو يُمكن أن يحتوي على واحدة أو أكثر من استبدالات الحمض النووي أو النيوكليوتيد. تكون طرق تحديد وظيفة الحمض النووي (على سبيل المثال، وظيفة تشفير، قدرة على التهجين لحمض نووي آخر) معروفة في المجال. بالمثل، طرق تحديد وظيفة البروتين معروفة جيدًا. على سبيل المثال، يكون عامل VIII البشري محذوف المجال B عبارة عن شظية وظيفية functional fragment لبروتين العامل VIII كامل الطول.

يكون "ناقل" أو "بنية" عديد نيوكليوتيد قادر على نقل متواليات جينية لخلايا مستهدفة. نموذجيًا، يُقصد من "بنية ناقل"، "ناقل تعبير وراثي"، "بنية تعبير وراثي"، "مجموعة تعبير وراثي"، و"ناقل نقل الجين"، هي أي بنية حمض نووي قادرة على توجيه التعبير الوراثي الخاص بجين محل الإهتمام
15 ويُمكن نقل متواليات جينية إلى الخلايا المُستهدفة. ومن ثم، يتضمن المصطلح نواقل التعبير الوراثي والنسخ، ونواقل الدمج.

يتم استخدام المصطلحات "خاضع للعلاج" و"مريض" بالتبادل وتشير إلى الثدييات مثل مرضى
من الجنس البشري ورئيسيات غير بشرية، وحيوانات تجارب مثل الأرانب، الكلاب، القطط،
20 الجرذان، الفئران، وحيوانات أخرى. وفقًا لذلك، يُقصد من المصطلح "خاضع للعلاج أو "مريض" كما هو مُستخدم هنا أي مريض ثديي أو خاضع للعلاج يُمكن إعطائه مجموعات التعبير الوراثي الخاصة بالاختراع. يتضمن الخاضعين للعلاج الخاصين بالاختراع الحالي هم تلك اللذين يعانون من اضطراب.

بنيات التعبير الجيني الخاصة بالكبد Liver-specific expression constructs

يُقدم الاختراع الحالي مجموعات التعبير الجيني (بنيات) للاستخدام في التعبير الوراثي المباشر لناقل في خلية كبد، تتضمن الاعطاء التالي في جسم الكائن الحي لمجموعة (مجموعات) التعبير الوراثي للخاضع (على سبيل المثال، توصيل الكبد). يُمكن الاحتفاظ ببنية التعبير الجيني بصوغيًا وتوجيه التعبير الجيني لناقل الجين خارج الكروموسوم أو بدلاً من ذلك، يُمكن إدخال بنية التعبير الجيني في جينوم الخلية الكبدية، على سبيل المثال بواسطة تكامل مُستهدف يتوسطه إنزيم النيوكلياز.

5

تشمل بنية تعبير عديد النيوكليوتيد تتابع مُحسن، متوالية محفزة، وواحدة أو أكثر من النواقل الجينية. كما تتضمن اختياريًا واحدة أو أكثر من التالي: متوالية إنترونية، متوالية إدخال عديد الأدينيل و/أو بيتيد إشارة. يُمكن استخدام أي متوالية مُحسنة في بنيات التعبير الوراثي الموصوفة هنا في هذا الاختراع. في تجسيديات معينة، يكون المُحسن عبارة عن مُحسن السبرين 1 المعدل أو من النوع غير المعالج (Chuah et al., (2014) Molecular Therapy, 22, 1605-1613); Nair et al., (2014) Blood, 123, 3195-3199).

10

في نماذج مفضلة، مُحسن السبرين 1 يشتمل على واحدة أو أكثر من الطفرات (على سبيل المثال، طفرات إلى نقطة معينة) مقارنةً بالنوع غير المعالج، على سبيل المثال مُحسن سبرين 1 يحتوي على واحدة أو أكثر من تعديلات نيوكليوتيد على النحو الموضح في الشكل 5، أي تعديلات النيوكليوتيد عند واحدة أو أكثر من الوحدات البنائية 1، 5، 14، 32 و/ أو 39 من المتوالية الموضحة في أي من المتوالية رقم: 1-13. في نماذج معينة، مُحسن السبرين 1 يشتمل على تعديلات عند المواضع 1، 5، 14 و 32 (بنى مُشار إليها بـ CRMSBS1) من أي من المتوالية رقم: 1-13 بينما في نماذج أخرى، مُحسن السبرين 1 يشتمل على تعديل عند المواضع 1، 14، 32 و 39 (بنى مُشار إليها بـ CRMSBS2) أو أي من المتوالية رقم: 1-13. يتم توضيح متواليات المُحسن التوضيحية أدناه:

15

20

CRMSBS1 (تطابق المتوالية رقم: 35):

5'GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCAGCCCAGTTACCG

GAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTTCAC

CRMSBS2 (المتوالية رقم: 36): 5'

GGGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGATCACCCCAGTTACCGG
AGGAGCAAACAGGGACTAAGTTCAC

5 بالمثل، يمكن استخدام أي متوالية مُحسن في مجموعات التعبير من الاختراع. في نماذج معينة، يكون المُحسن عبارة عن مُحسن بنيوي. في نماذج أخرى، يكون المُحسن عبارة عن مُحسن قابل للحث أو محدد لنسيج. في بعض النماذج، يكون المُحسن عبارة عن مُحسن محدد للكبد. في نماذج معينة، يكون المُحسن عبارة عن مُحسن ترانسيرتين ضئيل transthyretin minimal promoter (TTRm). في نماذج أخرى، يكون المُحسن عبارة عن مُحسن لمضاد تريپسين ألفا-1 (hAAT) alpha-1 anti-trypsin 1.

10 يمكن أن يشمل أي من عديدات النيوكلوديد الموصوفة في هذه الوثيقة اختياريًا أيضاً على متوالية إنترون. في نماذج معينة، تتضمن بنية التعبير متوالية إنترون خيمري مقطوع (إنترون خيمري T-)، على سبيل المثال على النحو الموضح في الألواح السفلية من الأشكال 6، 7، 19 و 20. يكون الإنترون الخيمري T- عبارة عن نسخة مقطوعة من الإنترون الخيمري في pCI-neo (GenBank U47120). يكون الإنترون الخيمري في pCI-neo عبارة عن موقع مانح الجدل 5' من جين الجلوبيين البشري - β ، ونقطة التفرع وموقع مستقبل 3' منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة لجين جلوبيولين مناعي. يحتوي الإنترون الخيمري T- على 45 حذف زوج قاعدي بين مانح الجدل 5' ونقطة التفرع. في نماذج أخرى أيضاً، تتضمن بنى التعبير متوالية إنترون MVM مطفر (على سبيل المثال، واحدة أو أكثر من الطفرات الموضحة في الأشكال 12، 13 و 14) (المتوالية رقم: 15-17).

20 بدلاً من ذلك، يمكن أن تفتقر بنى التعبير كما تم وصفه في هذه الوثيقة إلى متوالية إنترون، على سبيل المثال على النحو الموضح في البنى الموصوفة في الألواح الوسطى من الشكل 6، 7، 19 و 20. يتم توضيح بنية توضيحية، بحواشي تتضمن المعامل VIII للجين المعدل وراثيًا أدناه ويتضح أن الجين المعدل وراثيًا F8 يمكن استبداله بأي جين معدل وراثيًا وأن المتواليات المُحسنة والمعزولة يمكن تعديلها أيضاً على النحو الموصوف في هذه الوثيقة:

hF8 cDNA، لا يوجد إنترون (متوالية كاملة تتضمن وحدة مُحسن نمطية، poly A و Ins،
CRMSBS2 لا يوجد إنترون) (المتوالية رقم: 34):

الاسم: CRMSBS2 لا يوجد إنترون	
الوحدات البنائية	الوحدة النمطية
32 - 14	Ins 1
104 - 33	CRMSBS2
339 - 117	TTRm
4718 - 345	hF8 BDD
4775 - 4725	SPA51
4792 - 4776	Ins 3

GCGGCCTAAGCTTGGAACCATTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGG

TGA - 50 5

ATATTAACCAAGATCACCCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAA

GT - 100

TCACACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTTC

CG - 150

ATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTC 10

- 200

TCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAG

C - 250

TTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCC

CCT - 300
TCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGCTAGTATGC
AG - 350
ATCGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTTGAGATTCTGCTTCA
G - 400 5
CGCCACCAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACT
ACA - 450
TGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCC
AGA - 500
GTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACC 10
CT - 550
GTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCC
CC - 600
CCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGAC
ACT - 650 15
GTGGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCA
TGC - 700
TGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATG
ACC - 750
AGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGG 20
CAGC - 800
CACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTC
TGA - 850
CCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAA
GG - 900 25
ACCTGAACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGC

AGC - 950
CTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTT

GC - 1000
TGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCT

GA - 1050 5
TGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCAC

ACT - 1100
GTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCA

CAG - 1150
GAAGTCTGTGTACTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCTGAGGT 10

GC - 1200
ACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGG

CAG - 1250
GCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCT

GCT - 1300 15
GATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCA

GC - 1350
ATGATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAG

CCC - 1400
CAGCTGAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGA 20

CCT - 1450
GACTGACTCTGAGATGGATGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCC

CA - 1500
GCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGG

GTG - 1550 25
CACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGT

GCT - 1600
GGCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCC
CCC - 1650
AGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTCATGGCCTACACTG
AT - 1700 5
GAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCT
GGG - 1750
CCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCA
AGA - 1800
ACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATG 10
TG - 1850
AGGCCCTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAA
GGA - 1900
CTTCCCCATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGAC
TG - 1950 15
TGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGACCAGATAC
TAC - 2000
AGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGG
CCC - 2050
1 10 20 30 40 50 20
| | | | | | |
CCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGA
TCA - 2100
TGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAG
G - 2150 25

AGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCTGCCCCAACCCCTGCT
GG - 2200

GGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACA
GCA - 2250

TCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATG 5
AG - 2300

GTGGCCTACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTG
TC - 2350

TGTGTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGA
CA - 2400 10

CCCTGACCCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGG
AG - 2450

AACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACCTCTGACTTCAGGAAC
AG - 2500

GGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAACCTG 15
GGG - 2550

ACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCA
AG - 2600

AACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTT
AA - 2650 20

GCGCCATCAGCGCGAGATCACCCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGG
AGG - 2700

AGATTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACT
TT - 2750

GACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAA 25
GAA - 2800

GACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATG
GCA - 2850

TGAGCAGCAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCT
GTG - 2900

CCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTC 5
AC - 2950

CCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGG
GCC - 3000

CCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGG
AAC - 3050 10

CAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGA
GGA - 3100

GGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCA
ATG - 3150

AAACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCCACATGGCCCCACCA 15
AG - 3200

GATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTG
GA - 3250

GAAGGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACA
CCA - 3300 20

ACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTT
GCC - 3350

CTGTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGA
A - 3400

CATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACC 25
CCA - 3450

CCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGG
AC - 3500

ACCCTGCCTGGCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTA
CCT - 3550

GCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGG 5
CC - 3600

ATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACA
AC - 3650

CTGTACCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGC
TGG - 3700 10

CATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCA
TGA - 3750

GCACCCTGTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGC
ATG - 3800

GCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTAT 15
GG - 3850

CCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCA
ATG - 3900

CCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTG
GCC - 3950 20

CCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTT
CAG - 4000

CAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAA
GA - 4050

AGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTTT 25
TTT - 4100

GGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAAACATCTTCAACCCCCC
AT - 4150

CATTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCATCAGGAG
CA - 4200

CCCTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATG 5
CCC - 4250

CTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCCAGATCACTGCCAG
CAG - 4300

CTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCT
GC - 4350 10

ATCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCC
AAG - 4400

GAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGT
GAC - 4450

CACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGT 15
TCC - 4500

TGATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAG
AAT - 4550

GGCAAGGTGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCTGT
GGT - 4600 20

GAACAGCCTGGACCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACC
CCC - 4650

AGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGT
GAG - 4700

GCCCAGGACCTGTACTGAGGATCCAATAAAATATCTTTATTTTCATTAC 25
A - 4750

1 10 20 30 40 50
| | | | | |
TCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTTTTTCCTGTAACGATCGGGCTCGAGC
G - 4800 5
5'

يتم أدناه توضيح بنية توضيحية أخرى، بحواشي تتضمن العامل VIII للجين المعدل وراثيًا ويتضح أيضاً أن الجين المعدل وراثيًا F8 يمكن استبداله بأي جين معدل وراثيًا وأنه يمكن أيضاً تعديل المتواليات المعززة والعازلة على النحو الموصوف في هذه الوثيقة:

10 hF8 cDNA ، يتضمن إنترون (متوالية كاملة تتضمن وحدة مُحسن نمطية، poly A و Ins ،
CRMSBS2 SBR (3 إنترون 3) (المتوالية رقم: 37):

الاسم: CRMSBS2 SBR إنترون 3	
الوحدة النمطية	الوحدات البنائية
Ins 1	32 - 14
CRMSBS2	104 - 33
TTRm	339 - 117
SBR Intron 3	432 - 340
hF8 BDD	4811 - 438
SPA51	4868 - 4818
Ins 3	4885 - 4869

1	10	20	30	40	50	
GCGGCCTAAGCTTGGAACCATTGCCACCTTCAGGGGGAGGCTGCTGG						
					TGA – 50	
ATATTAACCAAGATCACCCCAGTTACCGGAGGAGCAAACAGGGACTAA						5
					GT – 100	
TCACACGCGTGGTACCGTCTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTTC						
					CG – 150	
ATACTCTAATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTC						
					- 200	10
TCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAG						
					C – 250	
TTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCC						
					CCT – 300	
TCACCAGGAGAAGCCGTCACACAGATCCACAAGCTCCTGAAGAGGTAA						15
					GG – 350	
GTTTAAGTTATCGTTAGTTCGTGCACCATTAATGTTTAATTACCTGGAG						
					C – 400	
ACCTGCCTGAAATCATTTTTTTTTTCAGGTTGGCTAGTATGCAGATCGAG						
					C – 450	20
TCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGTTGAGATTCTGCTTCAGCGCCAC						
					C – 500	
AGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCA						
					GTC – 550	
TGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGC						25

CCA - 600
AGAGCTTCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTG
TG - 650
GAGTTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCCTGG
AT - 700 5
GGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGG
TGA - 750
TCACCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTG
GGG - 800
GTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGAC 10
CAG - 850
CCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCAGCCACA
CCT - 900
ATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCC
CTG - 950 15
TGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCT
GAA - 1000
CTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTG
GCCA - 1050
AGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGT 20
TT - 1100
GATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCA
GGA - 1150
CAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGA
ATG - 1200 25
GCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAG

TCT - 1250
GTGTA CTGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCCTGAGGTGCACAG
CAT - 1300
CTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGCAGGCCA
GCC - 1350 5
TGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATGG
AC - 1400
CTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGAT
GG - 1450
CATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGC 10
TGA - 1500
GGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTG
AC - 1550
TCTGAGATGGATGTGGTGGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTC
AT - 1600 15
CCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACT
ACA - 1650
TTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCCCTGGTGCTGGCC
CCT - 1700
GATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGAG 20
GAT - 1750
TGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAAC
CT - 1800
TCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCCC
CTG - 1850 25

CTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCA
GGC - 1900

CAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCC
CC - 1950 5

1 10 20 30 40 50
| | | | | |

TGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTC
CCC - 2000

ATCCTGCCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAG 10
GA - 2050

TGGCCCCACCAAGTCTGACCCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCA
GCT - 2100

TTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTG
CTG - 2150 15

ATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCT
GA - 2200

CAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAGAACAGGAGCTG
GT - 2250

ACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCCTGCCCAACCCTGCTGGGGTG 20
CAG - 2300

CTGGAGGACCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAAT
GG - 2350

CTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGC
CT - 2400 25

ACTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGT
TC - 2450

TTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTG
AC - 2500

CCTGTTCCCCTTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCC 5
TG - 2550

GCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACAACCTCTGACTTCAGGAACAGGGGC
ATG - 2600

ACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGACAAGAACAACCTGGGGACTAC
TA - 2650 10

TGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCTGAGCAAGAACAA
TG - 2700

CCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCACCCGTCCTTAAGCGCC
AT - 2750

CAGCGCGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGAT 15
TGA - 2800

CTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACAT
CT - 2850

ACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACC
AGG - 2900 20

CACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGC
AG - 2950

CAGCCCCCATGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCC
AGT - 3000

TCAAGAAGGTGGTGTTCAGGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGC 25
CC - 3050

CTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGCCTGCTGGGCCCCTA
CAT - 3100

CAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGG
CCA - 3150

GCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGGAC 5
CAG - 3200

AGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAAC
CAA - 3250

GACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCATGGCCCCCACCAGGATG
AGT - 3300 10

TTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGG
AT - 3350

GTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACAC
CCT - 3400

GAACCCTGCCCATGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCCTGT 15
TCT - 3450

TCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGA
G - 3500

AGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACCTT
CAA - 3550 20

GGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCT
GC - 3600

CTGGCCTGGTGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTG
AGC - 3650

ATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTG 25
TT - 3700

CACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTA
CC - 3750

CTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCTGGCATC
TGG - 3800

AGGGTGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCAC 5
CCT - 3850

GTTCTGGTGTACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCT
CTG - 3900

GCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGT
GG - 3950 10

GCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTG
GAG - 4000

CACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCA
TGA - 4050

TCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGC 15
CTG - 4100

TACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTGG
CA - 4150

GACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTTCCTTTGGCAA
TG - 4200 20

TGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCATCATTG
CC - 4250

AGATACATCAGGCTGCACCCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCCTG
AG - 4300

GATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCTGG 25
GCA - 4350

TGGAGAGCAAGGCCATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAGCTACT
TC - 4400

ACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCATCT
GCA - 4450

GGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCCAAGGAGT 5
GGC - 4500

TGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGGTGACCACC
CAG - 4550

GGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTGAT
CAG - 4600 10

CAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCTGTTCTTCCAGAATGGCA
AGG - 4650

1 10 20 30 40 50
| | | | | |

TGAAGGTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCTGTGGTGAAC 15
AGC - 4700

CTGGACCCCCCCTGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAG
CTG - 4750

GGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCC
AGG - 4800 20

ACCTGTAAGGATCCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGT
- 4850

GTTGGTTTTTTGTGTGTTTTCTGTAACGATCGGGCTCGAGCGC

في نماذج مفضلة، تشتمل البنى الموصوفة في هذه الوثيقة على متواليات عازلة (فاصلة) على النحو الموضح في الأشكال 1، 2، 4، 6، 7، 10، 19، 20، و25. تتضمن المتواليات العازلة التوضيحية Ins1: 5' GGAACCATTTGCCACCTTCA (المتوالية رقم: 28)؛ Ins2: 5' CTATCCATTGCACTATGCT (المتوالية رقم: 29)؛ Ins3: 5' TTTCTGTAACGATCGGG (المتوالية رقم: 30) و Ins4: 5' TTGAATTCATAACTATCCCAA (المتوالية رقم: 38).

كما يمكن أن يتضح، يمكن استخدام أي جين معدل وراثيًا في البنى الموصوفة في هذه الوثيقة. علاوة على ذلك، يمكن خلط المكونات الفردية (معزز، محسن، عازل، الجين المعدل وراثيًا، الخ.) للبنى الموصوفة في هذه الوثيقة وموافقتها في أي توليفة.

10 يمكن إدراج البنى الموصوفة في هذه الوثيقة داخل أي ناقل فيروسي أو غير فيروسي. يمكن الاحتفاظ بالبنى اليبوغوي أو يمكن دمجها في جينوم الخلية (على سبيل المثال، عبر تكامل مستهدف بواسطة النيوكلاز).

تتضمن نواقل غير فيروسية بلازميدات DNA أو RNA، DNA MCs، حمض نيوكليك مكشوف، و حمض نيوكليك معقد مع مادة توصيل ناقلة مثل جسيم حال، جسيم نانوي أو بولوكسامير. 15 تتضمن النواقل الفيروسية التي يمكن استخدامها لحمل مجموعات التعبير الموصوفة في هذه الوثيقة، على سبيل المثال لا الحصر على، نواقل الارتداد الفيروسي، فيروس بطيء، فيروس غدي، نواقل فيروسية مرتبطة بالغدة، جدري البقر وفيروس الهريس البسيط. يُعد التكامل في الجينوم العائل ممكناً مع الفيروسات الارتجاعية، فيروس بطيء، ويمكن تسهيل نقل جين الفيروس المرتبط بالغدة، وكما تم وصفه في هذه الوثيقة بواسطة تكامل بواسطة نيوكلاز.

20 في تجسيديات معينة مفضلة، يتم إدراج البنى في ناقل فيروس مرتبط بالغدة - adeno-associated virus ("AAV") أو نظام ناقل يمكن الاحتفاظ به يصبوغيا أو دمجها في جينوم خلية الكبد (على سبيل المثال، عبر تكامل مستهدف بواسطة النيوكلاز). يرد تصميم نواقل AAV الناتجة عن عودة الارتباط الجيني في عدد من النشرات، تتضمن طلب براءة الاختراع الأمريكية رقم Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985); 5,178,414

Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Samulski et al., J. Virol. و Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984); (1989) 63:03822-3828.

5 بالتالي، في تجسيدات معينة، يتم حمل بنية التعبير على بنية AAV وتشتمل أيضاً على 5' و3' من ITRs بجانب عناصر بنى التعبير (على سبيل المثال، محسن، معزز، إنترون اختياري، الجين المعدل وراثياً، وما إلى ذلك.) على النحو الموصوف في هذه الوثيقة. اختياريًا، يتم أيضاً إدراج الجزئيات الفاصلة بين واحد أو أكثر من مكونات بنية التعبير، على سبيل المثال، بين 5' ITR والمحسن و/ أو بين إشارة إدخال بولي أدينيل و ITR3'. يمكن أن تعمل الفواصل بمثابة أذرع تجانس لتسهيل عودة الارتباط الجيني في موقع إيواء آمن (على سبيل المثال ألبومين). في نماذج معينة، تكون البنية عبارة عن بنية مثل الموضحة في أي من الأشكال 1، 2، 4، 6، 7، 10، 18، 19، 20 أو 25.

في تجسيدات معينة، يكن اشتقاق النواقل AAV مثل الموصوفة في هذه الوثيقة من أي AAV. في نماذج معينة، يتم اشتقاق الناقل AAV من فيروس من النوع الثاني مرتبط بفيروس غدي صغير به عيب وغير ممرض. يتم اشتقاق كل هذه النواقل من بلازميد يحتجز فقط AAV 145 زوج قاعدة من وحدات طرفية معكوسة متكررة بجانب مجموعة التعبير عن الجين المعدل وراثياً. يمثل نقل الجين الفعال وتوصيل الجين المعدل وراثياً الثابت بسبب الدمج في جينومات الخلية التي تم نقلها سمات أساسية لهذا النظام الناقل. (Wagner et al., Lancet 351:9117 1702-3 (1996) Kearns et al., Gene Ther. 9:748-55 (1998)). تتضمن الأنواع المصلية AAV الأخرى، AAV1، AAV2، AAV3، AAV4، AAV5، AAV6، AAV7، AAV8، AAV9 ويمكن استخدام AAVrh.10 وأي نوع مصلي جديد AAV وفقاً للاختراع الحالي. في بعض التجسيدات، يتم استخدام AAV الخيميري حيث تكون الأصول الفيروسيّة لمتواليات LTR لحمض نيوكلييك الفيروسي غير متجانسة مع الأصل الفيروسي للمتواليات القفصية. تتضمن أمثلة غير مقيدة فيروس خيميري مع LTRs مشتقة من AAV2 وقفصيات مشتقة من AAV5، AAV6، AAV8 أو AAV9 (أي AAV2/5، AAV2/6، AAV2/8 و AAV2/9، على الترتيب).

- تتضمن النواقل الفيروسيّة الارتجاعية تلك التي تعتمد على فيروس ابيضاض الدم الفأري
gibbon ape (MuLV) murine leukemia virus، فيروس ابيضاض الدم للقرد الجبوني
Simian Immunodeficiency (GaLV) leukemia virus، فيروس نقص المناعة في القرد
human immunodeficiency virus (SIV) virus، فيروس نقص المناعة في الانسان
5 (HIV)، وتوليفة منه (انظر، على سبيل المثال، - Buchscher et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1991); Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700 (1989).
- يمكن أيضاً إدراج البنى الموصوفة في هذه الوثيقة في نظام ناقل لفيروسي غدي. تُعد النواقل التي
10 تعتمد على فيروسي غدي قادرة على فعالية نقل مرتفعة جداً في العديد من أنواع الخلية ولا تتطلب انقسام خلية. بهذه النواقل، تم الحصول على عيار مرتفع ومستويات مرتفعة من التعبير. يمكن إنتاج هذا الناقل بكميات كبيرة في نظام بسيط نسبياً.
- تُعد pLASN و MFG-S أمثلة على نواقل فيروسيّة ارتجاعية تم استخدامها في اختيارات سريرية
(Dunbar et al., Blood 85:3048-305 (1995); Kohn et al., Nat. Med.)
15 (1:1017-102 (1995); Malech et al., PNAS 94:22 12133-12138 (1997)).
كان PA317/pLASN عبارة عن الناقل العلاجي الأول المستخدم في تجربة العلاج الجيني.
(Blaese et al., Science 270:475-480 (1995)). لوحظت فعاليات نقل تبلغ 50% أو أكبر لئناقل MFG-S معبأة. (Ellem et al., Immunol Immunother. 44(1):10-20 (1997); Dranoff et al., Hum. Gene Ther. 1:111-2 (1997)).
- 20 يكن أيضاً استخدام نواقل فيروسيّة غدية ناتجة عن عودة الارتباط الجيني ناقصة النسخ (Ad) مع عديدات النيوكلوويد الموصوفة في هذه الوثيقة. يتم تعديل معظم نواقل الفيروس الغدي بحيث يستبدل جين معدل وراثياً الجينات Ad E1a، E1b و/ أو E3؛ بعد ذلك ينتشر الناقل الذي ينقصه النسخ في 293 من خلايا الانسان التي توفر وظيفة جسن محذوف في trans. يمكن أن تقوم النواقل الغدية بنقل عدة أنواع من الأنسجة في الجسم الحي، تتضمن خلايا غير منقسمة، متميزة مثل تلك الموجودة في الكبد، الكلى والعضلات. تتسم النواقل الغدية التقليدية بقدرة حمل
- 25

- كبيرة. اشتمل أحد أمثلة استخدام فيروس غدي في اختبار سريري علاج عديد نيوكلوتيد لإكساب
مناعة مضادة للورم باستخدام الحقن في العضل (Stermen et al., Hum. Gene Ther. (1998) 9:1083-7).
تتضمن أمثلة إضافية لاستخدام نواقل فيروس غدي لنقل الجين في
تجارب سريرية Rosenecker et al., Infection 24:1 5-10 (1996); Stermen et al., Hum. Gene Ther. 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., Hum. Gene
5 Ther. 2:205-18 (1995); Alvarez et al., Hum. Gene Ther. 5:597-613
(1997); Topf et al., Gene Ther. 5:507-513 (1998); Stermen et al., Hum.
.Gene Ther. 7:1083-1089 (1998).
- 10 يتم استخدام خلايا التعبئة لتشكيل جسيمات فيروس القادرة على نقل العدوى إلى خلية عائلة.
تتضمن هذه الخلايا خلايا HEK293 و Sf9، التي يمكن استخدامها لحزم AAV وفيروس غدي،
وخلايا ψ 2 أو خلايا PA317، يعمل على حزم الفيروس الارتجاعي. يتم عادةً توليد النواقل
الفيروسية المستخدمة في العلاج الجيني بواسطة سلالة خلية منتجة تعمل على حزم ناقل حمض
نيوكليك في جسيم فيروسي. تحتوي النواقل نمطياً على أدنى متواليات فيروسية مطلوبة للحزم
والتكامل التالي في عائل (عندما ينطبق)، يتم استبدال متواليات فيروسية أخرى بواسطة مجموعة
15 تعبير تشفر البروتين المراد التعبير عنه. يتم إمداد الوظائف الفيروسية المفقودة في trans بواسطة
سلالة خلية تعبئة. على سبيل المثال، تشتمل نواقل AAV المستخدمة في العلاج الجيني بشكل
نمطي فقط متواليات وحدات متكررة طرفية مقلوبة inverted terminal repeat (ITR) من
الجينوم AAV المطلوب للحزم والدمج في الجينوم العائل. يتم حزم DNA الفيروسي في سلالة
خلية، تحتوي على بلازميد مساعد يُشفر الجينات AAV الأخرى، أي rep و cap، ولكنها تفتقر
20 إلى متواليات ITR. يتم أيضاً نقل العدوى إلى سلالة الخلية باستخدام الفيروس الغدي كمساعد.
يعزز الفيروس المساعد تناسخ ناقل AAV والتعبير عن جينات AAV من البلازميد المساعد. لا
يتم حزم البلازميد المساعد بكميات كبيرة بسبب نقص متواليات ITR. يمكن تقليل التلوث باستخدام
الفيروس الغدي، على سبيل المثال، بواسطة المعالجة الحرارية التي يكون لها الفيروس الغدي أكثر
حساسية من AAV. في بعض النماذج، يتم إنتاج AAV باستخدام نظام التعبير عن الفيروس
25 العصوي.

في العديد من تطبيقات العلاج الجيني، من المرغوب فيه أن يتم توصيل ناقل العلاج الجيني بدرجة مرتفعة من الخصوصية لنوع نسيج معين. وفقاً لذلك، يمكن تعديل الناقل الفيروسي ليتسم بنوعية لنوع خلية معين بواسطة التعبير عن مركب ترابطي في صورة بروتين اندماج مع بروتين تغليف فيروسي على السطح الخارجي للفيروس. يتم اختيار المركب الترابطي ليتسم بألفة لمستقبل

5 يُعرف وجوده على نوع الخلية محل الاهتمام. على سبيل المثال، ذكر Han et al., Proc.

(1995) 92:9747-9751, Natl. Acad. Sci. USA، أن فيروس ابيضاض الدم الفأري

لمولوني يمكن تعديله للتعبير عن heregulin بشري مندمج ب gp70، ويصيب الفيروس الناتج

عن عودة الارتباط الجيني خلايا سرطان الثدي بشرية معينة تعبر عن مستقبل عامل نمو بشرية

بشري. يمكن أن يمتد هذا المبدأ إلى أزواج خلية أخرى تستهدف فيروس، تعبر فيها الخلية

10 المستهدفة عن مستقبل ويعبر الفيروس عن بروتين اندماج يشتمل على مركب ترابطي لمستقبل

سطح الخلية. على سبيل المثال، يمكن تعديل الملتزمة الخيطية وراثياً ليعرض شظايا جسم مضاد

(على سبيل المثال، FAB أو Fv) له ألفة ارتباط نوعية افتراضياً لأي مستقبل خلوي مختار. على

الرغم من أن الوصف الوارد أعلاه ينطبق أساساً على نواقل فيروسية، يمكن تطبيق نفس المبادئ

على نواقل غير فيروسية. يمكن تعديل هذه النواقل وراثياً لتحتوي على متواليات امتصاص محددة

15 تفضل الامتصاص بواسطة خلايا مستهدفة محددة.

يمكن أن تتضمن عديدات النيوكليوتيد الموصوفة في هذه الوثيقة واحدة أو أكثر من القواعد غير

الطبيعية و/ أو الهياكل الأساسية. على وجه الخصوص، يمكن أن تتضمن مجموعة تعبير مثل

الموصوفة في هذه الوثيقة سيتوسين معالج بميثيل لتحقيق حالة من سكون نسخي في المنطقة محل

الاهتمام.

20 علاوة على ذلك، يمكن أن تتضمن أيضاً بنى التعبير مثل الموصوفة في هذه الوثيقة متواليات

إضافية تنظيمية نسخية أو انتقالية أو متواليات أخرى، على سبيل المثال، متواليات Kozak،

معززات، محسنات إضافية، متواليات عازلة، مواقع إدخال ريبوسوم داخلي، متواليات تشفر

ببتيدات 2A، مواقع انشطار فيورين و/ أو إشارات بولي أدينيل. أيضاً، يمكن بصورة فعالة ربط

عناصر التحكم من الجينات محل الاهتمام بجينات مرشدة لإنشاء جينات خميرية (على سبيل

25 المثال، مجموعات تعبير مرشدة).

الجينات المعدلة وراثيًا

- يمكن استخدام البنى الموصوفة في هذه الوثيقة للتوصيل الكبدي لأي جين معدل وراثيًا. تتضمن الجينات المعدلة وراثيًا التوضيحية (يشار إليها أيضاً بالجينات محل الاهتمام و/ أو متواليات خارجية)، على سبيل المثال لا الحصر على أي متوالية تشفير عديد ببتيدي (على سبيل المثال، cDNAs 5)، متواليات معززة، متواليات محسنة، علامات قمة لاصقة، جينات مرقمة، مواقع التعرف على إنزيم انشطار وأنواع مختلفة من بنى التعبير. تتضمن الجينات المرقمة، على سبيل المثال لا الحصر على، بروتينات تشفير متواليات تسبب مقاومة المضادات الحيوية (على سبيل المثال، مقاومة الأمبيسيلين، مقاومة نيوميسين، مقاومة G418، مقاومة بوروميسين)، متواليات تشفر بروتينات ملونة أو فلورية أو وامضة (على سبيل المثال، بروتين فلوري أخضر، بروتين فلوري أحمر 10)، بروتين معزز، بروتين فلوري أحمر، لوسيفيراز)، وبروتينات تسبب نمو خلية مُحسن و/ أو تكبير جين (على سبيل المثال، داي هيدروفولات ريدكتاز). تتضمن علامات قمة لاصقة، على سبيل المثال، واحدة أو أكثر من نسخ FLAG، His، myc، Tap، HA أو أي متوالية حمض أميني قابل للكشف.
- في نموذج مفضل، يشتمل الجين المعدل وراثيًا على عديد نيوكلوديد يُشفر أي عديد ببتيدي تقتضي الرغبة التعبير عنهم في الخلية، يتضمن، على سبيل المثال لا الحصر أجسام مضادة، مولدات ضد، إنزيمات، مستقبلات (سطح حلية أو نووية)، هرمونات، ليمفوكينات، سيتوكينات، عديدات ببتيدي مرشدة، عوامل نمو، و شظايا وظيفية من أي من ما ورد أعلاه. يمكن أن تكون متواليات الترميز، على سبيل المثال، عبارة عن cDNAs.
- في نماذج معينة، يشفر الجين المعدل وراثيًا (الجينات المعدلة وراثيًا) نسخ وظيفية من البروتينات التي تفتقر إلى عجز في أي مرض وراثي، يتضمن على سبيل المثال لا الحصر، اضطرابات تخزين الجسيم الحال (على سبيل المثال، Gaucher's، Fabry's، Hunter's، Hurler's، Neimann-Pick's، وما إلى ذلك)، اضطرابات أيض، و/ أو اضطرابات في الدم مثل سيولة الدم واعتلالات هيمو جلوبينية، وما إلى ذلك. انظر، على سبيل المثال، نشرة براءة الاختراع الأمريكية رقم 20140017212 و 20140093913؛ براءة الاختراع الأمريكية رقم 9,255,250 و 9,175,280 25

- على سبيل المثال، يمكن أن يشتمل الجين المعدل وراثيًا على متوالية تشفر عديد ببتيد غير موجود أو غير وظيفي في خاضع مصاب بمرض وراثي، بما في ذلك على سبيل المثال لا الحصر أي من الأمراض الوراثية التالية: الودانة، عمى الألوان، نقص حمض مالتاز، نقص الأدينوسين ديأميناز (رقم OMIM: 102700)، حثل الكظر وبيضاء الدماغ، متلازمة أيكارد، نقص ألفا - 5 1 أنتيتريبسين، ألفا-الثلاسيما، متلازمة عدم حساسية الأندروجين، متلازمة apert، اضطراب البطين الأيمن البطيني، خلل التنسج، توسع الشعيرات المسبب للترنح، متلازمة بارث، ثلاسيما بيتا، متلازمة الوحمة الزرقاء المطاطية الفقاعية، مرض كانافان، الأمراض الحبيبية المزمنة (CGD)، متلازمة داء صرخة القط، التليف الكيسي، مرض الديركوم، خلل التنسج الأديمي، فقر دم فانكوني، خلل التنسج الليفى المتعظم التقدمي، متلازمة X الهشة، وجود جالاكتور في الدم، داء جوشيه، الجنجليوسيدية العامة (على سبيل المثال، GM1)، داء ترسب الأصبغة الدموية، طفرة الهيموجلوبين C في الكودون السادس لبيتا جلوبيين (HbC)، سيولة الدم، مرض هنتجتون، متلازمة هيرلر، نقص الفوسفات، متلازمة كلاينفيلتر، مرض كرابس، متلازمة لانجر-جيدون، نقص التصاق الكريات البيض (LAD، رقم OMIM : 116920)، حثل عضلي أبيض، متلازمة QT الطويلة، متلازمة مارفان، متلازمة موبوس، داء عديد السكاريد المخاطي (MPS)، متلازمة الظفر الرضفي، داء السكري من النوع الكلوي، الورم الليفى العصبي، مرض Neimann-Pick، 15 تكون العظم الناقص، برفريا، متلازمة Prader-Willi، الشخوخة المبكرة، متلازمة Proteus، ورم أرومي شبكي، متلازمة Rett، متلازمة روبنشتاين-تايبى، متلازمة سانفيليبو، نقص المناعة المشترك الشديد (SCID)، متلازمة شواكمان، مرض الخلايا المنجلية (فقر الدم المنجلي)، متلازمة سميث-ماجنيس، متلازمة ستيكلر، مرض تاي ساكس، متلازمة غياب الكعبرة وقلة الصفائح (TAR)، 20 متلازمة تريشر كولينز، التثلث، التصلب الجلدي، متلازمة تيرنر، اضطراب دورة اليوريا، مرض فون هيبيل-لاندوا، متلازمة واردنبورج، متلازمة ويليامز، مرض ويلسون، متلازمة ويسكوت-الدريخ، متلازمة التكاثر اللمفية المرتبطة بـ X (XLP، رقم OMIM : 308240)، نقص المناعة المكتسب، أمراض تخزين ليزوسومي (مثل مرض جوشيه، مرض GM1، مرض فابري ومرض تاي ساكس)، داء عديد السكاريد المخاطي (على سبيل المثال، مرض هنتر، مرض هيرلير)، 25 اعتلال الهيموجلوبين (على سبيل المثال، أمراض الخلايا المنجلية، HbC، α - β ثالاسيما، ثالاسيما) وسيولة الدم.

- تتضمن الأمثلة غير المقيدة للبروتينات (بما في ذلك شظايا وظيفية منها مثل النسخ المقطوعة) التي يمكن التعبير عنها كما هو موضح في هذه الوثيقة فيبرينوجين، بروثرومبين، عامل الأنسجة، العامل V، العامل VII، العامل VIII، العامل IX، العامل X، العامل XI، العامل XII (عامل هاجمان)، العامل XIII (عامل تثبيت الفيبرين)، عامل فون ويلبراند، بريكاليكربين، كينينوجين مرتفع الوزن الجزيئي (عامل فيتزجيرالد)، فبرونيكتين، مضاد الثرومبين 3، العامل المساعد هيبارين 2، البروتين C، البروتين S، البروتين Z، مثبط بروتيياز مرتبط بالبروتين Z، بلازمينوجين، مضاد ألفا 2- بلازمين، منشط بلازمينوجين للنسيج، يوروكيناز، مثبط منشط البلازمينوجين 1-، مثبط منشط البلازمينوجين 2-، جلوكوسيربوسيداز (GBA)، α -جالاكتوسيداز (GLA) A، إيدورونات سلفاداز (IDS) إيدورونيداز (IDUA) وسفينوجوميليناز حمضي (SMPD1)، MMAA، MMAB، MMACHC، MMADHC (C2orf25)، MTRR، LMBRD1، MTR، بروبيونيل CoA-كربوكسيلاز (PCC) (PCCA) و/أو وحدات PCCB الفرعية)، ناقل بروتين جلوكوز 6-فوسفات (G6PT) أو مستقبل جلوكوز 6-فوسفاتاز (G6Pase)، مستقبل (LDLR) LDL، ApoB، PCSK9، LDLRAP-1، بروتين صبغي متقدر مثل NAGS (N-أسيتيل جلوتامات سينثيتاز)، CPS1 (سينثيتاز فوسفات كربامويل I)، و OTC (أورنيثين ترانسكربيميلاز)، ASS (سينثيتاز حمض أرجينينوسكسينيك)، ASL (أرجينينوسكسيناز حمض لياز) و/أو ARG1 (أرجيناز)، و/أو حامل مادة مذابة من المجموعة 25 (SLC25A13)، مادة حاملة أسبارتات/جلوتامات)، UGT1A1 أو UDP، عديد ببتيد جلوكورونوسيل ترانسفيراز A1، فيوماريل أسيتوأسيتات هيدرولياز (FAH)، بروتين آلانين جليكوكسيلاز أمينو ترانسفيراز (AGXT)، بروتين جليكوكسيلاز ريديكتاز/هيدروبوروفات ريديكتاز (GRHPR)، بروتين ترانسرتين (TTR)، بروتين ATP7B، بروتين فينيل آلانين هيدروكسيلاز (PAH) phenylalanine hydroxylase، وليبوبروتين لياز (LPL) lipoprotein lyase، ونيوكلاز nuclease معدل وراثياً، وعامل نسخ معدل وراثياً و/أو جسم مضاد علاجي فردي السلسلة therapeutic single chain antibody .
- في تجسيدات معينة، يمكن أن يشتمل الجين المعدل وراثياً على جين مرقم marker genes (كما هو موضح أعلاه)، مما يسمح باختيار الخلايا التي خضعت لعملية تكامل مستهدفة ومتوالية

مرتبطة تشفر وظيفة إضافية. تتضمن الأمثلة غير المقيدة للجينات المرقمة marker genes GFP، مرقم (مرقمات) اختيار عقار وما شابه ذلك.

يمكن أيضًا استخدام البنى الموصوفة في هذه الوثيقة لتوصيل الجينات المعدلة وراثيًا غير المشفرة. ويمكن أيضا استخدام متواليات تشفر RNAs مضاد لاتجاه النسخ، RNAi، shRNAs و RNAs دقيق (miRNAs) للولائج المستهدفة. 5

في تجسيدات معينة، يشتمل الجين المعدل وراثيًا على متواليات (على سبيل المثال، متواليات التشفير، يشار إليها أيضًا بالجينات المعدلة وراثيًا) طولها أكبر من 1 كيلو قاعدة، على سبيل المثال بين 2 و 200 كيلو قاعدة، بين 2 و 10 كيلو قاعدة (أو أية قيمة بينهما). يمكن أن يتضمن الجين المعدل وراثيًا واحد أو أكثر من مواقع استهداف نيوكلاز.

10 عند دمج (على سبيل المثال، عبر دمج بواسطة نيوكلاز)، يمكن إدراج الجين المعدل وراثيًا في جين داخلي بحيث يتم التعبير عن كل، بعض أو لا يتم التعبير عن الجين الداخلي.

إنزيمات نيوكلاز Nucleases

كما لوحظ أعلاه، يمكن الاحتفاظ بمجموعات التعبير يصبوغياً أو يمكن دمجها في جينوم الخلية. يمكن أن يكون الدمج عشوائياً. بشكل مفضل، يتم استهداف دمج بنية (بنى) الجين المعدل وراثيًا بعد انشطار الجين المستهدف بواسطة واحد أو أكثر من إنزيمات نيوكلاز (على سبيل المثال، 15

إنزيمات نيوكلاز على شكل إصبع زنك zinc finger nucleases ("ZFNs")، TALENs، CRISPR/Cas، TtAgo أنظمة نيوكلاز، و إنزيمات إندونيوكلاز داخلية) والبنية المدمجة بواسطة أي إصلاح موجه متجانس HDR) homology directed repair (أو بواسطة احتجاز نهائي أثناء العمليات المدفوعة بالارتباط الطرفي غير المتجانس non-homologous end joining (NHEJ). انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم : 20

8,956,828؛ 9,150,847؛ 9,005,973؛ 9,045,763؛ 9,200,266؛ 9,255,250
868؛ 8,703,489؛ 8,586,526؛ 6,534,261؛ 6,599,692؛ 6,503,717
7,914,796؛ 7,972,854؛ 7,888,121؛ 7,262,054؛ 7,067,317؛ 6,689,558

8,945, 7,951,925؛ 8,110,379؛ 8,409,861؛ نشرات براءة الاختراع الأمريكية رقم
20030232410؛ 20050208489؛ 20050026157؛ 20050064474؛
20060063231؛ 20080159996؛ 201000218264؛ 20120017290؛
20110265198؛ 20130137104؛ 20130122591؛ 20130177983؛
5 20130196373 و 20150056705، التي يتم إدراج الكشف عنها كمرجع بأكملها لكل
الأغراض.

يمكن استخدام أي نيوكلاز للدمج المستهدف لبنية التعبير عن الجين المعدل وراثيًا.
في تجسيدات معينة، يشتمل النيوكلاز على نيوكلاز على شكل إصبع زنك (ZFN)، يشتمل على
نطاق ربط DNA- على شكل إصبع زنك ونطاق انشطار (نيوكلاز). انظر، على سبيل المثال،
10 براءة الاختراع الأمريكية رقم

9,255,250؛ 9,200,266؛ 9,045,763؛ 9,005,973؛ 9,150,847؛ 8,956,828؛
8,945,868؛ 8,703,489؛ 8,586,526؛ 6,534,261؛ 6,599,692؛ 6,503,717؛
6,689,558؛ 7,067,317؛ 7,262,054؛ 7,888,121؛ 7,972,854؛ 7,914,796؛
8,409,861؛ 8,110,379؛ 7,951,925.

15 في تجسيدات أخرى، يشتمل النيوكلاز على TALEN، يشتمل على نطاق ربط DNA بالمؤثر
TAL- ونطاق انشطار (نيوكلاز). انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم
8,586,526 ونشرة براءة الاختراع الأمريكية رقم 20130196373.

في تجسيدات آخر أيضاً، يشتمل النيوكلاز على نظام نيوكلاز CRISPR/Cas، يتضمن RNA
دليلي فردي للتعرف على الموقع المستهدف وواحد أو أكثر من نطاقات انشطار. انظر، على سبيل
20 المثال، نشرة براءة الاختراع الأمريكية رقم 20150056705. في بعض النماذج، يتم استخدام نظام
CRISPR-Cpf1 (انظر (Fagerlund et al, (2015) Genom Bio 16:251). يتم إدراك
أن المصطلح نظام "CRISPR/Cas" يشير إلى كل من CRISPR/Cas وأنظمة
CRISPR/Cfp1.

يمكن أن تكون نطاقات انشطارات إنزيمات نيوكلاز من النوع غير المعالج أو المطفر، تتضمن نطاقات انشطارات غير طبيعية الحدوث (معدلة وراثياً) تُشكل دايمرات غير متجانسة اجبارية. انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 8,623,618؛ 7,888,121؛ 7,914,796؛ و 8,034,598 ونشرة براءة الاختراع الأمريكية رقم 20110201055.

- 5 يمكن أن يشكل إنزيم (إنزيمات) النيوكلاز واحدة أو أكثر من القطع مزدوجة الجديلة و/ أو فردية الجديلة في الموقع المستهدف. في نماذج معينة، يشتمل النيوكلاز على نطاق انشطارات غير نشط حفزياً (على سبيل المثال، بروتين FokI و/ أو Cas). انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 8,703,489؛ 9,200,266 و Guillinger et al. (2014) Nature و Biotech. 32(6):577-582. يمكن أن يعمل نطاق انشطارات غير نشط حفزياً، في توليفة مع نطاق نشط حفزياً بمثابة نيكاز لتشكيل قطع فردي الجديلة. بالتالي، يمكن استخدام اثنين من إنزيمات نيكاز في توليفة لتشكيل قطع مزدوج الجديلة في منطقة محددة. تُعرف أيضاً إنزيمات نيكاز إضافية في المجال، على سبيل المثال، McCaffery et al. (2016) Nucleic Acids .Res. 44(2):e11. doi: 10.1093/nar/gkv878. Epub 2015 Oct 19
- 10 في تجسيديات معينة، يسبب النيوكلاز انشطارات جين إيواء آمن (على سبيل المثال، CCR5، Rosa، ألبومين، AAVS1، وما إلى ذلك انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 8,409,861؛ 8,110,379؛ 7,951,925؛ 7,914,796؛ 7,972,854؛ 7,888,121؛ 8,586,526؛ نشرات براءة الاختراع الأمريكية رقم 20030232410؛ 20050208489؛ 20050026157؛ 20060063231؛ 20080159996؛ 201000218264؛ 20130122591؛ 20130137104؛ 20110265198؛ 20120017290
- 15 في تجسيديات مفضلة، يسبب النيوكلاز انشطارات جين ألبومين داخلي بحيث يتم دمج مجموعة التعبير في موقع ألبومين داخلي من خلية الكبد. يتم وصف إنزيمات نيوكلاز محددة بألبومين، على سبيل المثال، في براءة الاختراع الأمريكية رقم 9,150,847؛ ونشرات براءة الاختراع الأمريكية رقم 20130177983 و 20150056705.
- 20

التوصيل

- يمكن توصيل البنى الموصوفة في هذه الوثيقة (و/ أو إنزيمات نيوكلاز) في الجسم الحي أو خارج الجسم الحي بواسطة أية طرق مناسبة في اي نوع خلية، بشكل مفضل إلى الكبد (التوصيل الكبدي). بالمثل، عند استخدامه في توليفة مع إنزيمات نيوكلاز لدمج مستهدف، يمكن توصيل إنزيمات نيوكلاز في صورة عديد نيوكلوديد و/ أو بروتين، على سبيل المثال باستخدام ناقل (نواقل) غير فيروسي، ناقل (نواقل) فيروسي و/ أو في صورة RNA، على سبيل المثال، مثل mRNA. 5
- تتضمن طرق توصيل غير فيروسي لأحماض نيوكليك الفصل الكهربائي، حقن دهني، حقن دقيق، مدافع جينية، جسيمات فيروسيّة، جسيمات حال، جسيمات حالة مناعية، جسيم نانوي آخر، عديد كاتيون أو لبييد: مترافقات حمض نيوكليك، DNA مكشوف، جسيمات حموية صناعية، و 10
- امتصاص مُحسن بعامل ل DNA. يمكن أيضاً استخدام التعرض الخلوي للموجات الصوتية، على سبيل المثال، باستخدام نظام Rich-Mar Sonitron 2000 لتوصيل أحماض نيوكليك. تتضمن أنظمة توصيل حمض نيوكليك توضيحية إضافية تلك المتوفرة بواسطة AmaxaBiosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)، أنظمة التوصيل الجزيئية BTX (Holliston, MA) و Copernicus Therapeutics Inc. (انظر على سبيل المثال براءة الاختراع الأمريكية رقم 6008336). 15
- في تجسيدات مفضلة، تشتمل بنى التعبير على نواقل AAV. يمكن إعطاء إنزيمات نيوكلاز الاختيارية في صورة mRNA أو باستخدام واحد أو أكثر من نواقل فيروسيّة (AAV، Ad، وما إلى ذلك). يمكن أن يرد الإعطاء بأية طريقة يتم فيها توصيل عديدات النيوكلوديد إلى الخلايا المستهدفة المطلوبة. يتم وصف كل من الطرق في الجسم الحي وخارج الجسم الحي. يُعد الحقن في الوريد إلى الوريد البائي طريقة مفضلة للإعطاء. تتضمن أوضاع إعطاء أخرى في الجسم الحي، على سبيل المثال، الحقن المباشر في فصوص الكبد أو القناة الصفراوية والحقن في الوريد البعيد إلى الكبد، بما في ذلك من خلال الشريان الكبدي، الحقن المباشر في لحمة الكبد، الحقن عبر الشريان الكبدي، و/ أو حقن ارتجاعي من خلال الشجرة الصفراوية. تتضمن أوضاع الإعطاء خارج الجسم الحي النقل في المختبر الخلايا الكبدية المقطوعة أو خلايا أخرى للكبد، يليها تسريب الخلايا الكبدية المقطوعة المنقولة مرة أخرى في الوعاء البوابي، لحمة الكبد أو الشجرة الصفراوية لمريض 20
- 25

انسان، انظر على سبيل المثال، Grossman et al., (1994) Nature Genetics, 6:335-341.

- 5 في الأنظمة التي تتضمن توصيل أكثر من عديد نيوكلوديد واحد (على سبيل المثال، بنية مثل الموصوفة في هذه الوثيقة ونيوكلاز في صورة عديد نيوكلوديد)، يتم توصيل الاثنين أو أكثر من عديد (عديدات) نيوكلوديد باستخدام واحد أو أكثر من النواقل المتشابهة و/ أو المختلفة. على سبيل المثال، يمكن توصيل النيوكلاز في صورة عديد النيوكلوديد في صورة mRNA والبنى المحددة للكبد مثل الموصوفة في هذه الوثيقة عبر طرق أخرى مثل نواقل فيروسية (على سبيل المثال، AAV)، بلازميدات الحمض النووي دائرية صغيرة، بلازميد الحمض النووي، الحمض النووي خطي، جسيمات حالة، جسيمات نانوية وما شابه ذلك.
- 10 يتم تحديد مواد حاملة مقبولة صيدلانياً جزئياً بواسطة التركيبة المعينة المراد إعطائها، وكذلك بواسطة الطريقة المعينة المستخدمة لإعطاء التركيبة. وفقاً لذلك، يوجد يوجد مجموعة متنوعة من الصيغ المناسبة للتركيبات الصيدلانية المتاحة، على النحو الموصوف أدناه (انظر، على سبيل المثال، Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989).
- 15 تتنوع الكمية الفعالة لمجموعة التعبير (إنزيم (إنزيمات) نيوكلاز اختيارية، و/ أو خلايا معدلة المراد إعطائها من مريض لآخر. وفقاً لذلك، يتم بصورة أفضل تحديد الكميات الفعالة بواسطة الطبيب الذي يقوم بإعطاء التركيبات (على سبيل المثال، الخلايا) ويمكن تحديد الجرعات الملائمة بسهولة بواسطة واحد من ذوي المهارة العادية في المجال. يمكن أن يحدد تحليل المصل، البلازما أو مستويات نسيج أخرى من عديد الببتيد العلاجي والمقارنة بالمستوى الأولي قبل الإعطاء ما إذا كانت الكمية المراد إعطائها منخفضة جداً، ضمن النطاق الصحيح أو مرتفعة جداً. تعتبر النظم المناسبة للإعطاء الأولي والتالي متنوعة أيضاً، ولكن يتم توضيحها بواسطة إعطاء أولي يليه الإعطاء التالي عند الضرورة. يمكن إعطاء مرات الإعطاء التالية عند فواصل متغيرة، تتراوح من يومياً إلى سنوياً إلى عدة سنوات. يدرك أحد المهرة في المجال أن التقنيات الملائمة الكابتة للمناعة موصى بها لتجنب تثبيط أو إعاقة النقل بواسطة الكبت المناعي لنواقل التوصيل، انظر على سبيل المثال، Vilquin et al., (1995) Human Gene Ther., 6:1391-1401.

تتضمن صيغ الإعطاء في كل من خارج الجسم الحي وفي الجسم الحي معلقات (على سبيل المثال، خلايا معدلة جينياً، جسيمات حالة أو جسيمات نانوية) في سائل أو سائل مستحلبة. يتم غالباً خلط المكونات النشطة مع سواغات مقبولة صيدلانياً ومتوافقة مع المكون النشط. تتضمن السواغات المناسبة، على سبيل المثال، ماء، محلول ملحي، دكستروز، جليسيرول، إيثانول أو ما شابه ذلك، وتوليفات منها. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تحتوي التركيبة على كميات طفيفة من المواد المساعدة، مثل عوامل الترطيب أو الاستحلاب، عوامل تنظيم الرقم الهيدروجيني، عوامل التثبيت أو كواشف أخرى تعزز فعالية التركيبة الصيدلانية.

التطبيقات

10 ترد الطرق والتركيبات التي تم الكشف عنها في هذه الوثيقة لتوفير علاجات لأي مرض بواسطة توفير الجين المعدل وراثياً الذي يعبر عن منتج غير موجود أو ناقص في المرض أو يعالج بخلاف ذلك أو يقي من المرض. يمكن تعديل الخلية في الجسم الحي أو يمكن تعديلها خارج الجسم الحي وإعطائها بعد ذلك لخاضع. بالتالي، توفر الطرق والتركيبات علاج و/ أو الوقاية من هذه الأمراض الوراثية.

15 تتضمن الأمثلة التالية نماذج توضيحية من الكشف الحالي يشتمل فيها النيوكلاز المستخدم اختياريًا على نيوكلاز على شكل إصبع زنك (ZFN). يتم إدراك أن هذا يرد لغرض التوضيح فقط وأنه يمكن استخدام إنزيمات نيوكلاز أخرى، على سبيل المثال TALENs، نظم CRISPR/Cas، إنزيمات إندو نيوكلاز داخلية (إنزيمات ميجا نيوكلاز) بنطاقات ارتباط ب-DNA معدلة وراثياً و/ أو اندماجات نطاقات الارتباط ب-DNA لإنزيمات إندو نيوكلاز (إنزيمات ميجا نيوكلاز) داخلية طبيعية الحدوث معدلة وراثياً ونطاقات انشطار غير متجانسة و/ أو اندماجات إنزيمات ميجا نيوكلاز وبروتين TALE. بالإضافة إلى ذلك، يتم إدراك أن بنى التعبير كما تم وصفها في هذه الوثيقة يمكن حملها على نواقل أخرى (بخلاف AAV) لإنتاج نفس النتائج في علاج و/ أو الوقاية من الاضطرابات التي يسببها نقص إنتاج البروتين.

الأمثلة

المثال 1: الطرق

بنى DNA

يتم وصف الهيكل الإجمالي والمنهج المتبع لتطوير البنى التوضيحية التي تحمل العامل البشري cDNA VIII في الشكل 1. تتضمن البنى محسن محدد للكبد، مُحسن محدد للكبد، إنترون اختياري، متواليات عازلة والجين المعدل وراثيًا (على سبيل المثال، جين معدل وراثيًا تم فيه إلغاء النطاق B للعامل البشري محسن بواسطة كودون VIII)، متوالية إدخال بولي أنيلين تخليقي، فواصل 5 ووحدات متكررة طرفية مقلوبة 5' / 3'. تم تجميع كل البنى باستخدام طرق تشكيل نسيلة حيوية جزئية روتينية.

على النحو الموضح في الشكل 1، تم اتباع العديد من الخطوات أثناء تطور الناقل. قمنا في البداية بفحص تأثير مكونات البنية على الناتج الفيروسي الذي تم الحصول عليه أثناء التصنيع. تم استكشاف تأثير المتوالية من المناطق العازلة في البنى بواسطة استخدام 3 متواليات اختلاف عازلة ممكنة، على النحو الموضح: Ins1: GGAACCATGGCCACCTTCA (المتوالية رقم: 28)، Ins2: CTATCCATTGCACTATGCT (المتوالية رقم: 29)، و Ins3: 5' TTCCTGTAACGATCGGG (المتوالية رقم: 30). ثم تم إدراج المناطق العازلة في مجموعة التعبير عن الجين المعدل وراثيًا حيث كان العازل المستخدم بين المتوالية ITR 5' وبداية متوالية المحسن/المُحسن دائماً عبارة عن Ins1. مع ذلك، عند الطرف 3' للبنى، تم ربط أي من متواليات Ins2 أو Ins3 بمتوالية SPA51 عديد A التخليقية (5')

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTT

، (المتوالية رقم: 31) على النحو التالي: Ins2-SPA51: 5'

ATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTT

20 TATCCATTGCACTATGCT، المتوالية رقم: 32، و Ins3-SPA51: 5'

AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTT

TTCCTGTAACGATCGGG، المتوالية رقم: 33. في بعض النماذج، يتم ربط Ins4 بـ

.SPA51

تم أيضاً استخدام متغيرات المتوالية Ins في بنى التعبير حيث تم استبدال منطقة مُحسن 25 SerpE-TTRm-MVM بمُحسن كبد هجين (HLP, McIntosh et al, ibid). يتم توضيح

هذه البنى في الشكل 2. ثم تم حزم هذه البنى في جسيمات AAV2/6 باستخدام خلايا HEK293 حيث تكون النتائج من 2 مصانع الخلية (Yuan et al., (2011) Hum Gene Ther., 22, 613-624, 2011). وُجد أن الناتج (جينومات الناقل) للبنى التي تحتوي على المتواليات العازلة المعدلة تقريباً 3 أضعاف أكبر للبنية التي تشتمل على منطقة المُحسن الأصلي حيث كانت مجموعة التعبير بجوار المناطق العازلة Ins1 و Ins3 عند الأطراف 5' و 3'، على الترتيب (الشكل 3). بالإضافة إلى ذلك، تم أيضاً إدراج هذه المتواليات العازلة في البنى CRMSBS1 و CRMSBS2 المعدلة الموصوفة أدناه في الخطوة 2 (الأشكال 19 و 20)، واختبارها للناتج الفيروسي (الشكل 22). أوضحت البيانات تحسن يبلغ 8-10 أضعاف في الناتج الفيروسي للبنية الجديدة مقارنةً بالبنية الأصلية.

- 10 في الخطوة 2، تم إدخال طفرات إلى نقطة معينة في مُحسن سيربين 1 لإنشاء لأول اثنين من نواقل المشتق CRMSBS1 و CRMSBS2 (الشكل 4). تختلف هذه النواقل في المتواليات المحسنة لها حيث تم إدخال طفرات إلى نقطة معينة على النحو الموضح في الشكل 5. تشتمل التغييرات المحددة التي تمت على ما يلي: لـ CRMSBS1، يُشار إليها بـ 1، 2، 3، و 4 على النحو الموصوف في الشكل 5 تم إجراء الاستبدالات التالية، على الترتيب: $G = 1$ إلى A ، $2 = C$ إلى G ، $3 = T$ إلى C و $4 = G$ إلى A . بالمثل، لـ CRMSBS2، تم تعديل المواضع 1، 3، 4 و 5 على النحو التالي: $G = 1$ إلى A ، $3 = T$ إلى C ، $4 = G$ إلى A و $5 = C$ إلى T .
- 15 في الخطوة 3، تم تشكيل البنى لفحص متواليات الإنترون في الناقل. على النحو الموضح في الأشكال 6 و 7، تم تعديل متواليات الإنترون في نواقل CRMSBS2 و CRMSBS2 بواسطة إزالة الإنترون MVM ("CRMSBS1 لا يوجد إنترون"، الشكل 6، و "CRMSBS2 لا يوجد إنترون"، الشكل 7). في صورة متغيرة أخرى، تم اختبار متواليات إنترون خيمرية T- ("إنترون خيمري CRMSBS1 T-"، الشكل 6، و "إنترون خيمري CRMSBS2 T-"، الشكل 7).
- 20 للخطوة 4، تمت التغييرات على إنترون MVM من خلال إدخال الطفرات المستهدفة عند مانح الجدل ومواقع مستقبل. يتم توضيح خرائط هذه النواقل في الشكل 10، حيث يُشار إلى الإنترونات المتغيرة بـ إنترون SBR 1-3. يشتمل الإنترون MVM على اثنين من مواقع المانح الممكنة واثنين من مواقع المستقبل الممكنة من هذه الموانح (انظر الشكل 11 للتوضيح). في الشكل 11، تتم
- 25

الإشارة إلى اثنين من المواقع المانحة بـ D1 و D2، ويتم توضيح مواقع المستقبل الناظرة لها بـ A1 و A2. يتم توضيح فواصل الجديلة المتكونة بواسطة جديلة من D1-A1 و D2-A2 على الجين في صورة خطوط نقطية. يتم توضيح متوالية جزئية من إنترون MVM تحت الجين في الشكل 11 (تطابق المتوالية رقم: 14) ويتم توضيح موقع (تحت خط) متوالية المحسن الإلكتروني (IES) وكذلك مواقع المستقبلات A1 و A2 (Haut and Pintel, (1998) J Virol, 72:1834-).
5
Haut and Pintel, (1998) Virol J, 258:84-94). تم تصميم 3 إنترونات للاختبار، ويتم توضيح هذه في الشكل 10، ويشار إليها بإنترون SBR 1-3 (متواليات الإنترون الموضحة في المتوالية رقم: 15-17). تم أيضاً تقييم نشاط hFVIII الذي تم التعبير عنه وتوصيله بواسطة AAV F8 cDNA في المختبر. تمت إضافة AAV2/6 F8 cDNA (CRMSBS2) إلى خلايا HepG2 عند جرعات من جينومات ناقل 10×4.8 + 06،
10
SBR الإنترون 3) إلى خلايا HepG2 عند جرعات من جينومات ناقل 10×4.8 + 06، 06+ 10×2.4، 06+ 10×1.2، و 06+ 10×0.6 /ملييلتر لكل خلايا 10×1 + 05 في طبق به 24- عين (يُشار إليه بالزمن، الأيام t0). تم تحليل المواد الطافية لمستويات hFVIII التي تم إفرازها بواسطة ELISA، والنشاط بواسطة اختبار تجلط APTT واختبار نشاط توليد اللون عند 7 أيام (t7) بعد إضافة الفيروس AAV2/6- (للطرق، انظر أدناه). أوضحت النتائج (الشكل 21) توافق جيد بين مستويات hFVIII الذي تم إفرازه. تشمل البيانات على عدد = 6 نسخ حيوية. تمثل
15
قضبان الخطأ المعياري لمتوسط النسخ.

ثم تم اختبار هذه البنى في الجسم الحي على النحو الموصوف أدناه.

تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) polymerase chain reaction (PCR) -كمي

qRT-PCR (لمستويات العامل البشري VIII mRNA): تم تحليل نسيج الفأر باستخدام
20
FastPrep وقالب التحليل D (MP Biomedicals, Santa Ana CA) وفق تعليمات المصنع. تم عزل RNA/DNA من نسيج فأر باستخدام طاقم AllPrep DNA/RNA وفق تعليمات المصنع (Qiagen, Carlsbad CA). ثم تم استخدام RNA المستخلص لتشكيل cDNA باستخدام طاقم التخليق Quantitect cDNA (Qiagen, Carlsbad CA). ثم تم تنفيذ PCR كمي باستخدام مسبارات SsoAdvanced Universal Supermix (Biorad, Hercules) على 96 CFX Biorad باستخدام اختبارات بادئ مرقم/ مسبار من IDT (Coralville)
25
CA) على 96 CFX Biorad باستخدام اختبارات بادئ مرقم/ مسبار من IDT (Coralville)

- (IA). كان اختبار GAPDH للفأر عبارة عن Mm.PT.39a.1. لكشف محدد عن العامل البشري VIII mRNA كان اختبار البادئ/المسبار اعتيادياً؛ بادئ أمامي (GGAGATGAAGAAGGAGGACTTTG) (المتوالية رقم: 18)، مسبار (ACATCTACGACGAGGACGAGAACCA) (المتوالية رقم: 19) وبادئ عكسي (TCCACAGCAGCAATGAAGTAG) (المتوالية رقم: 20). تم استخدام qRT-PCR كمي (غير مطلق) مع التعادل مع GAPDH لكل عينة، وذكُرت تحليلات البيانات النهائية بالنسبة لإحدى عينات الفأر التي تم ضبطها إلى 1,0. لم يتم تشغيل عينة مقارنة قالب وبدون عينات نسخ عكسية مع كل العينات ولم تنتج إشارة قابلة للكشف.
- 5
- تم تحليل qPCR (الجينوم ناقل، تحليلات VG): تم تحليل نسيج الفأر باستخدام FastPrep و قالب تحليل D (MP Biomedicals, Santa Ana CA) وفق تعليمات المصنع. تم عزل RNA/DNA من نسيج الفأر باستخدام طاقم AllPrep DNA/RNA وفق تعليمات المصنع (Qiagen, Carlsbad CA). تم استخدام DNA المستخلص المستخدم لـ PCR كمي باستخدام TaqMan Fast Universal PCR Master Mix، بدون AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA) على نظام PCR في الزمن الفعلي AB 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA). للكشف المحدد عن العامل البشري VIII كان اختبار البادئ/المسبار اعتيادياً؛ بادئ أمامي (CCTGGGCCAGTTCCTGCT) (متوالية رقم: 21)، مسبار (TTCTGCCACATCAGCAGCCACCA) (المتوالية رقم: 22) وبادئ عكسي (GGCCTCCATGCCATCATG) (المتوالية رقم: 23). لم يتم تشغيل عينة مقارنة قالب ومع كل العينات ولم تنتج إشارة قابلة للكشف. تم توليد منحني qPCR DNA العياري من 7 محاليل تخفيف، تسلسلية 4 أضعاف من كمية معروفة من بلازميد، العامل البشري النقي الخطي VIII. تم عزل qPCR (الدمج مستهدف بواسطة NHEJ باستخدام خلايا HepG2 DNA) - من خلايا HepG2 بشرية باستخدام QIAamp DNA دقيق وفق تعليمات المصنع (Qiagen, Carlsbad CA). ثم تم تنفيذ PCR كمي باستخدام مسبارات SsoAdvanced Univesal Supermix (Biorad, Hercules CA) على Biorad CFX 96 باستخدام اختبارات بادئ مرقم/مسبار من IDT (Coralville IA). كان اختبار GAPDH البشري عبارة عن
- 10
- 15
- 20
- 25

- NHEJ Hs.PT.39a.22214836. لكشف محدد عن دمج مستهدف لعامل VIII بشري بواسطة NHEJ عند موقع الألبومين البشري الداخلي كان اختبار البادئ/ المسبار اعتيادياً؛ بادئ أمامي (AGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACT) (المتوالية رقم: 24)، مسبار
- (CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT) (المتوالية رقم: 25) وبادئ عكسي (CCTGAAGGTGGCAATGGT) (المتوالية رقم: 26). لأغراض هذه الدراسة استخدمنا qPCR كمي (غير مطلق) مع التعادل مع GAPDH لكل عينة، وذكُرت تحليلات البيانات النهائية بالنسبة لإحدى عينات الفأر التي تم ضبطها إلى 1,0. لم يتم تشغيل عينة مقارنة قالب وبدون عينات مقارنة نسخ وبدون عينات مقارنة ZFN ولم تنتج إشارة قابلة للكشف.
- تم تحليل qPCR (الدمج مستهدف بواسطة NHEJ و HDR من أنسجة الفأر) - نسيج الفأر باستخدام FastPrep وقالب تحليل D (MP Biomedicals, Santa Ana CA) وفق تعليمات المصنع. تم عزل RNA/DNA من نسيج الفأر باستخدام طاقم AllPrep DNA/RNA وفق تعليمات المصنع (Qiagen, Carlsbad CA). ثم تم تنفيذ PCR كمي باستخدام مسبارات Biorad CFX (Hercules CA, Biorad) SsoAdvanced Universal Supermix على 96 باستخدام اختبارات بادئ مرقم/ مسبار من IDT (Coralville IA). كان اختبار GAPDH للفأر عبارة عن Mm.PT.39a.1. للكشف المحدد عن عامل دمج بشري مستهدف 8 cDNA بواسطة NHEJ عند موقع ألبومين الفأر الداخلي كان اعتيادياً اختبار البادئ/ المسبار؛ بادئ أمامي (GTGTAGCAGAGAGGAACCATT) (المتوالية رقم: 39)، مسبار (CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT) (المتوالية رقم: 40) وبادئ عكسي (GTTAATATTCACCAGCAGCCT) (المتوالية رقم: 41). للكشف المحدد عن دمج مستهدف ZFNs بواسطة NHEJ عند موقع ألبومين الفأر الداخلي كان اختبار البادئ/ المسبار اعتيادياً؛ بادئ أمامي (AGTG TAGCAGAGAGGAACCA) (المتوالية رقم: 42)، مسبار (CCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCT) (المتوالية رقم: 43) وبادئ عكسي (CAGGGTGAGCCCAGAAAC) (المتوالية رقم: 44). للكشف المحدد عن عامل دمج مستهدف بشري 8 بواسطة HDR عند موقع ألبومين الفأر الداخلي كان اختبار البادئ/ المسبار اعتيادياً؛ بادئ أمامي (AACTTTGAGTGTAGCAGAGAGG) (المتوالية رقم: 45)،

مسبار (TACCGGAGGAGCAAACAGGGACTA، المتوالية رقم: 46) وبأدنى عكسي (CTCTACGAAATGTGCAGACAGA، المتوالية رقم: 47). لأغراض هذه الدراسة استخدمنا qPCR كمي (غير مطلق) مع تحليلات البيانات النهائية المذكورة بالنسبة لعينة واحدة تم ضبها إلى 1,0. لم يتم تشغيل عينة مقارنة قالب وبدون عينات مقارنة نسخ وبدون عينات مقارنة ZFN 5 ولم تنتج إشارة قابلة للكشف.

تم تحليل Indel (الإدراجات والحذف) - نسيج الفأر باستخدام FastPrep وقالب تحليل D (MP Biomedicals, Santa Ana CA) وفق تعليمات المصنع. تم عزل RNA/DNA من نسيج الفأر باستخدام طاقم AllPrep DNA/RNA وفق تعليمات المصنع (Qiagen, Carlsbad CA). تم استخدام DNA المستخلص لـ PCR وتشكيل عميق لمتوالية لقياس indels عند موقع ألبيومين الفأر. 10

البلازما - تم جمع الدم من جميع الفئران في أيام 7، 14 و 21 (غير طرفي) واليوم 28 أو أطول كما هو موضح (طرفي) لدراسات C57BL/6. تم جمع الدم من كل الفئران في الأيام 8، 14، 21، 28، 35 و 42 (غير طرفي) لدراسات سيولة الدم أ في الفئران. تم جمع كل الدم في أنابيب تحتوي على سيترات صوديوم ومعالجتها إلى البلازما. تم جمع مجموعات الدم غير الطرفية عن طريق الوريد تحت الفك السفلي أو الجيوب المدارية الارتجاعية. تم جمع مجموعات الدم في وقت الذبح عن طريق ثقب في القلب أو الوريد الأجوف. تم فصل البلازما وتخزينها عند -60 إلى -80 درجة مئوية حتى يتم استخدامها في اختبار ELISA أو اختبار نشاط Chromogenix Coamatic الموضح أدناه. 15

الكبد - بالنسبة لدراسات C57BL/6، تمت ذبح الفئران في اليوم 28 وتم جمع ووزن الكبد، الطحال، الخصى، الدماغ، القلب، الرئة والكليتين. تم فصل الفص الجانبي الأيسر من الكبد وتقسيمه إلى 3 قطع وتجميده بصورة مفاجئة في النيتروجين السائل بشكل منفصل عن بقية الكبد. تم تجميد فصوص الكبد المتبقية والأنسجة الأخرى (كاملة) في النيتروجين السائل. تم تخزين العينات المجمدة عند -60 إلى -80 درجة مئوية حتى المعالجة لاستخلاص RNA/DNA. 20

في الدراسات المختبرية، HepG2 AAV F8 cDNA/ ZFNs. تم الحفاظ على خلايا الكبد HepG2 البشرية وفقاً لتوجيهات الشركة الصانعة (ATCC, Manassas VA). في يوم التجربة، تم غسل خلايا HepG2 ومعالجتها بتربسين وعدها. تم استخدام ZFNs في موقع إنترون الألبومين البشري، SBS47171 الأيسر و SBS47898 الأيمن. تم توصيل ZFNs مع hF8 cDNA (CRMSBS2 بدون إنترون) في صورة AAV2/6، ويُشار إليه بالزمن صفر. تم توصيل AAV2/6 ZFNs عند $10 \times 3.0 \times 10^5$ ، و AAV2/6 hFVIII cDNA CRMSBS2، بدون إنترون عند $10 \times 3.0 \times 10^4$ ، و $10 \times 6.0 \times 10^4$ ، و $10 \times 1.2 \times 10^5$ لخلايا $10 \times 1 \times 10^5$ لكل عين من طبق به 24 عين. تم تبادل الوسط في اليوم التالي. تم تحليل المواد الطاقية لـ hFVIII الذي تم إفرازه باستخدام hFVIII ELISAs الموضح أدناه عند النقاط الزمنية في الأيام t3، t5 و t7 بعد إضافة فيروس AAV2/6. 5 10

في الدراسات المختبرية، HepG2 AAV F8 cDNA. تم الاحتفاظ بخلايا الكبد HepG2 البشرية وفقاً لتوجيهات الشركة الصانعة (ATCC, Manassas VA). في يوم التجربة، تم غسل خلايا HepG2 ومعالجتها بتربسين وعدها. تم توصيل AAV2/6 hF8 cDNA (CRMSBS2 SBR) بجرعات تبلغ $10 \times 2.4 \times 10^6$ ، $10 \times 1.2 \times 10^6$ ، و $10 \times 6.0 \times 10^6$ (3 إنترون) في عين من طبق به 24 عين. تم تبادل الأوساط عند النقطة الزمنية t3 (=يوم). تم تحليل المواد الطاقية عند النقاط الزمنية t5 و t7 بعد إضافة فيروس t-AAV 2/6 لمستويات hFVIII الذي تم إفرازه باستخدام HFVIII ELISA من Affinity Biologics، وبالنسبة لنشاط hFVIII بواسطة اختبارات اللون والتجلط الموصوفة أدناه. 15

العامل البشري VIII ELISA. Affinity Biologics hFVIII ELISA (من فأر وخلايا HepG2). تم تحديد مستويات العامل البشري الثامن الذي تم إفرازه باستخدام طاقم Affinity (FVIII-AG) ELISA (Biologicals (Canada) وفقاً لبروتوكول التصنيع باستثناء معيار العامل VIII البشري. كان معيار العامل البشري الثامن المستخدم في اختبار ELISA عبارة عن عامل بشري VIII ناتج عن عودة الارتباط الجيني (F0016-06) من US Biologicals (Salem, MA). تمت إضافة بلازما الفأرة لفترة وجيزة إلى الطبق، وحضانتها مع الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة ونصف، يليها الغسل 3 مرات مع غسل المحلول المنظم المتوفر في 20 25

الطاقم. تمت إضافة جسم الكشف المضاد، المتوفر مع الطاقم، وحضانته لمدة خمس وأربعين دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، يليها عملية الغسيل 3 مرات بمحلول الغسل المنظم المتوفر في الطاقم. تمت إضافة ركيزة TMB المتوفرة مع الطاقم والسماح بتطويرها لمدة عشر دقائق. تم إيقاف التفاعل بمحلول إيقاف، وتمت قراءة الامتصاص عند 450 نانومتر باستخدام قارئ طبق.

- 5 hFVIII ELISA داخلي (قرد الرياح). تم تحديد مستويات hFVIII الذي تم إفرازه في البلازما NHP باستخدام ELISA مخصص. تم تغليف أطباق بوليستيرين دقيقة (Corning)، ارتباط مرتفع بنصف المنطقة التي بها 96-عين) طوال الليل عند 4 درجات مئوية مع الجسم المضاد وحيد النسيلة hFVIII من الفأر (Green Mountain, Burlington, VT) في 0,2 مولار من ملول بيكربونات منظم الرقم الهيدروجيني له يبلغ 9.4 (Waltham, Thermo Fisher Scientific)
- 10 (MA). في اليوم التالي تم غسل الأطباق 4 مرات باستخدام TBST واحدة (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA). ثم تم حجب الأطباق التي بها 96 عين لمدة ساعتين عند درجة حرارة الغرفة باستخدام 3% من محلول حجب منظم BSA/ TBS، يليه الغسل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة البلازما إلى الطبق وحضانته مع الهز عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، يليه الغسل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة جسم الكشف المضاد، والجسم المضاد أحادي النسيلة FVIII المعالج ببيوتين (Green Mountain, Burlington, VT) وحضانته لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة، يليها الغسل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة سترينبتايفدين HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) وحضانته لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الغرفة يليه الغسيل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة TMB Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- 20 (MA) وتم السماح بتطويره لمدة 10 دقائق، وتم إيقاف التفاعل باستخدام محلول الإيقاف وقراءة الامتصاص عند 450 نانومتر باستخدام قارئ الطبق. كانت قراءات امتصاص الخلفية ضئيلة (بشكل نمطي صفر).

- اختبار نشاط العامل VIII البشري اللوني. تم تحديد نشاط العامل البشري VIII الذي تم إفرازه في البلازما باستخدام اختبار Diapharma Chromogenic Coamatic للعامل VIII (West Chester, OH) وفقاً لبروتوكول التصنيع باستثناء معيار العامل VIII البشري. كان معيار العامل
- 25

- VIII البشري المستخدم في اختبار ELISA عبارة عن عامل بشري VIII نقي ناتج عن عودة الارتباط الجيني (#F0016-06) من شركة (Salem, MA) US Biologicals.
- اختبار نشاط التجلط. تم تحديد العامل البشري VIII الذي تم إفرازه في المادة الطافية HepG2 (أو البلازما قرد الرياح) باستخدام اختبار زمن ثروموبلاستين الجزئي المنشط activated partial thromboplastin time (aPTT) بواسطة (Boston MA) Diagnostica Stago 5
- وفقاً لبروتوكول الشركة المصنعة باستثناء معيار العامل البشري VIII والبلازما التي ينقصها العامل البشري VIII. كان معيار العامل البشري VIII متشابهاً مع المستخدم في اختبار ELISA (العامل البشري النقي الناتج عن عودة الارتباط الجيني VIII، #F0016-06 من US Biologicals, (Salem, MA) FVIII) كان الكاشف الذي ينقصه FVIII المستخدم في اختبار التخثر عبارة عن FVIII-CD 10 له نشاط عامل VIII > 1% (FVIII ناقص متجمد) من Haematologic (Essex Junction, VT) Technologies, Inc. لفترة وجيزة، تمت إضافة معيار أو عينة إلى وعاء مخبري يحتوي على كرة صلب. تمت إضافة FVIII-CD له نشاط عامل VIII > 1% و PTT Automate متوفر مع الطاقم، حضانتته عند 37 م لمدة 180 ثانية. تمت إضافة STA CaCl₂ المتوفر مع الطاقم إلى التفاعل بينما دخلت الكرة الفولاذية حيز الحركة داخل الوعاء المختبري. تم قياس زمن التجلط من إضافة STA CaCl₂ حتى توقفت حركة الكرة الفولاذية. تم الحضانة وتسجيل الزمن باستخدام وسيلة التحليل Stago Start Hemostasis لهذا الاختبار. 15
- المثال 2: دراسات في الجسم
- فئران من النوع غير المعالج: تم استخدام فئران C57BL/6 بعمر 8 إلى 10 أسابيع للدراسات في الجسم الحي. امتثلت الدراسة لقانون رعاية الحيوان لرعاية الإنسان واستخدام الحيوانات. تمت إذابة مواد الاختبار (بنى تحتوي على فيروسات AAV) عند درجة حرارة الغرفة قبل الجرعات، وتلقت جميع الحيوانات حقنة وحيدة في الوريد single intravenous (IV) تبلغ 200 ميكرو لتر. 20
- يبين الجدول 1 أدناه تصميم الدراسة لاختبار البنى التي تمت دراستها في الجسم الحي في الشكل 8 (تم رسمها في الأشكال 4، 6 و 7). يبين الجدول 2 تصميم الدراسة لاختبار البنى المبينة في الشكل 15. وكانت الجرعات عبارة عن 1.8×10 + 11 جينوم ناقل لكل فأر بلغ تقريباً 7×10 25
- 12+ جينوم ناقل/كجم. تلقت جميع الحيوانات حقنة متابعة داخل الغشاء البريتوني تبلغ 200

ميكرو لتر من سيكلوفوسفاميد cyclophosphamide في اليومين صفر و 14. تم إجراء تجميع للدم غير الطرفية والطرفي كما هو مبين في الجدولين 1 و 2.

الجدول 1: تصميم الدراسة للبنى من الأشكال 4، 6 و 7 (النتائج في الشكل 8).

المجموعة	وصف مادة الاختبار	النمط المصلي	مكمل مناعي	الجرعة	الحجم الإجمالي/فأر (ميكرو لتر)	N/نقطة زمنية تنزف متسلسل (باليوم)				
						7	14	21	28	
1	الصيغة	NA	50 مجم/ كجم	NA	200	6	6	6	6	6
2	الأصلي	AAV2/6	50 مجم/ كجم	10×1.80 11+	200	6	6	6	6	6
3	CRMSBS1	AAV2/6	50 مجم/ كجم	10×1.80 11+	200	6	6	6	6	6
4	CRMSBS1 لا يوجد إنترون	AAV2/6	50 مجم/ كجم	10×1.80 11+	200	6	6	6	6	6

6	6	6	6	6	200	10×1.80 11+	50 /مجم كجم	AAV2/6	CRMSBS1 T- إنترون خيمري	5
6	6	6	6	6	200	10×1.80 11+	50 /مجم كجم	AAV2/6	CRMSBS2	6
6	6	6	6	6	200	10×1.80 11+	50 /مجم كجم	AAV2/6	CRMSBS2 لا يوجد إنترون	7
6	6	6	6	6	200	10×1.80 11+	50 /مجم كجم	AAV2/6	CRMSBS2 T- إنترون خيمري	8
48										

الجدول 2: تصميم الدراسة لبني من الشكل 15

N/نقطة زمنية لنزف متسلسل (باليوم)					الحجم الإجمالي/فأر (ميكرو لتر)	الجرعة	مكمل مناعي	النمط المصلي	وصف مادة الاختبار	المجموعة
28	21	14	7							
4	4	4	4	4	200	NA	50 /مجم كجم	NA	الصيغة	1

4	4	4	4	4	200	10×1.80 11+	50 مجم/ كجم	AAV2/6	الأصلي	2
4	4	4	4	4	200	10×1.80 11+	50 مجم/ كجم	AAV2/6	CRMSBS2	3
4	4	4	4	4	200	10×1.80 11+	50 مجم/ كجم	AAV2/6	CRMSBS2 SBR إنترون 1	4
4	4	4	4	4	200	10×1.80 11+	50 مجم/ كجم	AAV2/6	CRMSBS2 SBR إنترون 2	5
4	4	4	4	4	200	10×1.80 11+	50 مجم/ كجم	AAV2/6	CRMSBS2 SBR إنترون 3	6
24										

تم جمع الدم من جميع الفئران في الأيام 7، 14، 21 (غير طرفي) واليوم 28 (طرفي). تم جمع كل الدم في أنابيب تحتوي على سيترات الصوديوم ومعالجتها إلى البلازما. تم جمع مجموعات الدم غير الطرفية عن طريق الوريد تحت الفك السفلي أو الجيوب المدارية الرجعية. تم جمع مجموعات الدم في وقت الذبح عن طريق ثقب في القلب أو الوريد الأجويف. تم فصل البلازما وتخزينها في - 5 60 إلى -80 درجة مئوية حتى استخدامها في اختبار ELISA الموضح أدناه.

تم ذبح جميع الحيوانات في اليوم 28، وتم جمع ووزن كل من الكبد، الطحال، الدماغ، القلب، الرئة والكلى. تم فصل الفص الجانبي الأيسر من الكبد وتقسيمه إلى 3 قطع وتجميده بصورة

مفاجئة في النيتروجين السائل بشكل منفصل عن بقية الكبد. تم تجميد فصوص الكبد المتبقية والأنسجة الأخرى (كاملة) في النيتروجين السائل. تم تخزين العينات المجمدة عند -60 إلى -80 درجة مئوية حتى المعالجة لاستخلاص RNA/DNA.

5 على النحو الموضح في الأشكال 8 و15، أدت البنى التي تم اختبارها إلى إنتاج الجين المعدل وراثيًا في الجسم الحي (نطاق محذوف للعامل الثامن البشري الذي تم إفرازه) في الجسم الحي في اليوم 7 (الشكل 8أ والشكل 15أ) واليوم 28 (الشكل 8ب والشكل 15ب) بعد الإعطاء. علاوة على ذلك، كما تبين من الشكل 9 و 16، تم التعبير عن الجين المعدل وراثيًا فقط في الكبد وليس أي أنسجة أخرى (الشكل 9أ و 16أ) وينتقل الناقل AAV إلى الخلايا الكبدية في المقام الأول (تحليل توزيع الجينوم الناقل على النحو الموضح في الأشكال 9ب و 16ب). في مجموعات البيانات هذه، 10 تم تحليل العامل البشري mRNA (hFVIII-BDD) VIII-BDD من الأنسجة (الدماغ، القلب، الكلى، الرئة، الكبد، الطحال، الخصية) في الدراسة الممثلة في الجدول 1 بواسطة qRT-PCR كما هو موضح أعلاه في المثال 1. بالإضافة إلى ذلك، تم تحليل توزيع الجينوم الناقل في هذه الأنسجة نفسها من خلال qPCR (انظر المثال 1) وتم توضيح النتائج الموضحة في الأشكال 9ب/ 16ب. توضح هذه البيانات أن الناقل AAV2/ 6 ينتقل بشكل أساسي إلى الكبد.

15 تم اختبار البنى المصممة لفحص فعالية تعديلات الإنترون في الجسم الحي كذلك في الدراسة المبينة في الجدول 2، والبيانات للأيام 7 وعند مستويات الذروة الموضحة في الشكل 15. كما تم تحليل mRNA hFVIII-BDD (الشكل 16أ) وكذلك تم توزيع الجينوم الناقل (الشكل 16ب) وأتضح أن التعبير عن mRNA hF8 كان محدودًا للكبد، وينتقل AAV2/ 6 بشكل أساسي إلى الكبد.

20 وبالتالي، توفر البنى الموصوفة في هذه الوثيقة تعبير قوي عن الجين المعدل وراثيًا بعد الوصول إلى الكبد.

أجريت دراسة إضافية لاختبار ما إذا كانت مستويات hFVIII-BDD التي تمت ملاحظتها في الجسم الحي حساسة للنمط المصلي لـ AAV عند الاستخدام. تم حقن ذكور فئران C57BL/ 6 عن طريق الوريد بـ $10 \times 10 + 10$ جينوم ناقل /فأر (~ $2 \times 10 + 12$ جينوم ناقل/كجم) أو

- AAV2/ 11+ 10×1.8 جينوم ناقل /فأر (~10×7+ 12 جينوم ناقل/كجم) من AAV2/ 5، AAV2/ 6، 8، AAV2/ 9 F8 أو AAV2/ 9 F8 الأصلي cDNA. تم تحقيق النقل إلى الفئران بالنمط المصلي AAV2/ 6، المعروف أنه غير فعال في كبد الفأر النقول إليه، عند 10×6+ 10 جينوم ناقل /فأر (~10×2+ 12 جينوم ناقل/كجم) متوسط قيمة الذروة يبلغ 91,9% +/- SEM 15,5 (عدد = 6) من مستويات البلازما hFVIII الطبيعية في البشر. في جرعة أعلى تمثل ~ 10×7+ 12 جينوم ناقل/كجم تم تحقيق متوسط قيمة ذروة من البلازما hFVIII أكبر من 6 دراسات مستقلة في الجسم الحي للفأر تبلغ 169,2% +/- SEM 10,1 (عدد = 36). وبلغ متوسط مستويات الذروة لـ AAV2/ 8 عند 10×2+ 12 جينوم ناقل/كجم 320% و 323,6% عند 10×6+ 12 جينوم ناقل/كجم. بالنسبة إلى AAV2/ 9 عند 10×2+ 12 جينوم ناقل/كجم، بلغ متوسط مستويات الذروة 389,6% (انظر الشكل 23، كما تتضح النتائج باستخدام AAV2/ 5 و AAV2/ 6).
- أجريت أيضًا دراسات لتحديد ما إذا كانت طريقة الإنتاج المستخدمة لتوليد AAV لها تأثير على التعبير عن hFVIII-BDD الذي يتم تحقيقه في الجسم الحي. تم إعطاء ذكور فئران C57BL/ 6 F8 الأصلي لـ cDNA الأصلي عن طريق الحقن الوريدي (وريدي الذيل) مع 10×1.8+ 11 جينوم ناقل /فأر (~10×7+ 12 جينوم ناقل/كجم) من AAV2/6 F8 الأصلي لـ cDNA الناتج إما من خلايا HEK293 أو Sf9/ rBV (فيروس عصوي ناتج عن عودة الارتباط الجيني). حقق العلاج باستخدام F8 الأصلي لـ cDNA من خلايا HEK293 متوسط قيمة ذروة تبلغ 142,1% ± SEM 8,3% (عدد = 8) (تم قياسه بـ hFVIII ELISA) لمستويات البلازما البشرية العادية FVIII. تم تحقيق مستوى مماثل يبلغ 132,8% ± SEM 18,6% (عدد = 5) (تم قياسه بـ hFVIII ELISA) بعد إعطاء F8 الأصلي لـ cDNA (Sf9/ rBV) إلى الفئران (الشكل 24).
- تم تكرار الدراسات لأغراض المقارنة مع F8 CRMSBS2 SBR لإنترن 3 cDNA (انظر الشكل 10). تم حقن ذكور فئران C57BL/ 6 عن طريق الوريد بـ 10×1.8+ 11 جينوم ناقل /فأر (~10×6+ 12 جينوم ناقل/كجم) من AAV2/6 CRMSBS2 SBR لإنترن 3 cDNA (عدد = 8). يتم توضيح مستويات ذروة hFVIII في بلازما الفئران C57BL/ 6 كما تم قياسه بواسطة hFVIII ELISA (الشكل 25).

سيولة الدم أ في الفئران: تم أيضًا اختبار البنى في نموذج فأر R593A مصاب بسيولة الدم أ (Bril et al (2006) Thromb Haemost 95(2):341-7; Chavez et al., (2012) Hum Gen Ther., 23(4):390). تحمل هذه الفئران تعطيل لجين F8 الفأري الداخلي. بالإضافة إلى ذلك، فهي تحمل جين معدل وراثيًا FVIII-R593C بشري مطفر تحت تحكم مُحسن ألبومين فأري بحيث تعبر عن كميات غير قابلة للكشف من البروتين البشري المطفر ولكن يُعتقد أنها تتحمل التعبير عن FVIII البشري بسبب الكميات الضئيلة لبروتين FVIII R593A المطفر الناتج. كانت السلالة الأصلية عبارة عن FVB ولكن تمت إعادتها إلى فئران C57BL/6 لمدة 5 أجيال على الأقل في مختبر جاكسون. التزمت الدراسة بقانون رعاية الحيوان لرعاية الإنسان واستخدام الحيوانات. تمت إذابة مواد الاختبار في درجة حرارة الغرفة قبل إعطاء الجرعات، وحصلت جميع الحيوانات على حقنة وحيدة في الوريد (IV) تبلغ 200 ميكرو لتر. كانت الجرعات عبارة عن 11+ 10×1.8 جينوم ناقل لكل فأر التي بلغت تقريباً 10×7+ 12 جينوم ناقل/كجم. يتم توضيح تصميم الدراسة أدناه في الجدول 3:

الجدول 3: CRMSBS2 SBR إنترون 3 في فئران طافرة مصابة بسيولة الدم أ

المجموعة	وصف مادة الاختبار	النمط المصلي	مكمل مناعي	الجرعة	الحجم الإجمالي/فأر (ميكرو لتر)	N/نقطة زمنية لنزف								
						متسلسل (باليوم)	8	14	21	28	35	42	Sac	
1	محلول الجرعة المنظم	NA	N/A	N/A	200	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	CRMSBS2 SBR إنترون 3	AAV2/6	N/A	10×1.80 11+	200	6	6	6	6	6	6	6	6	6

تم إجراء الدراسة لمدة 3 أشهر، ويتم توضيح نتائج تمثيلية للدراسة لمدة 3 أشهر، توضح نتائج كل من اليوم 14 واليوم 42 (الشكل 17) أنه تم التعبير عن الجين المعدل وراثيًا FVIII-BDD عند مستويات $< 300\%$ من مستويات البروتين FVIII الموجودة في البلازما البشرية العادية في كلا اليومين 14 (الشكل 17أ) و 42 (الشكل 17ب).

- 5 لاختبار وظيفة والفعالية العلاجية لـ hFVIII في نموذج فأر مصاب بسيولة الدم A، تم استخدام نموذج مقطع مستعرض في وريد الذيل (TVT) tail vein transection. باختصار، تم تخدير الفئران في البداية باستخدام أيزوفلوران، وتم الاحتفاظ بالتخدير عن طريق قناع التخدير لمدة الدراسة. مباشرة بعد حث التخدير، تم وضع الفئران على وسادة تدفئة (ضبطها إلى 37 درجة مئوية) مع جهاز استشعار درجة الحرارة بين المعدة ولوحة التدفئة مع ضمان وضع الرأس بشكل صحيح في قناع التخدير. باستخدام علامة مرقم للقياس، تم تمييز الذيل بقلم مرقم عند الساعة "12:00" مقابل قطر يبلغ 2,5 مم بالضبط حيث أنه بعد ذلك تم غمر الذيل في أنبوب تجميع ملحي (37 درجة مئوية من المحلول الملحي). تم غمر الذيل في درجة حرارة المحلول الملحي لمدة إجمالية تبلغ 10 دقائق قبل حث النزف. ثم تم وضع الذيل في كتلة القطع مع العلامة من "13" تشير إلى "15:00" لمدة 10 ثوان تقريباً قبل إجراء القطع (لتسهيل القطع المستعرض لوريد الذيل الجانبي الأيسر). بصورة دقيقة عند $t =$ صفر دقيقة، تم قطع الذيل بقطع عميق يبلغ 1 مم موضوع بشكل جانبي على الجانب الأيسر من ذيل الفأر، مما يؤدي إلى نقل وريد الذيل الجانبي. مباشرة بعد غمر الذيل في أنبوب تجميع محلول ملحي تمت تدفئته مسبقاً. تم تسجيل نوبة النزف الأولية لمدة 3 دقائق. إذا كان النزف الأولي أكثر من 3 دقائق، تم قتل الحيوان واستبداله. بعد 3 دقائق من الإصابة، تم تبادل أنبوب التجميع بأنبوب تجميع المحلول الملحي الجديد الذي تمت تدفئته مسبقاً. تم تسجيل جميع نوبات النزف الثانوية لمدة 57 دقيقة إضافية. إذا توقف النزف عند 15، 30 أو 45 دقيقة، تم اختبار الجرح عن طريق المسح مرتين برفق باستخدام قطعة شاش مبللة بمحلول ملحي. مباشرة بعد الاختبار، تم إعادة غمر الذيل في المحلول الملحي. عند $t = 60$ دقيقة تم قتل الفئران برحمة بينما لا تزال تحت التخدير الكامل. دُكر زمن النزف بإجمالي أوقات النزف الأولية والثانوية. تم تحليل نواتج النزف الأولية والثانوية وتخزينها لقياسات الهيموجلوبين في وقت

لاحق لفقدان الدم. (Johansen et al., Haemophilia, (2016) doi:).
(10.1111/hae.12907).

5 أظهرت النتائج انخفاضًا ملحوظًا في مقدار الوقت اللازم لتحقيق الإرقاء (وقف النزف) (p > 0,0001) في فئران R593C مصابة بسيولة الدم أ بعد قطع وريد الذيل بصورة مستعرضة (الشكل 18)، مما يوضح فعالية علاجية في هذه الفئران.

الرئيسيات غير البشرية: أجريت التجارب في NHP باستخدام بنى cDNA hFVIII-BDD حيث تم تقييم الأنماط المصلية AAV2/6 و AAV2/8. يوضح الجدول 4 أدناه والشكل 26 ب تطابق مجموعات الجرعات. يكمن الفرق بين مجموعة التعبير عن الجين المعدل وراثيًا F8 المصمم "cDNA 1" (المجموعات 2-4 من الجدول 4 أدناه) و "cDNA2" (المجموعة 5 من الجدول 4 أدناه) في أن مانح "cDNA2" لديه وحدة مُحسن مختلفة قليلاً (مُحسن كبد هجين، انظر 10 McIntosh et al (2013) Blood 121(17):3335)، ولكن كان باقي مجموعة التعبير عن الجين المعدل وراثيًا F8-BDD (بما في ذلك منطقة التشفير) متشابهة. لهذه التجارب، تم استخدام نظام الجرعات المبين في الشكل 26 أ (حيث تم إعطاء مادة الاختبار المسبقة ريتوكسيماب وستيرويد (إعطائها بالتزامن مع مادة الاختبار ويوميًا بعد ذلك).

15 الجدول 4: مجموعات NHP مع مجموعة الجين المعدل وراثيًا FVIII

رقم المجموعة	عدد الذكور	تحديد مادة الاختبار	وصف الجين المعدل وراثيًا AAV	النمط المصلي	مستوى جرعة المكون (vg/kg)	مستوى جرعة الناقل الإجمالي AAV (vg/kg)
1	2	SGMO.01	محلول الصيغة المنظم	NA	NA	NA
2	3	SGMO.02	hF8-BDD cDNA 1	AAV2/6	10×2 12+	12+ 10×2

12+ 10×6	10×6 12+	AAV2/6	hF8-BDD cDNA 1	SGMO.03	3	3
12+ 10×6	10×6 12+	AAV2/8	hF8-BDD cDNA 1	SGMO.04	3	4
12+ 10×6	10×6 12+	AAV2/8	hF8-BDD cDNA 2	SGMO.05	3	5

تم إعطاء قرود الرباح محلول الصيغة المنظم أو 12+ 10×6 جينوم ناقل/ كجم من AAV2/6 hF8 cDNA (الأصلي). في اليوم 14 بعد إضافة مادة الاختبار، تم تحليل مستويات تدوير ونشاط hFVIII بواسطة ELISA أو نشاط التخثر (انظر الشكل 27). تتعكس المستويات الطبيعية من FVIII لقرود الرباح ~ 1 وحدة/ ملي لتر في بيانات نشاط التخثر لمجموعة التحكم في الصيغة

5 نظرًا لأن اختبار نشاط التخثر ليس محددًا لـ FVIII البشري. يكون ELISA محددًا لـ FVIII البشري عن FVIII لقرود الرباح وبالتالي، كما هو متوقع لا يوجد مستويات hFVIII كما تم قياسها بواسطة ELISA في مجموعة التحكم في الصيغة. يتم توضيح حيوانات فردية لمجموعة التحكم في الصيغة (المجموعة 1، أرقام الحيوان 1101-1102)، ومجموعة الجرعة 12+ 10×6 جينوم ناقل/ كجم (المجموعة 3، أرقام الحيوان 3101-3103). في حيوانات المجموعة 3 توجد مستويات فسيولوجية فائقة ونشاط تدوير hFVIII، أعلى من 8 وحدة/ ملي لتر. 10

كمؤشر على حالة الكبد بعد العلاج، تم قياس إنزيمات الكبد لمجموعة التحكم في الصيغة (المجموعة 1، أرقام الحيوان 1101)، ومجموعة الجرعة 12+ 10×6 جينوم ناقل/ كجم (المجموعة 3، أرقام الحيوان 3102). تم قياس آلانين أمينو ترانسفيراز (ALT) وأسبارتات أمينو ترانسفيراز (AST). تبلغ القيم المرجعية القصوى المقبولة لقرود الرباح لـ ALT 126 وحدة/ لتر و 120 وحدة/ لتر لـ AST. بالنسبة لكل مجموعة تحكم في الصيغة ومجموعة 12+ 10×6 جينوم ناقل/ كجم AAV hF8 cDNA (الأصلية) تم رفع مستويات ALT/AST في الخزعة بعد الكبد (كانت خزعة الكبد في اليوم 41)، والمشار إليها بعلامة النجمة. وبخلاف ذلك، تم تحمّل AAV hF8 cDNA جيدًا طوال الدراسة (247 يومًا) (انظر الأشكال 28 أ و 28 ب). 15

- يتم عرض البيانات في الشكل 29، حيث تم توضيح مجموعة البيانات لكل قرد على الرسومات البيانية. تشير البيانات إلى أن الجرعات المرتفعة (قارن الشكل 29 أ مع الشكل 29 ب) من مادة الاختبار في خلفية النمط المصلي AAV6 أعطت تعبيراً عن FVIII-BDD عندما يقرب من 10 أضعاف المستوى الموجود في البلازما البشرية العادية. أظهرت بيانات مادة الاختبار في النمط المصلي 8 AAV2/ زيادة في نشاط FVIII، ولكن ليس بنفس المدى الملحوظ في 6 AAV2/.
- 5
- بعد فترة الـ 14 يوماً الموضحة أعلاه، استمرت التجربة حتى 247 يوماً بعد الجرعة الفردية من AAV-FVIII-BDD. تم إيقاف الجرعات المشتركة للستيرويد في اليوم 103. تم تحديد مستويات hFVIII-BDD في بلازما القرد باستخدام ELISA مخصص على النحو التالي. تم تغليف أطباق بوليسترين دقيقة (Corning) (ارتباط مرتفع) بنصف المنطقة التي بها 96-عين) طوال الليل عند 4 درجات مئوية مع الجسم المضاد وحيد النسيلة مضاد hFVIII من الفأر (Green Mountain, Burlington, VT) في 0,2 مولار من محلول كربونات بيكربونات منظم الرقم الهيدروجيني يبلغ 9,4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA). في اليوم التالي تم غسل الأطباق أربع 4 مرات باستخدام TBST واحدة (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA). تم حجب طبق به 96 عين لمدة ساعتين عند درجة حرارة الغرفة باستخدام 3% من محلول حجب منظم BSA/TBS، يليها الغسل 4 مرات باستخدام TBST واحدة.
- 15
- تمت إضافة البلازما إلى الطبق وحضانتها مع الهز في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين، يليها الغسل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة أجسام الكشف المضادة، تمت إضافة الأجسام المضادة لـ FVIII أحادية النسيلة التي تمت معالجتها ببيوتين (Green Mountain, Burlington, VT) وحضانتها لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة، يليها الغسل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة سترينبتايفيدين HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) وحضانتها لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الغرفة يليه الغسيل 4 مرات باستخدام TBST واحدة. تمت إضافة TMB Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) وتم السماح بتطويره لمدة 10 دقائق، وتم إيقاف التفاعل باستخدام محلول الإيقاف وقراءة الامتصاص عند 450 نانومتر باستخدام قارئ الطبق. كانت قراءات امتصاص الخلفية ضئيلة (بشكل نمطي صفر). تم تحديد وجود الأجسام المضادة FVIII المثبطة باستخدام اختبار
- 25

- Bethesda (على سبيل المثال، انظر Kasper et al (1975) Thromb Diath (Haemorrh 34:869-72). تم استخدام اختبار ELISA لتقييم ذروة مستويات مولد الضد FVIII البشري خلال الدراسة. عند مستويات جرعة تبلغ $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3)، تم تحقيق قيم ذروة تبلغ 111,0%، 493,9% و 840,0% (المتوسط الإجمالي 481,6% 5 كما تم قياسه بواسطة HFVIII ELISA) من مستويات البلازما hFVIII الطبيعية في البشر. في جرعة أعلى تمثل $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3)، تم تحقيق قيم ذروة تبلغ 450,0%، 625,6% و 886,7% [متوسط إجمالي 654,1%] من مستويات البلازما HFVIII (الشكل 30).
- أجريت الدراسة المبينة في الجدول 4 وتم قياس مستويات FVIII-BDD وأي أجسام مضادة لـ FVIII 10 بالنسبة للحيوانات منخفضة الجرعة (عدد = 3)، وتشتمل على FVIII-BDD cDNA في AAV2/6، تم إعطائها جرعة $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/كجم، بعد اكتشاف مستويات قوية من مولد الضد hFVIII (Ag)، انخفضت مستويات hFVIII-BDD مع ما يصاحب ذلك من زيادة في وحدات Bethesda (BU). انخفض BU بمرور الوقت وزاد hFVIII Ag (الشكل 31). أظهرت النتائج أنه بعد توقف العلاج الكابت للمناعة، انخفضت مستويات (وفقاً لقياس ELISA) مولد الضد FVIII البشري. 15
- بالنسبة للحيوانات مرتفعة الجرعة (عدد = 3)، التي تشتمل على FVIII-BDD cDNA في AAV2/6، تم إعطائها جرعة عند $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم، لوحظ نمط مشابه (انظر الشكل 32). ومع ذلك في إحدى الحيوانات، 3101، بعد إزالة Solu-medrol، لم يتم الكشف عن الأجسام المضادة لـ FVIII على الرغم من وجود مستوى قابل للكشف ومستمر من مولد الضد FVIII (يمثل 200% من مستويات hFVIII العادية)، والتي يمكن أن تكون مؤشراً على تحمل الحيوان لمولد الضد FVIII البشري. 20
- عندما تم استخدام النمط المصلي AAV2/8 لتوصيل الجرعة المرتفعة، لوحظت نتائج مماثلة فيما عدا أن كمية مولد الضد hFVIII القابل للكشف في البلازما كانت مما تم قياسها باستخدام الناقل AAV2/6 (الشكل 33). وبالمثل، عندما تم اختبار وحدة مُحسن نمطية مختلفة FVIII-BDD cDNA (المجموعة 5، الموصوفة أعلاه) في الناقل AAV2/8، كانت مستويات البلازما 25

HFVIII-BDD مماثلة لتلك التي اتضحت في المجموعة 4 (الشكل 34). ومع ذلك، كما ذكر أعلاه، وجد فردان احتفظا بكمية قابلة للكشف من التعبير FVIII-BDD (5101 و 5102)، وفرد في المجموعة 4 (4103، الشكل 33) دون استجابة للجسم المضاد ملحوظة بعد إزالة Solu-medrol، لتشير مرة أخرى إلى تحمل مولد الضد بعد مستويات الاستجابة القوية التي اتضحت في الأيام الأولى من التجربة. 5

كما هو موضح في الشكل 34، يبدو أن الحيوان رقم 5101 تحمل hFVIII-BDD بعد إزالة ميثيل بريدنيسولون، ظلت مستويات hFVIII-BDD ثابتة لمدة 8 أسابيع عند حوالي 0.1 وحدة/مليتر (تمثل 10% من مستويات hFVIII الطبيعية). أيضًا، كما هو مبين في الشكل 34، يبدو أن الحيوان رقم 5102 يتحمل hFVIII-BDD بعد إزالة ميثيل بريدنيسولون، ظلت مستويات hFVIII-BDD ثابتة لمدة 8 أسابيع عند 0.6 وحدة/ملي لتر تقريبًا (تمثل 60% من مستويات hFVIII الطبيعية). تجدر الإشارة إلى أن المستويات الطبيعية لـ hFVIII في البلازما البشرية تبلغ 1 وحدة/مليتر تقريبًا أو 200 نانو جرام/مليتر، وأن التعبير يبلغ حتى 1% - 5% من الطبيعي (< 0.001 وحدة/ملي لتر) يمكن أن يكون له فعالية علاجية (Llung, RC (1999) (Thromb Haemost 82(2):525-530).

أجريت التجارب في NHP كما هو موصوف أعلاه باستثناء أنه تم فحص أنظمة كبت مناعية مختلفة. لهذه التجارب، تم اتباع نظام الجرعات المبينة في الشكل 26 بواسطة بعض المجموعات (1-5) وتم إعطاء علاج كابيت للمناعة قبل جرعات مادة الاختبار، بينما تلقت مجموعات أخرى (6-8) كبت المناعة بعد جرعات مادة الاختبار. 15

كما هو مبين في الشكل 38، عند مستويات جرعة تبلغ $10 \times 6 + 11$ جينوم ناقل/كجم ($n = 3$)، المجموعة (3)، بلغ المتوسط الإجمالي لقيم الذروة 5,7% (تم قياسه بـ hFVIII ELISA) لمستويات البلازما hFVIII الطبيعية لدى البشر التي تم تحقيقها. عند جرعة أعلى تمثل $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3، المجموعة 4)، بلغ المتوسط الإجمالي لقيم الذروة 56.5% وعند $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3، المجموعة 5) بلغ المتوسط الإجمالي لقيم الذروة 229,0% (تم قياسه بواسطة hFVIII ELISA) لمستويات البلازما hFVIII التي تم تحقيقها. عند مستوى الجرعة $10 \times 2 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3، المجموعة 7) بلغ المتوسط الإجمالي لقيم 20 25

الذروة 87,9%، وبالنسبة لـ $10 \times 6 + 12$ جينوم ناقل/كجم (عدد = 3، المجموعة 8)،
101,7%. وكانت المجموعتان 1 و 6 عبارة عن مجموعات مقارنة الصيغة، يشار إليها بالصيغة.
بالإضافة إلى ذلك، كما هو موضح في الشكل 39، أدت إعادة الجرعات باستخدام نفس النمط
المصلي إلى مستويات مولد ضد FVIII في الدورة البشرية. تشير هذه النتائج إلى أن المعالجة
5 المسبقة للحيوانات مع كبت المناعة يمكن أن تكون مفيدة لزيادة التعبير العلاجي للبروتين.
بالإضافة إلى ذلك، يسمح العلاج المسبق بإعادة الجرعات عند عدم تطوير أي أجسام مضادة
متعادلة خلال الجرعة الأولى. يوضح الشكل 39 أيضًا الاستجابة للجرعة في الحيوانات التي تمت
معالجتها للتعبير hFVIII عند الاستجابة للنطاقات المختلفة لـ FVIII-BDD cDNA الذي تم
إعطائه في صورة جرعات. وحيث أنه من المُعتقد أن وجود 1 إلى 5% من بروتين FVIII في
10 البلازما يتمتع بفعالية علاجية كبيرة عند البشر، من المرجح أن توفر الجرعات الإكلينيكية في
نطاق E11 (التي تؤدي إلى 5,7 إلى 12,0% من المستويات العادية في هذه التجربة) فائدة
علاجية. وبالتالي، تثبت البيانات أن البنى الموصوفة في هذه الوثيقة تؤدي إلى مستويات علاجية
لإنتاج الجينات في الجسم الحي.

المثال 3: التكامل المستهدف بواسطة نيوكلاز

15 تم أيضًا تقييم البنى الموضحة في المثالين 1 و 2 للتعبير عند استخدامها في توليفة مع إنزيمات
نيوكلاز خاصة بالألبومين للدمج المستهدف لبنية التعبير في موضع الألبومين. على وجه
الخصوص، تم إعطاء البنى لخلايا HepG2 مع إنزيمات نيوكلاز على شكل إصبع زنك محددة
للألبومين. انظر، على سبيل المثال، براءة الاختراع الأمريكية رقم 9,150,847؛ 9,255,250
ونشرة براءة الاختراع الأمريكية رقم 20130177983؛ 20150159172. 20150056705
و 20150166618.

تم الاحتفاظ بخلايا الكبد HepG2 البشرية وفقًا لإرشادات الشركة الصانعة (ATCC, Manassas VA). في يوم التجربة، تم غسل خلايا HepG2 ومالجتها بتريسين وعدها. تم
توصيل ZFNs المستخدم إلى موقع إنترون الألبومين البشري، مع العامل البشري VIII-BDD
25 تم توصيل ZFNs AAV2/6 عند $10 \times 3.0 + 05$ و AAV2/6 hFVIII cDNA CRMSBS2
المُشار إليه بالزمن صفر.

بدون إنترون عند $04+ 10 \times 6.0$ ، $04+ 10 \times 3.0$ ، $05+ 10 \times 1.2$ لخلايا $05+ 10 \times 1$ لكل عين من طبق به 24-عين. وبالتالي تم إعطاء بنية التعبير بجرعات متزايدة من $04+ 10 \times 6.0$ ، $04+ 10 \times 3.0$ ، $05+ 10 \times 1.2$ مع $05+ 10 \times 3.0$ ZFN. وتضمنت عينات التحكم إعطاء الجين المعدل وراثيًا CRMSG2 SBR إنترون 3 وحده أو مع GFP، ZFN وحده أو GFP وحده. 5 تم تبادل الأوساط في اليوم التالي. تم تحليل المواد الطافية للكشف عن hFVIII باستخدام الـ HFVIII ELISAs الموصوف أدناه في 19 يوم بعد إضافة فيروس AAV2/6.

تم تحديد مستويات العامل البشري VIII-BDD الذي تم إفرازه باستخدام طاقم Affinity ELISA (FVIII-AG) Biologicals (Canada) وفقاً لبروتوكول التصنيع باستثناء معيار العامل البشري. يكون معيار العامل البشري VIII المستخدم في اختبار ELISA عبارة عن العامل البشري المنقى الناتج عن عودة الارتباط الجيني VIII (F0016-06) من US (Salem, MA) Biologicals. باختصار، تمت إضافة المادة الطافية HepG2 إلى الطبق، وتمت حضانتها بالهز في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة ونصف، يليها عملية الغسيل 3 مرات بمحلول الغسل المنظم في الطاقم. تمت إضافة جسم الكشف المضاد، المتوفر مع الطاقم، وحضانتها لمدة خمس وأربعين دقيقة في درجة حرارة الغرفة، يليها عملية الغسيل 3 مرات بمحلول الغسل المنظم المتوفر في الطاقم. تمت إضافة الركيزة TMB المتوفرة مع الطاقم وسمحت بالتطوير لمدة 10 دقائق. تم إيقاف التفاعل بمحلول إيقاف، وتمت قراءة الامتصاص عند 450 نانومتر باستخدام قارئ طبق.

تم تحليل المستوى الإجمالي لبروتين hFVIII-BDD الذي تم الكشف عنه في المادة الطافية الخلوية HepG2 بمرور الوقت ($t =$ الأيام) بعد إعطاء ZFNs المستهدفة بالأليومين (SBS#47171/47898، انظر نشرة المعاهدة الدولية بشأن براءة الاختراع رقم WO 2015/089077) والبنية المحددة (الشكل 36). في وجود كل من بنية التعبير FVIII BDD و ZFN، تم الكشف عن FVIII BDD الذي تم إفرازه في المادة الطافية بعد ثلاثة أيام من المعالجة بأعلى جرعة من الجين المعدل وراثيًا FVIII BDD، ثم يمكن الكشف عنه بجرعة أقل في اليوم الخامس، والكشف عنه عند كل المستويات في اليوم السابع. في غياب ZFN، تم نادراً الكشف عنه FVIII BDD في المادة الطافية فوق خلفية الفحص في اليوم السابع. تشتمل البيانات الموضحة 25

على عدد = 3 وحدة بيولوجية متكررة. تمثل قضبان الخطأ الخطأ القياسي لمتوسط النسخ التقنية. يمثل الخط المنقط حد الكشف عن ELISA hFVIII. تم فقط الكشف عن hFVIII-BDD الذي تم إفرازه بصورة ضعيفة فقط في غياب ZFNs، حيث أنه من المحتمل تخفيف hFVIII-BDD اليصبوغي أو تحلله قبل تراكم كميات كافية من hFVIII-BDD الذي تم إفرازه من هذا اليصبوغ.

5 علاوة على ذلك، كما هو محدد بواسطة PCR الكمي (باستخدام بادئ 5' موضوع داخل موضع الألبومين البشري الداخلي ويتم وضع مسبار داخل ITR من مجموعة hFVIII-BDD والبادئ 3' ضمن hFVIII-BDD)، تم تحقيق الدمج المستهدف (بواسطة NHEJ) من البنى الموضحة فقط في وجود ZFNs محدد للألبومين (الشكل 37). وبالتالي تثبت هذه البيانات الدمج الناجح لمجموعة hFVIII-BDD والتعبير عن بروتين F8 المشفر.

10 تم تكرار هذه التجارب لاختبار مجموعة أخرى من ZFNs محدد للألبومين (SBS#42906/43043)، انظر نشرة المعاهدة الدولية بشأن براءة الاختراع رقم WO (2015/089046). توضح النتائج (الأشكال 40أ و 40ب) التعبير عن بروتين FVIII في المادة الطافية لهذه الخلايا والدمج المستهدف للجين المعدل وراثيًا.

15 يتم توصيل ZFNs محدد- للألبومين والبنى بعد ذلك في الجسم الحي للحيوانات بشكل أساسي كما هو موضح في الأمثلة 1 و 2. يتم دمج البنى في موقع الألبومين الداخلي ويعبر عن الجين المعدل وراثيًا.

يتم أدناه توضيح التصميم التجريبي للدراسات في الجسم الحي في الجدول 5. باختصار، تم استخدام جراء ذكور فئران C57BL/6 من الجيل F1 للدراسة في الجسم الحي (مادة الاختبار المشار إليها في الجدول 5). كانت الـ ZFNs المستخدمة في الدراسة عبارة عن SBS # 48641 و SBS # 31523 (راجع نشرة براءات الاختراع الأمريكية رقم 2014-0017212). التزمت الدراسة بقانون رعاية الحيوان لرعاية الإنسان واستخدام الحيوانات. تمت إذابة مواد الاختبار في درجة حرارة الغرفة قبل الجرعات، وتلقت جميع الحيوانات حقنة فردية تحت الجلد تبلغ 100 ميكرو لتر كما هو موضح أدناه. كانت جرعة ZFN عبارة عن 1.5×10 + 11 جينوم ناقل لكل فأر وكانت جرعة F8 cDNA عبارة عن 1.5×10 + 11 جينوم ناقل لكل فأر. تم جمع الدم بعد القتل

الرحيم لاثنين أو ثلاثة من الجراء لكل مجموعة في كل يوم من الأيام 7، 14، 21 و 28 وتمت معالجته للبلازما لتحليل مستويات تدوير hFVIII في البلازما باستخدام hFVIII ELISA داخلي في الفأر. تم جمع الأنسجة من جميع الفئران لتحليل مستويات تعديل الجينات بواسطة تشكيل متواليه عميق (indels، الإدراج والحذف)، تحليل mRNA بواسطة RT-PCR، تحليل جينوم الناقل باستخدام qPCR وتحليل التكامل المستهدف باستخدام qPCR.

5

الجدول 5: تصميم تجريبي

رقم المجموعة	وصف مادة الاختبار	جرعة ZF	جرعة F8 cDN A	جرعة AAV الإجمالي (فأر) /vg	جرعة AAV الإجمالية (كجم) /vg	عدد الجراء (ميكرو لتر)	حجم الجرعة
1	محلول الصيغة المنظم	0	0	0	0	9	100
2	ZFNs + F8 cDNA	1,5 × 10 ¹¹ لكل ZFN	1,5 × 10 ¹¹	4,5 × 10 ¹¹	3,75 × 10 ¹⁴	12	100

100	12	× 1,25 14 10	× 1,5 11 10	× 1.5 10 11	0	SGMO.0 3	F8 cDNA	3
-----	----	-----------------	----------------	-------------------	---	-------------	------------	---

أ: جرعة AAV الإجمالية المحسوبة باستخدام 1.2 جم من وزن الجسم

ب: تم إعطائها مرة واحدة في حجم واحد من 100 ميكرو لتر.

يتم تقديم مستويات F8 التي تم الكشف عنها في البلازما في جدول 6 أدناه، وكذلك الكمية للدمج المُستهدف للجين المعدل وراثيًا FVIII-BDD.

5 الجدول 6: التعبير عن F8 ودمج الجين المعدل وراثيًا

الدمج المستهدف	المستهدف	طفرة جينية قصيرة %	مستويات F8 (ELISA)		رقم الحيوان	الوصف	رقم المجموعة	رقم العينة	المرحلة
S	E	M	نانو جرام/ملي لتر	وحدة/ملي لتر	ن		ع	م	م
	0	.S.N	0.4	0.002	101	الصيغة	1	1	7
	0	.S.N	1.2	0.006	201	الصيغة	1	2	7
0.	1.4					ZFN/F8			
00	8	7.8	0	0	401	cDNA	2	3	7
1.	4.1					ZFN/F8			
13	5	8.4	1.2	0.006	501	cDNA	2	4	7
3.	11.					ZFN/F8			
82	38	12.5	16.4	0.082	601	cDNA	2	5	7

	0	.S.N	4.4	0.022	901	F8 cDNA	3	6	7
	0	.S.N	2.4	0.012	100 1	F8 cDNA	3	7	7
	0	.S.N	1.2	0.006	110 1	F8 cDNA	3	8	7
	0	.S.N	1.2	0.006	301	الصيغة	1	1	1 4
	0	.S.N	1.2	0.006	102	الصيغة	1	2	1 4
1. 76	4.4 5	14.4	24.8	0.124	701	ZFN/F8 cDNA	2	3	1 4
0. 09	3.0 2	16.1	7.4	0.037	402	ZFN/F8 cDNA	2	4	1 4
0. 71	2.9 3	11.7	33.8	0.169	502	ZFN/F8 cDNA	2	5	1 4
	0	.S.N	0.4	0.002	120 1	F8 cDNA	3	6	1 4
	0	.S.N	0.2	0.001	902	F8 cDNA	3	7	1 4

	0	.S.N	3	0.015	100 2	F8 cDNA	3	8	1 4
	0	.S.N	0	0	202	الصيغة	1	1	2 1
	0	.S.N	1.2	0.006	302	الصيغة	1	2	2 1
1. 11	21. 11		15.7	16.4	0.082	ZFN/F8 cDNA	2	3	2 1
1. 36	4.7 6		18.6	*	*	ZFN/F8 cDNA	2	4	2 1
2. 36	5.7 2		16.7	*	*	ZFN/F8 cDNA	2	5	2 1
	0	.S.N	4.4	0.012	110 2	F8 cDNA	3	6	2 1
	0	.S.N	2.4	0.022	903	F8 cDNA	3	7	2 1
	0	.S.N	1.2	0.006	103	الصيغة	1	1	2 8
	0	.S.N	0	0	603	الصيغة	1	4	2 8

0.	1.0					ZFN/F8			2
68	0	9.4	0.8	0.004	303	cDNA	2	2	8
1.	5.9					ZFN/F8			2
26	6	17.3	25.6	0.128	503	cDNA	2	3	8
0.	1.9					ZFN/F8			2
49	3	15.0	0.2	0.001	703	cDNA	2	5	8
					100	F8			2
	0	.S.N	0.8	0.004	3	cDNA	3	6	8
					110	F8			2
	0	.S.N	0.4	0.002	3	cDNA	3	7	8

*: البيانات غير متاحة

NS: ليس أعلى إلى حد كبير من الخلفية

بالتالي، تم الكشف عن FVIII في جراء الفئران بعد إعطاء إنزيمات نيوكلاز المحددة لألبومين والجين المعدل وراثيًا FVIII-BDD. تم أيضاً الكشف عن إدراج الجين المعدل وراثيًا عند كميات أكبر في تلك الفئران التي تمت معالجتها بكل من ZFNs والجين المعدل وراثيًا.

بالتالي، يوفر تكامل مستهدف بواسطة النيوكلاز للبنى الموصوفة في هذه الوثيقة التعبير عن الجين المعدل وراثيًا في الخلايا الكبدية.

يتم في هذه الوثيقة إدراج كل براءات الاختراع، طلبات براءات الاختراع والنشرات المذكورة في هذه الوثيقة كمرجع بأكملها.

على الرغم من توفير الكشف بالتفصيل إلى حد ما على سبيل التوضيح والمثال لأغراض توضيح الفهم، يتضح لهؤلاء المهرة في المجال أن التغييرات والتعديلات المختلفة يمكن تطبيقها دون الانفصال عن نطاق الكشف. وفقاً لذلك، لا ينبغي تفسير الوصف السابق والأمثلة بأنها مقيدة.

عناصر الحماية

1- بنية تعبير عن عديد نيوكليوتيد polynucleotide expression construct تشتمل على: متوالية (متواليات) عازلة insulator sequence(s) واحدة منتقاة من أرقام هوية متوالية: 28، 29، 30، و38،

متوالية محسنة enhancer sequence ،

5 المتوالية المعززة promoter sequence promoter sequence ، و

جين معدل وراثياً transgene .

2- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 1، تشتمل على متوالية عازلة insulator sequence أولى تشتمل على رقم هوية متوالية: 28 ومتوالية عازلة insulator sequence ثانية تشتمل على رقم هوية متوالية: 10 30.

3- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 1، تشتمل أيضاً على متوالية إنترون intron sequence ، حيث تشتمل متوالية الإنترون intron sequence intron sequence على فيروس دقيق من نوع غير معالج أو مطفر بمتوالية إنترون mutated minute virus of mice (MVM) intron sequence (MVM) فأرية. 15

4- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 3، حيث تكون متوالية إنترون intron sequence منتقاة من أرقام هوية متوالية: 15، 16 و 17، والنيوكليوتيدات 340-432 من رقم هوية متوالية: 37. 20

5- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 3، حيث تجانح المتواليتين العازلتين two insulator sequences المتوالية

المحسنة enhancer sequence، المتوالية المعززة، متوالية الإنترون intron sequence ،
والجين المعدل وراثياً transgene.

5 6- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً
لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل المتوالية المحسنة enhancer sequence على متوالية محسنة
enhancer sequence سيربين 1 Serpin 1 من النوع غير المعالج أو المطفر wild-
.type or mutated

10 7- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً
لعنصر الحماية 1، حيث يكون بالمتوالية المحسنة enhancer sequence تطفرات عند
المواضع 1، 5، 14، 32 و/ أو 39 بأي من أرقام هوية متوالية: 1-13.

15 8- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً
لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل المتوالية المعززة على المتوالية المعززة promoter sequence
promoter sequence ترانسثيريتين من النوع غير المعالج أو المطفر wild-type or
(TTR) mutated transthyretin.

20 9- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً
لعنصر الحماية 1، تشتمل أيضاً على إشارة إدخال بولي أدينيل polyadenylation signal.
20

10- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً
لعنصر الحماية 1، حيث يشفر الجين المعدل وراثياً بروتين يفتقر إلى أو ينقصه سيولة في الدم
hemophilia أو مرض تخزين ليزوسومي lysosomal storage disease .

25 11- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً
لعنصر الحماية 10، حيث تكون السيولة في الدم عبارة عن سيولة في الدم hemophilia A A.

12. بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 10، حيث يشفر الجين المعدل وراثياً العامل VIII.

13- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 10، حيث يشفر الجين المعدل وراثياً أيضاً نيوكلياز (نيوكليازات) nuclease(s) منتقى من ZFNs، TALENs، TtAgo، وأنظمة CRISPR/Cas.

14- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct على من 5' إلى 3': متوالية عازلة insulator sequence أولى تشتمل على رقم هوية متوالية: 28، متوالية محسنة enhancer sequence تشتمل على رقم هوية متوالية: 36، المتوالية المعززة promoter sequence promoter sequence بأدنى TTR، متوالية إنترون intron sequence تشتمل على نيوكليوتيدات 340 - 432 برقم هوية متوالية: 37،

جين معدل وراثياً transgene يشفر عامل VIII البشري، متوالية إشارة إدخال بولي أدينيل polyadenylation signal sequence، و متوالية عازلة insulator sequence ثانية تشتمل على رقم هوية متوالية: 30.

15- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct على رقم هوية متوالية: 37.

16- بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct على رقم هوية متوالية: 34.

17- ناقل AAV vector تشتمل على بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث تكون بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct بين تكرار الطرف 5' و3' المعكوس inverted terminal repeats (ITRs) لناقل AAV vector.

5

18- ناقل AAV vector وفقاً لعنصر الحماية 17، حيث تكون ITRs هي AAV2 ITRs.

19- ناقل AAV vector وفقاً لعنصر الحماية 17، حيث يشتمل الناقل على AAV6 كابسيد .capsid

10

20- تركيبة صيدلانية تشتمل على ناقل AAV وفقاً لعنصر الحماية 17.

21- تركيبة صيدلانية تشتمل على ناقل AAV وفقاً لعنصر الحماية 17، لعلاج سيولة في الدم

hemophilia أو مرض تخزين ليزوسومي lysosomal storage disease في خاضع

بحاجة له، حيث يتم إعطاء التركيبة الصيدلانية إلى كبد الخاضع، وحيث يشفر الجين المعدل وراثياً 15

بروتين يفتقر إلى أو ينقصه سيولة في الدم hemophilia أو مرض تخزين ليزوسومي

lysosomal storage disease ، ويتم إنتاج البروتين في الخاضع.

22- التركيبة الصيدلانية وفقاً لعنصر الحماية 21، حيث يتم دمج الجين المعدل وراثياً في جينوم

20 خلية كبد genome of a liver cell.

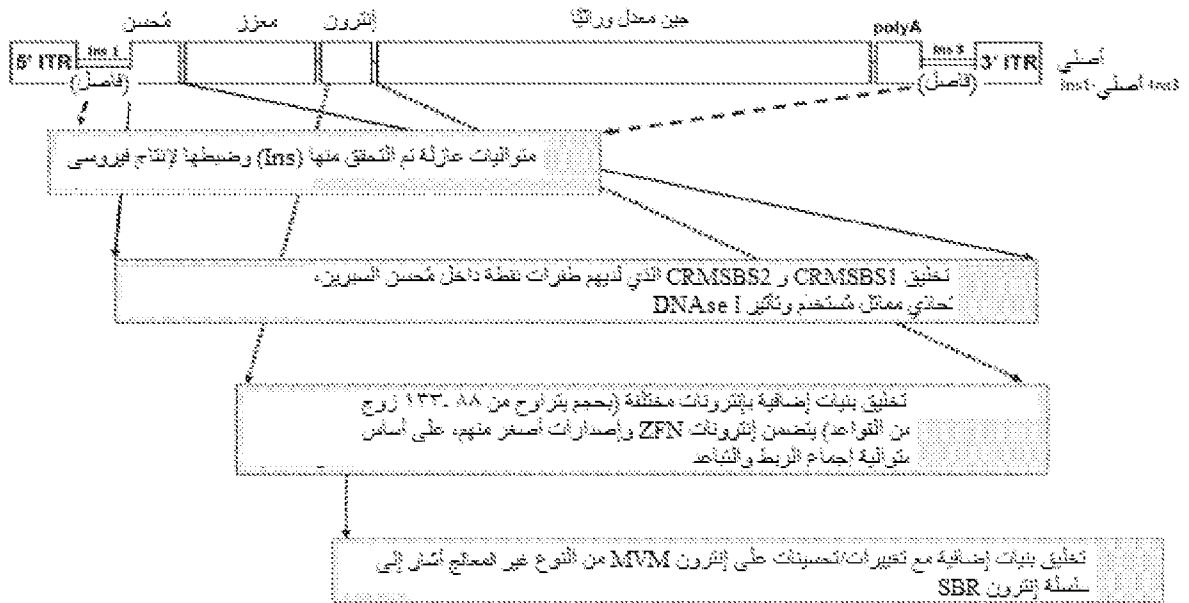
23- التركيبة الصيدلانية وفقاً لعنصر الحماية 21، حيث يتم إعطاء ناقل AAV في توليفة مع

النيوكلاز (النيوكلازات) nuclease(s) إلى الخاضع، حيث يشق النيوكلاز جين ألبومين داخلي

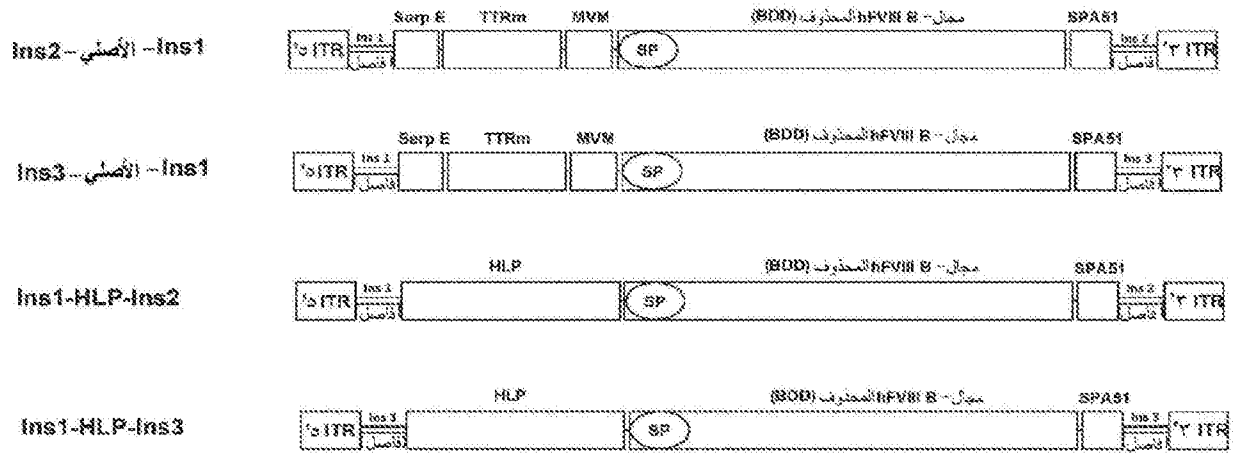
المنشأ endogenous albumin gene ويتم دمج الجين المعدل وراثياً في جين الألبومين

25 داخلي المنشأ endogenous albumin gene.

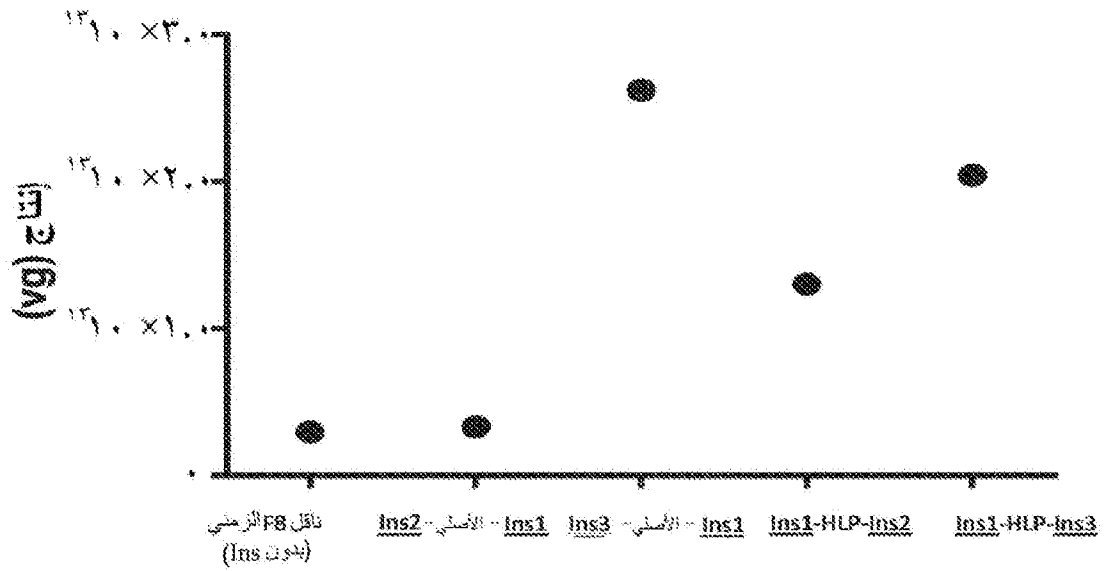
- 24- التركيبة الصيدلانية وفقاً لعنصر الحماية 21، حيث يكون الخاضع عبارة عن إنسان وحيث يقوم الإعطاء بحث التحمل في الخاضع للبروتين، حيث يقوم الإعطاء المذكورة بتعديل خلية في الإنسان لإنتاج البروتين، ويتم علاج الإنسان أيضاً بالستيرويد (الستيرويدات) steroid(s) و/ أو مثبت (مثبطات) خلية B B-cell inhibitor(s) بحيث يصبح الإنسان متحملاً للبروتين protein 5.
- 25- طاقم يشتمل على بنية تعبير عن عديد نيوكليوتيد polynucleotide وفقاً لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 16.
- 10 26- تركيبة صيدلانية تشتمل على ناقل AAV يشتمل على بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct التي تشتمل على رقم هوية متوالية: 37 لعلاج سيولة الدم A في إنسان محتاج إليها، حيث يتم إعطاء التركيبة الصيدلانية إلى كبد الإنسان، وحيث يشفر الجين المعدل وراثياً العامل البديل VIII ويتم إنتاج العامل البديل VIII في الخاضع.
- 15 27- التركيبة الصيدلانية وفقاً لعنصر الحماية 26، حيث يشتمل ناقل AAV على AAV6 كابسيد ويتم مجانحة بنية التعبير عن عديد النيوكليوتيد polynucleotide expression construct بواسطة AAV2 ITRs.
- 20 28- التركيبة الصيدلانية وفقاً لعنصر الحماية 26، حيث يتم إعطاء التركيبة الصيدلانية عن طريق الوريد في وريد محيطي peripheral vein للخاضع.



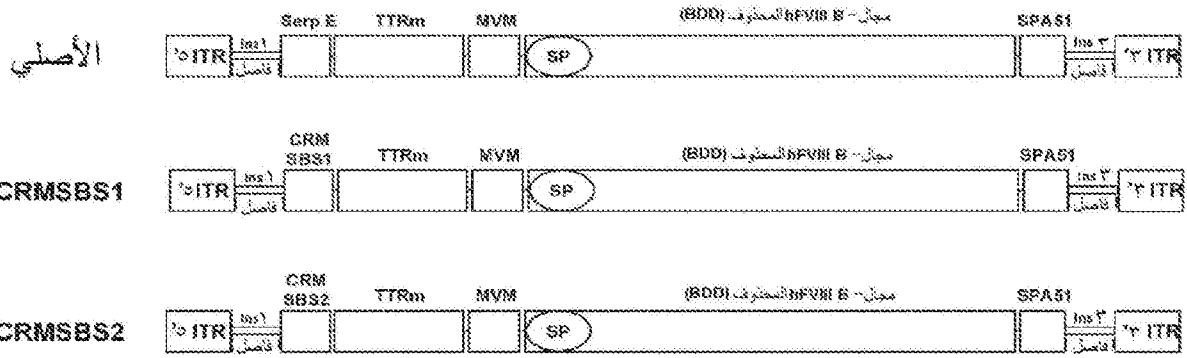
شكل 1



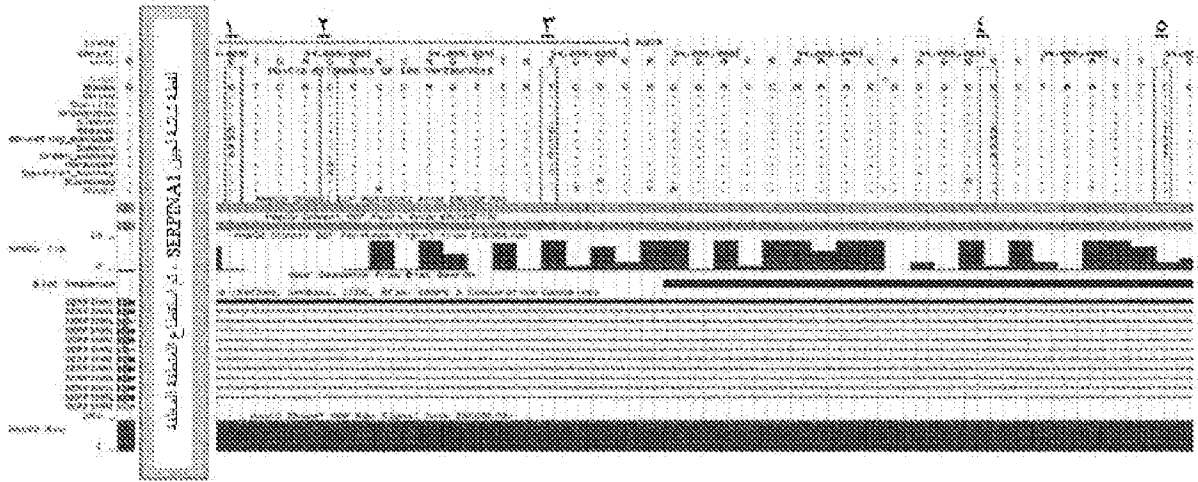
شكل ٢



شكل ٣



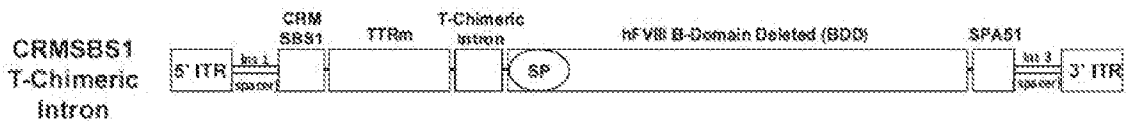
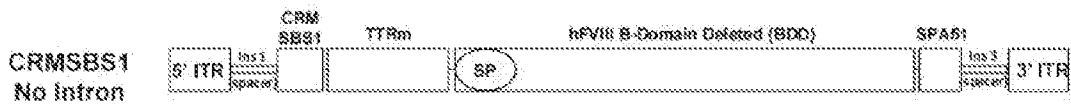
شكل ٤



CRMSBS1 = التغيرات على 1، 2، 3، 4
CRMSBS2 = التغيرات على 2، 3، 4، 5

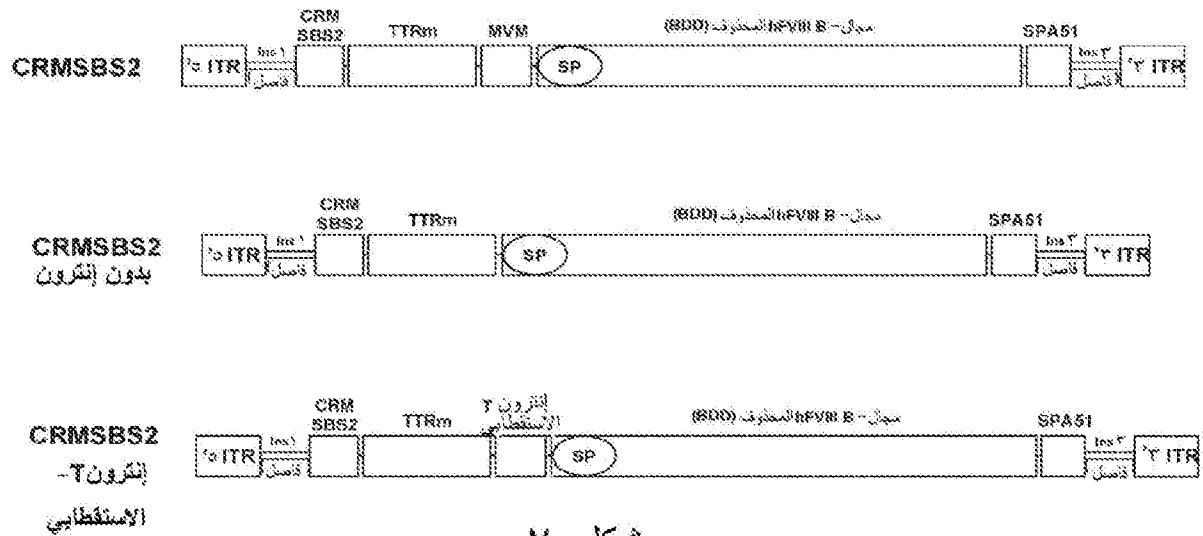
شكل ٥

Intron Modifications: CRMSBS1

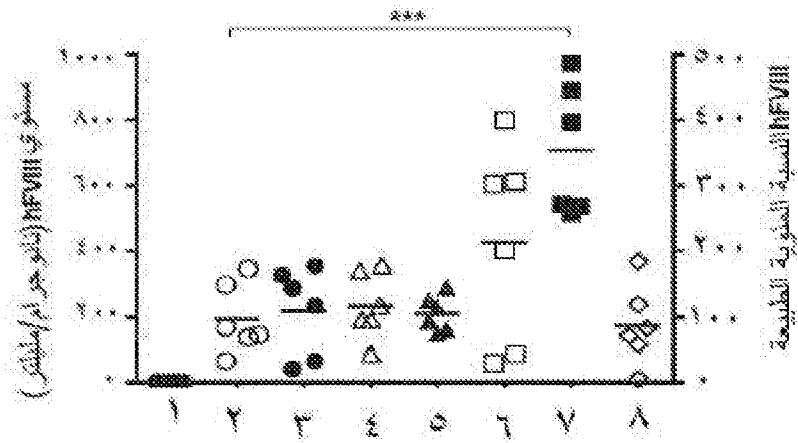


شکل ۶

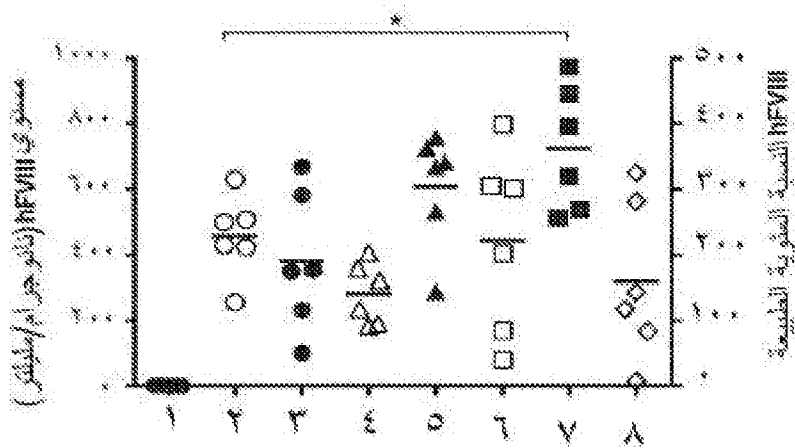
تعديلات الإنترنت: CRMSBS2



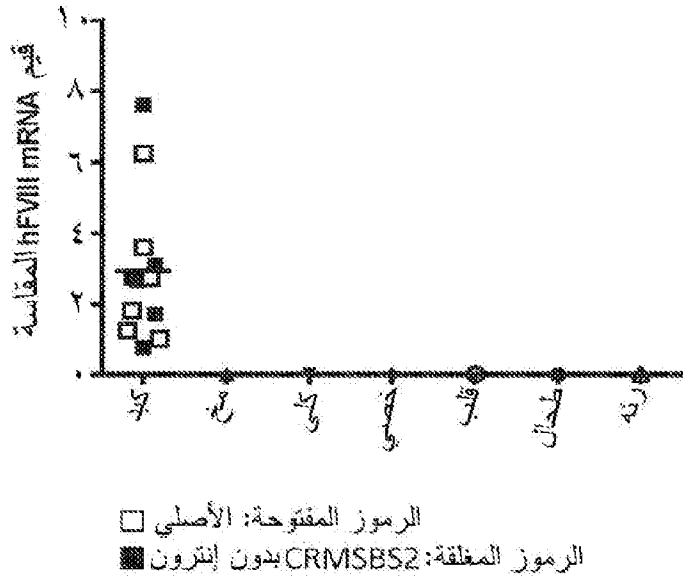
شكل ٧



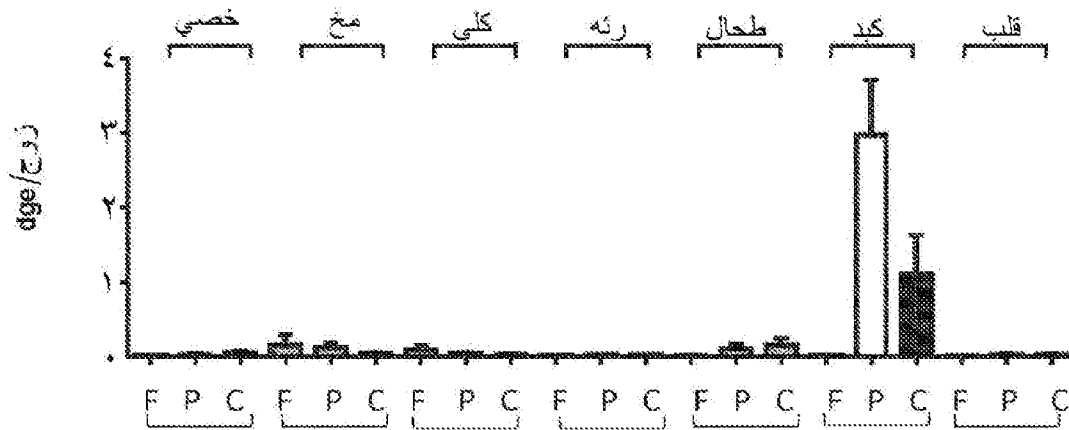
شكل ٨ أ



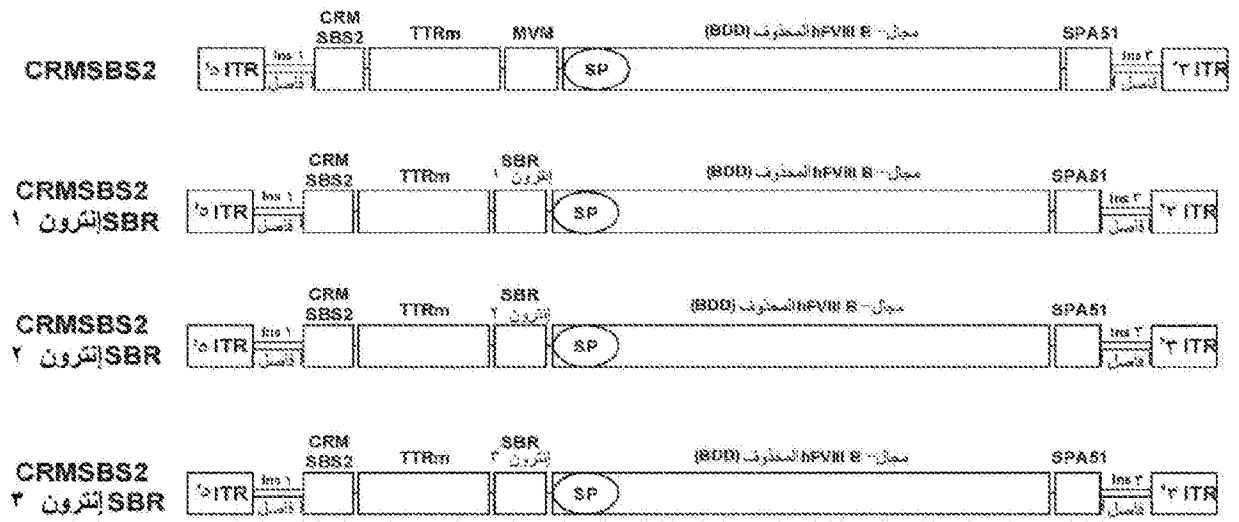
شكل ٨ ب



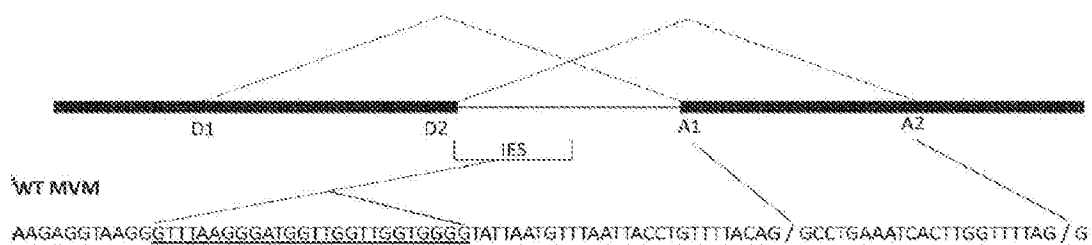
شكل ٩ أ



شكل ٩ ب

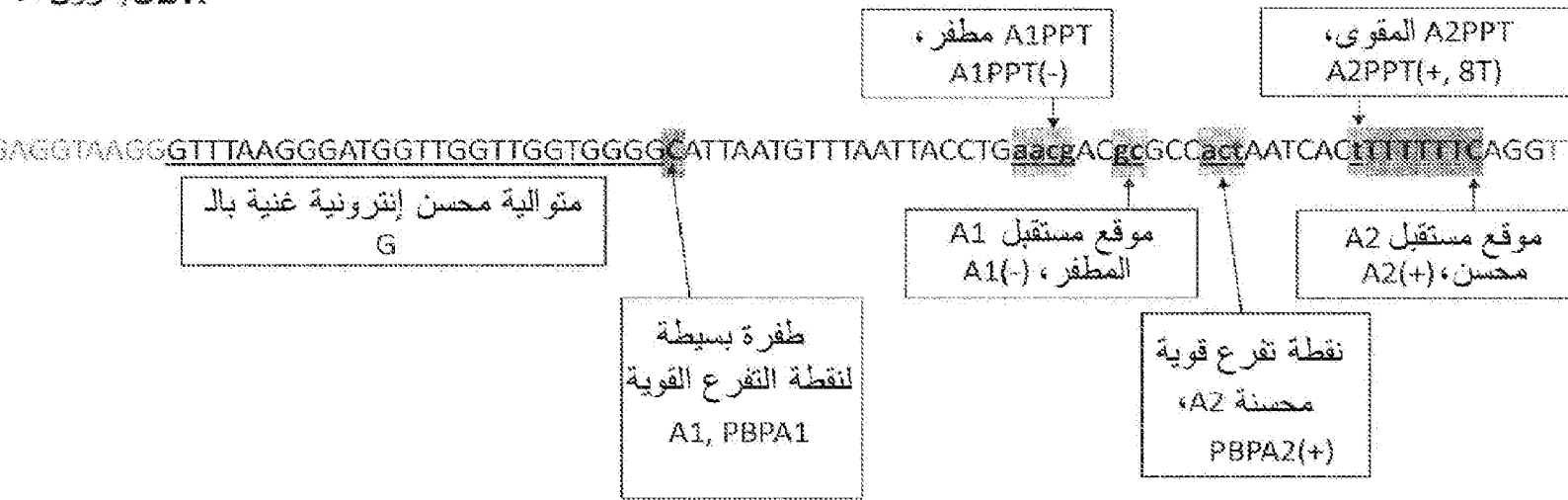


شكل ١٠



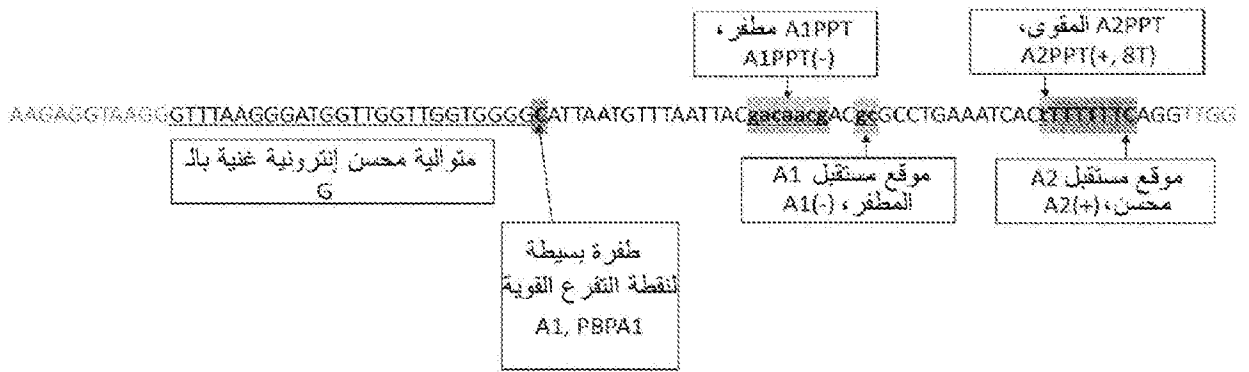
شکل ۱۱

SBR إنترون ١.



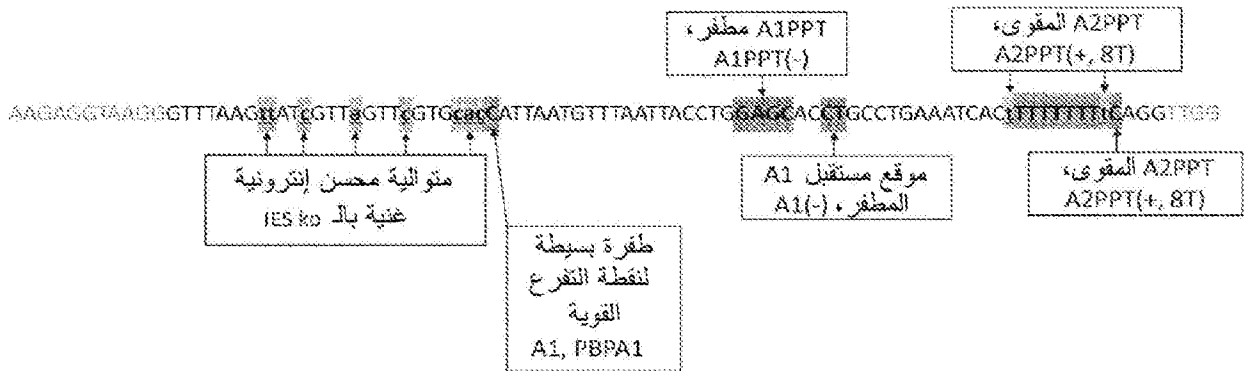
شكل ١٢

SBR إلكتروني ٢.

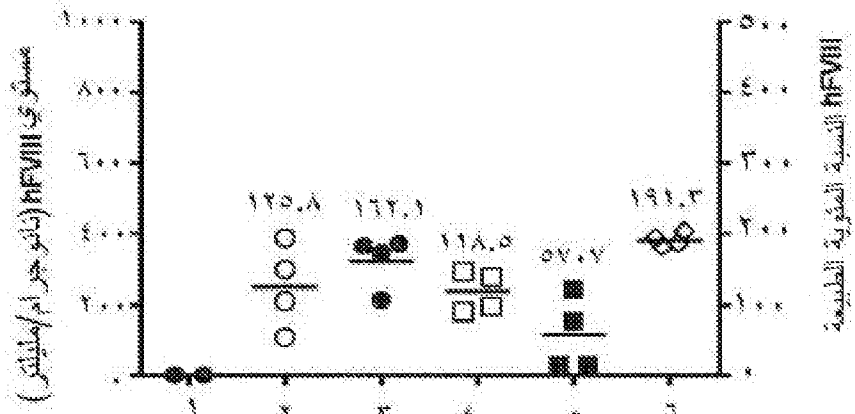


شكل ١٣

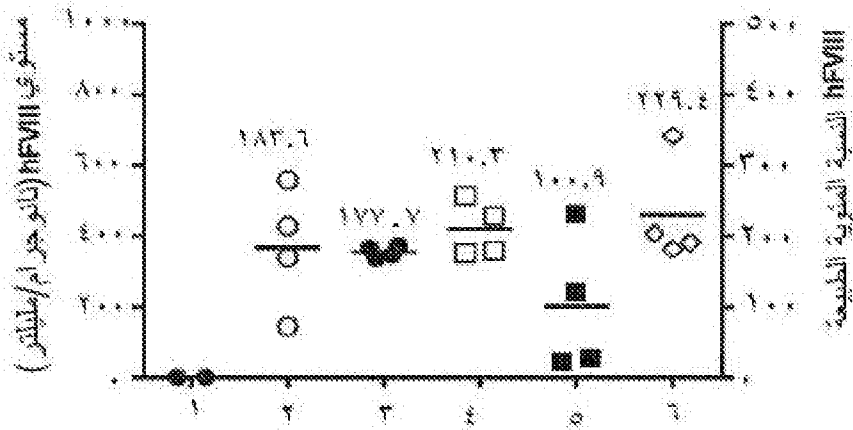
SBR إلكترون ٣.



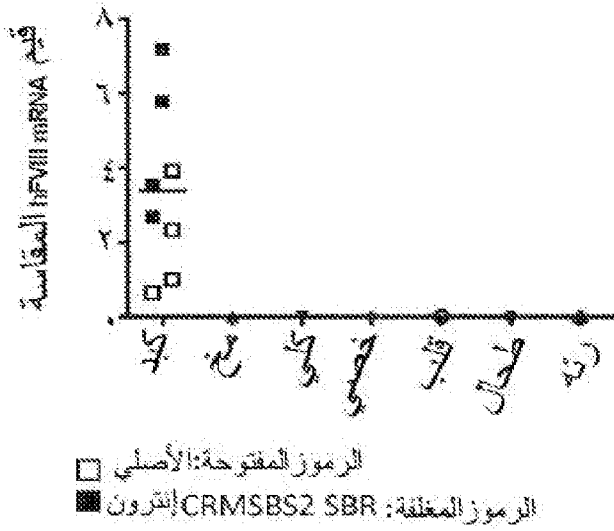
شكل ١٤



شكل ه أ

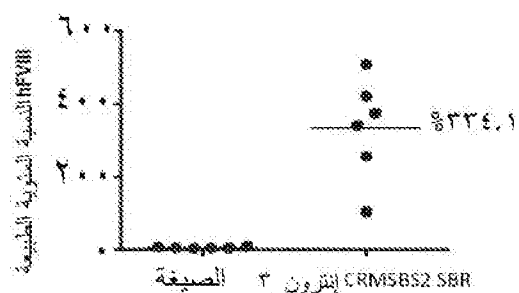


شكل ه اب



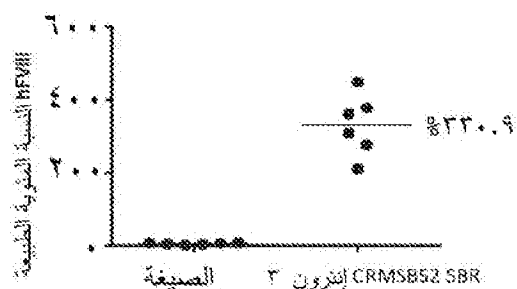
شكل ١٧ أ

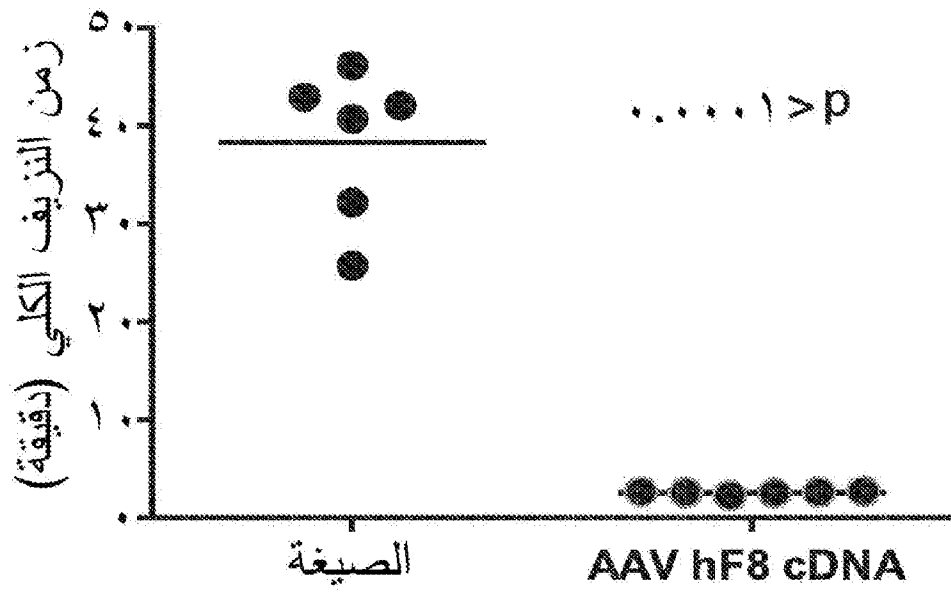
اليوم ١٤



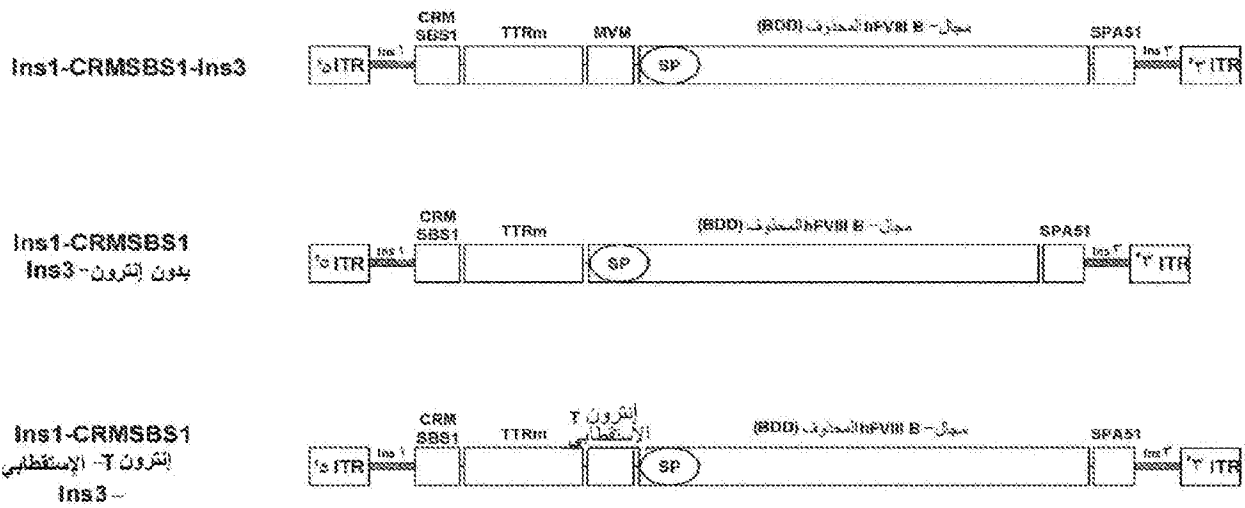
شكل ١٧ ب

اليوم ٤٢

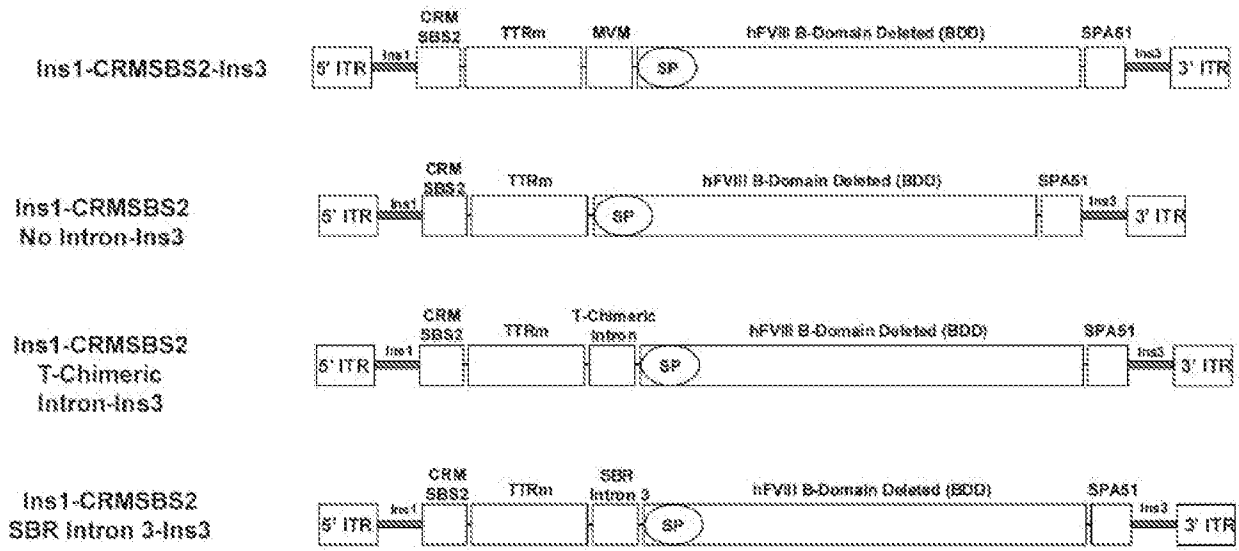




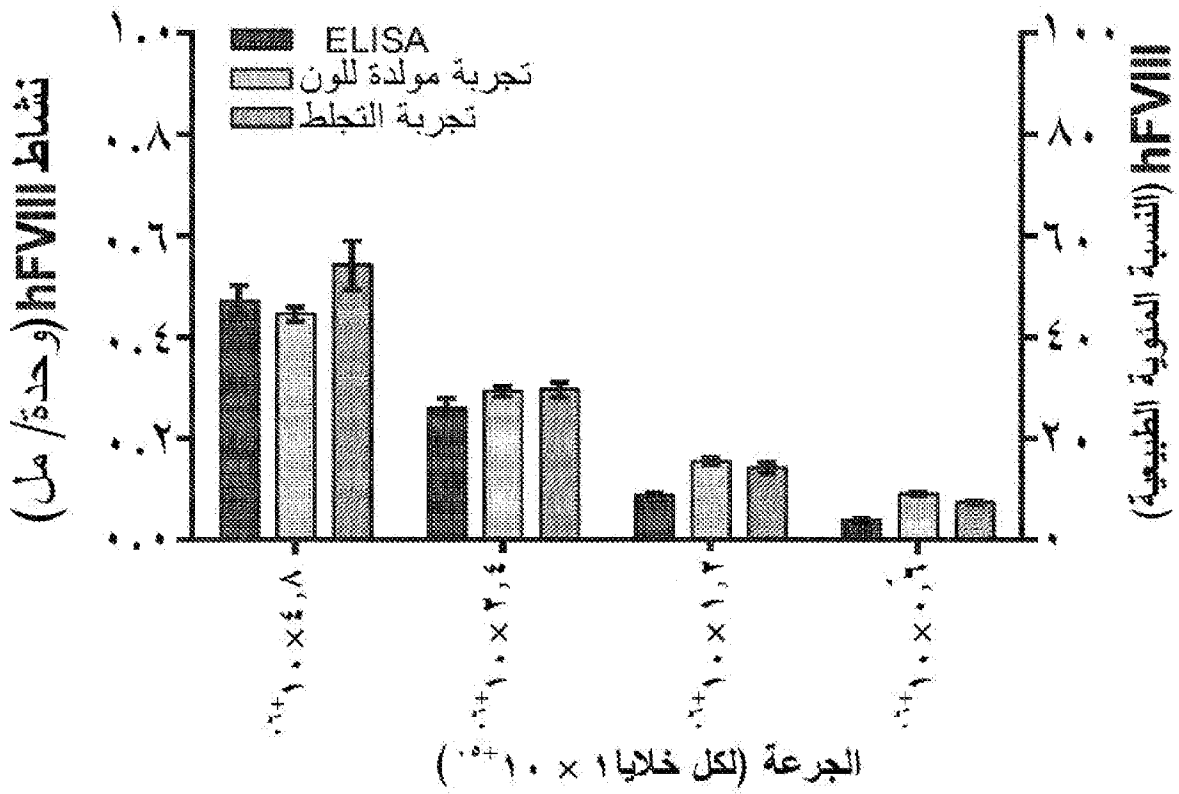
شكل ١٨



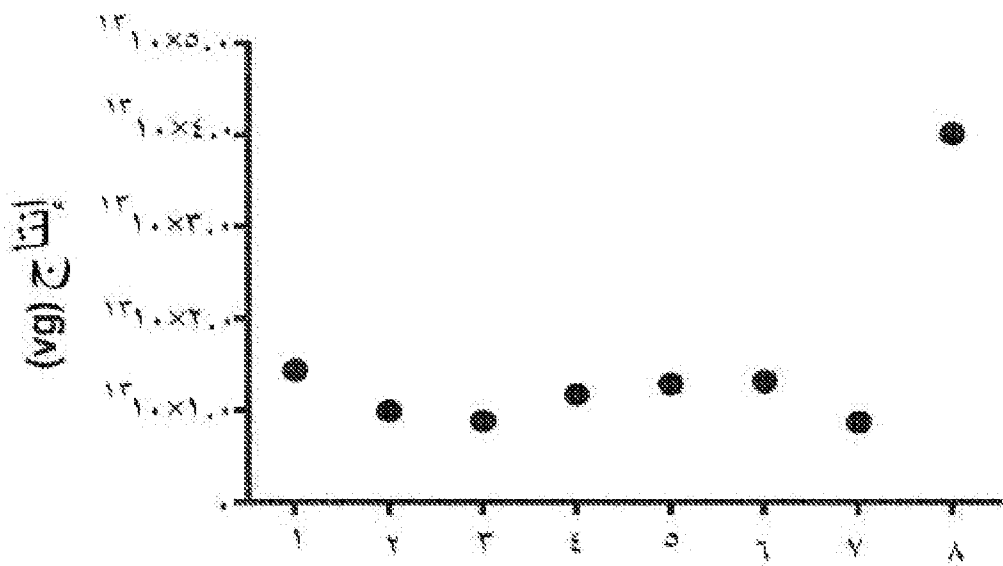
شكل ١٩



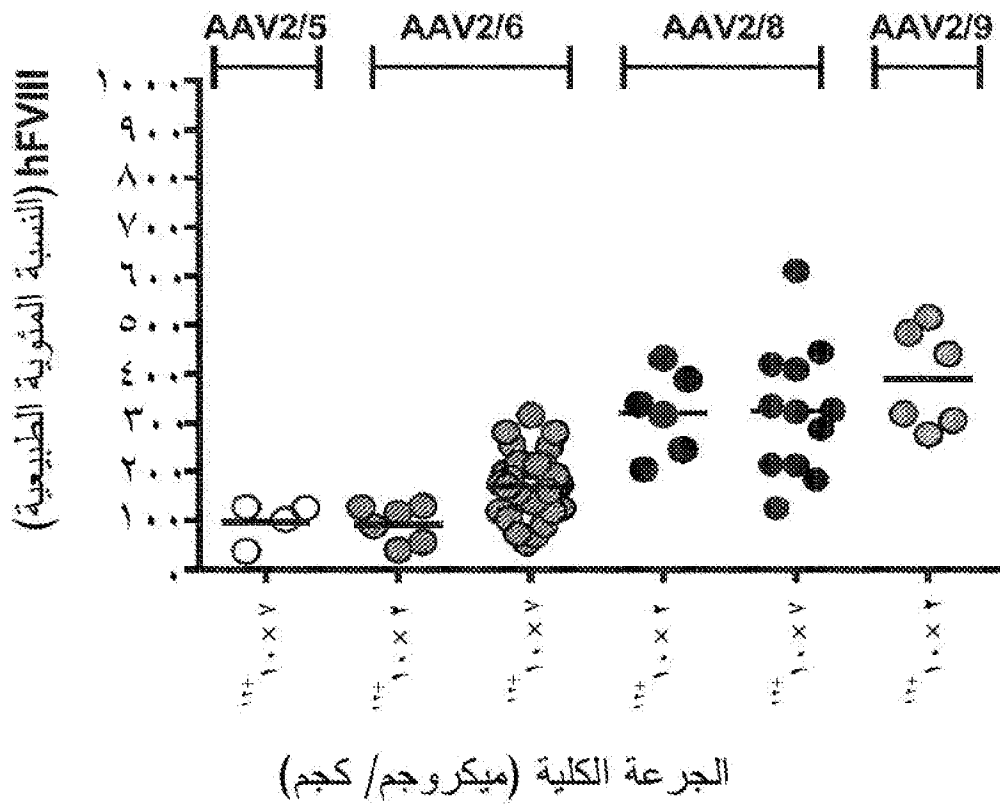
شکل ۲۰



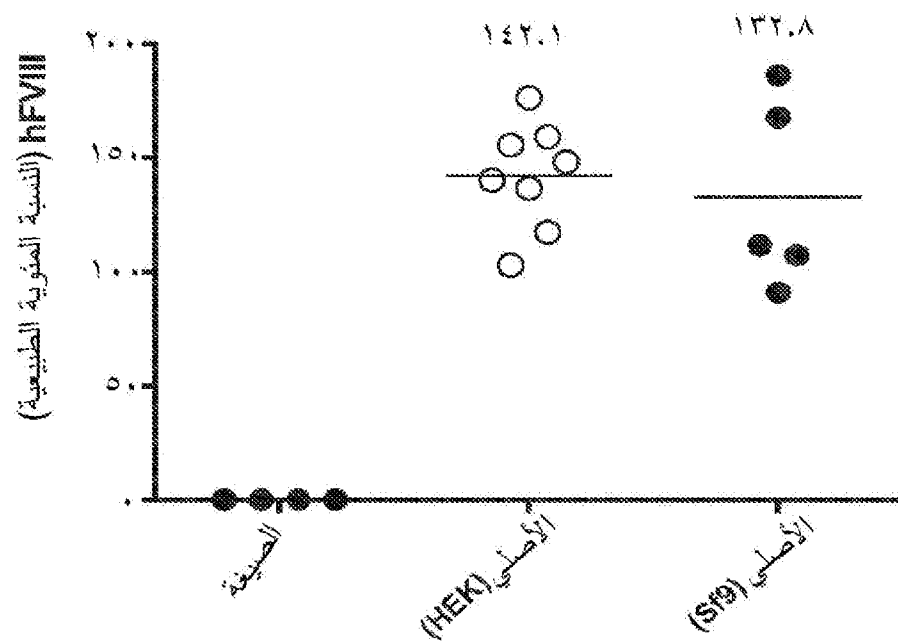
شكل ٢١



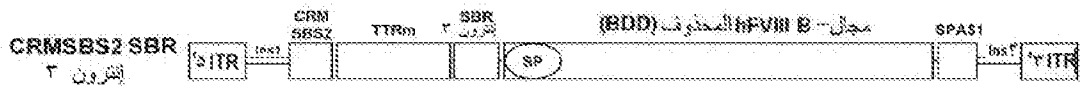
شكل ٢٢



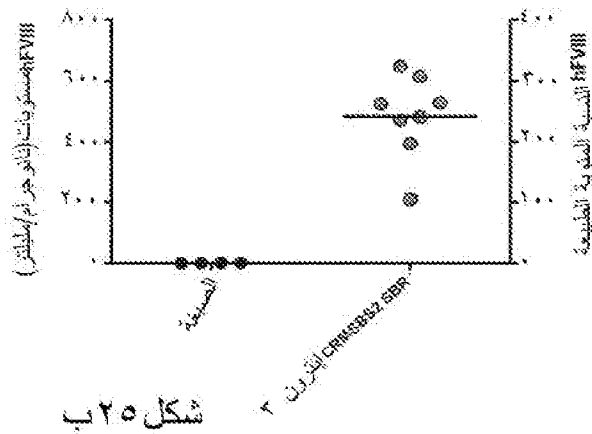
شكل ٢٣



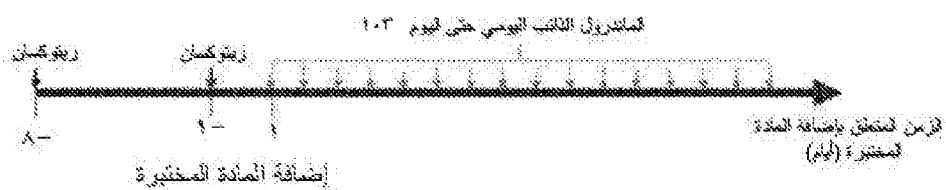
شكل ٢٤



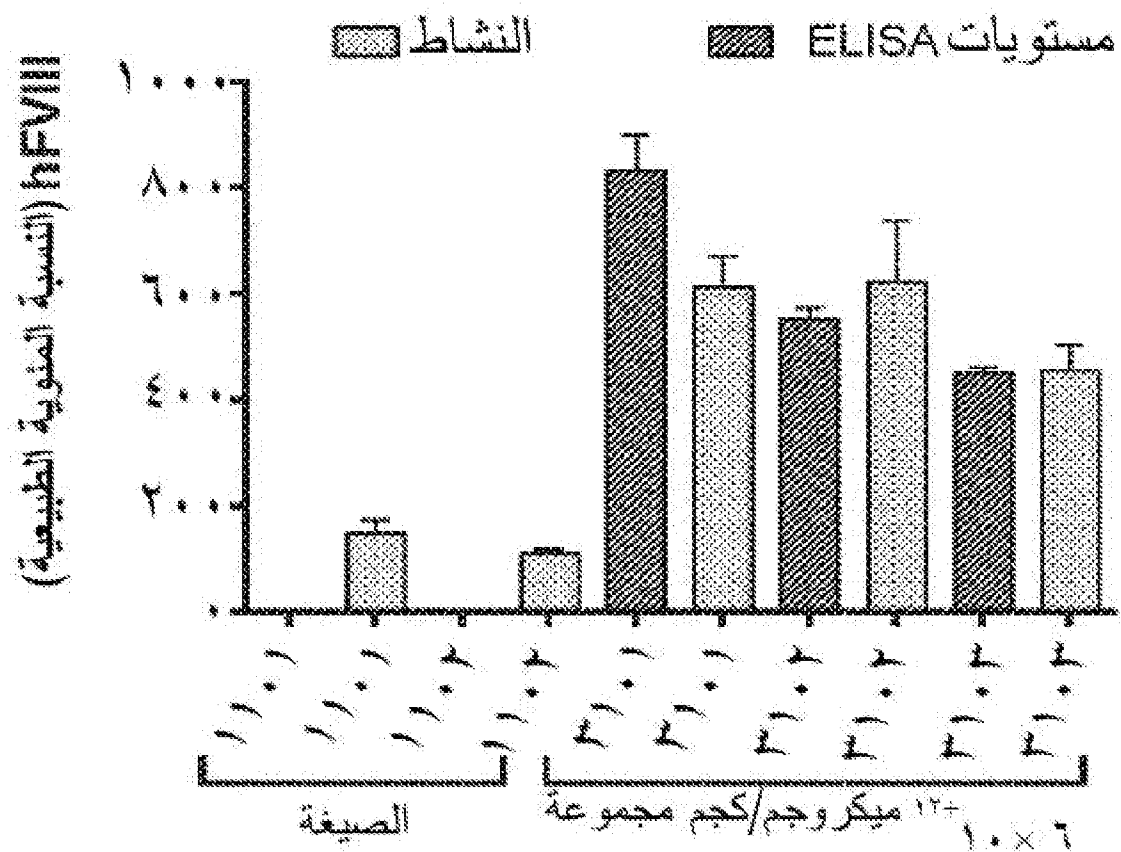
شكل ١٢٥



شكل ٢٥ ب

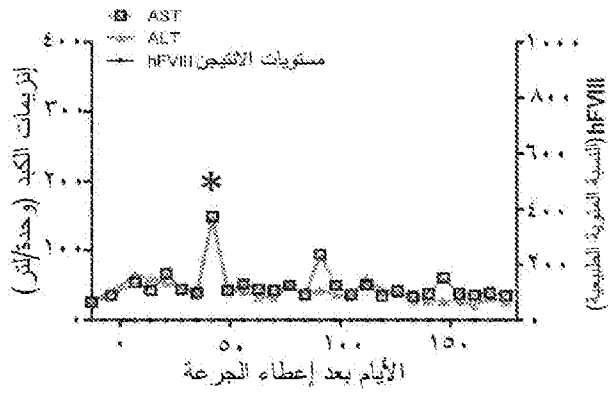


شكل ٢٦

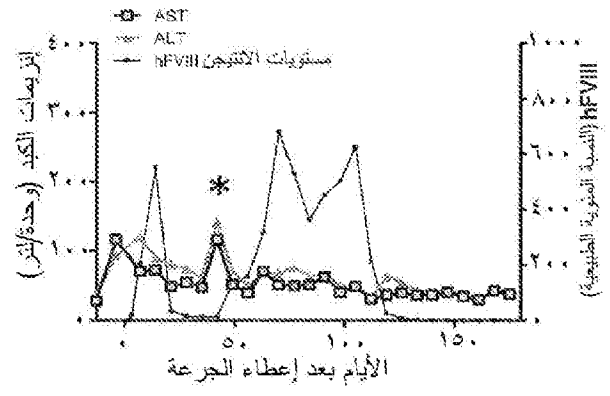


رقم هوية الحيوان

شكل ٢٧

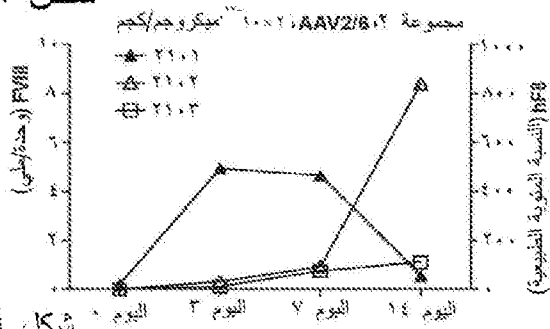


شكل ٢٨ أ

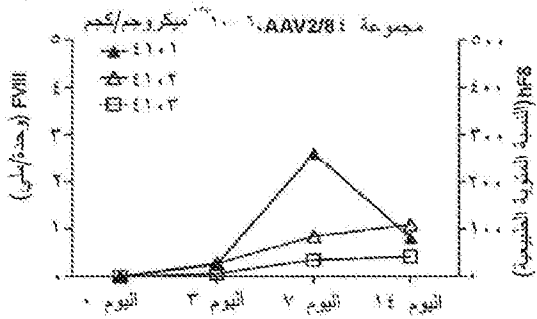


شكل ٢٨ ب

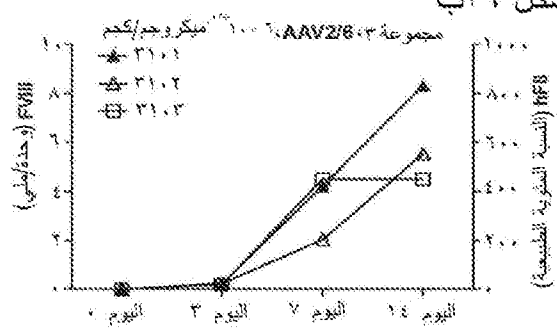
شكل ١٢٩



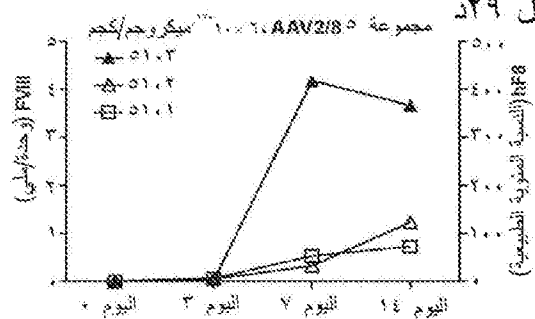
شكل ١٣٠

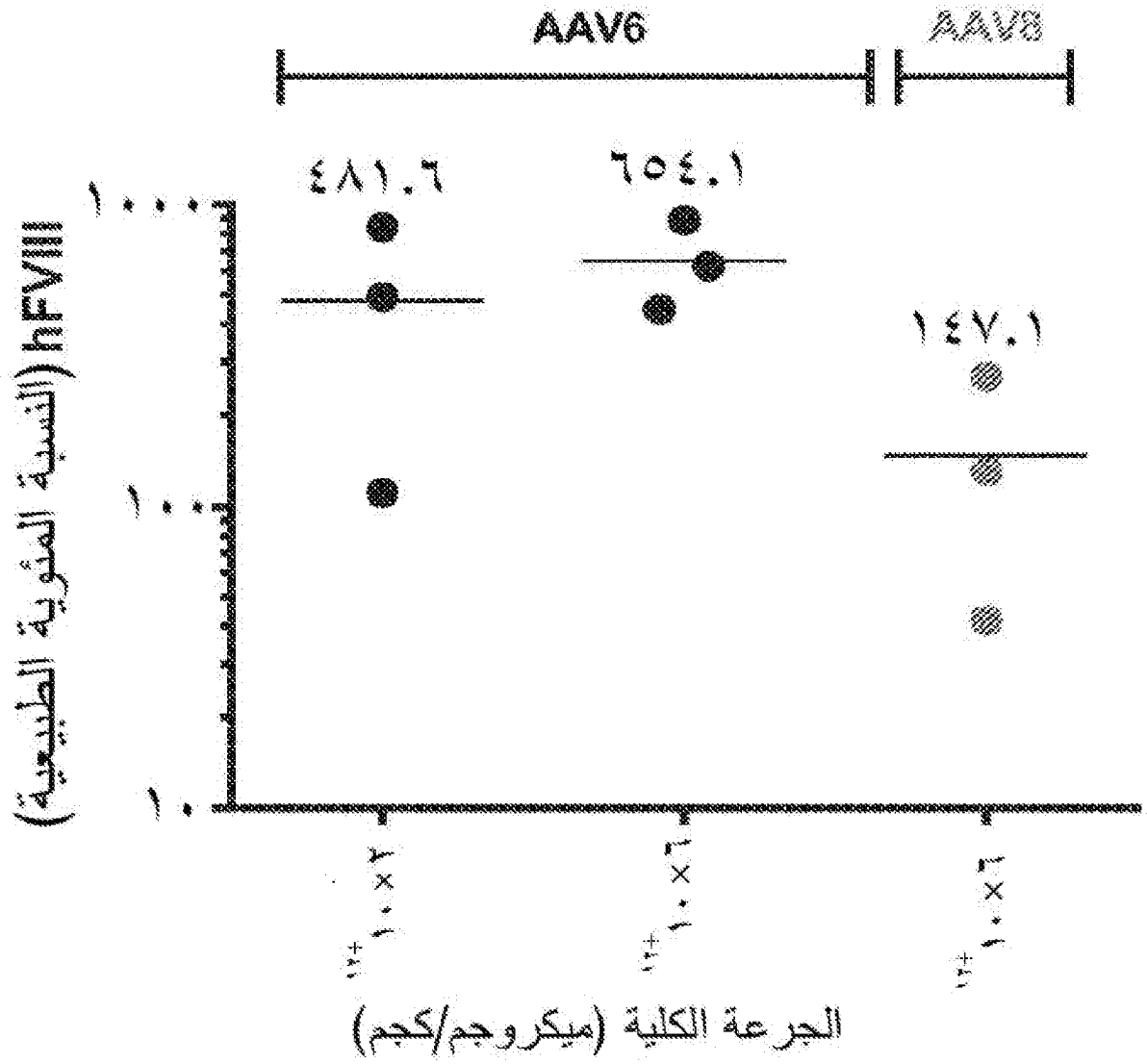


شكل ١٣١



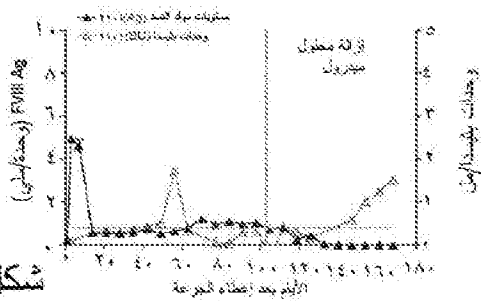
شكل ١٣٢



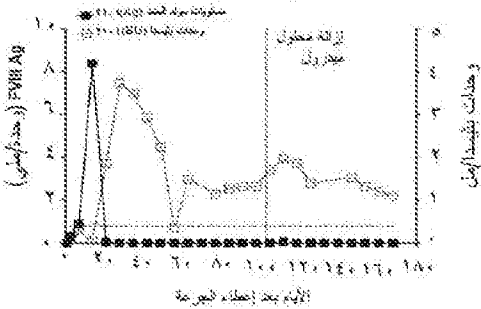


شكل ٣٠

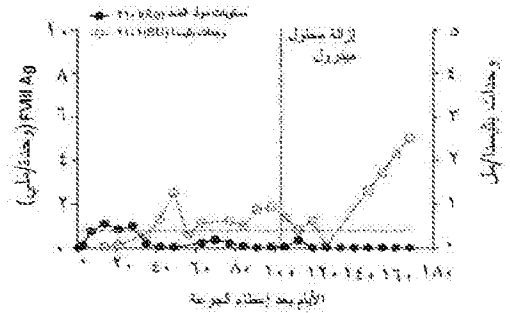
شكل ٣١ أ



شكل ٣١ ب

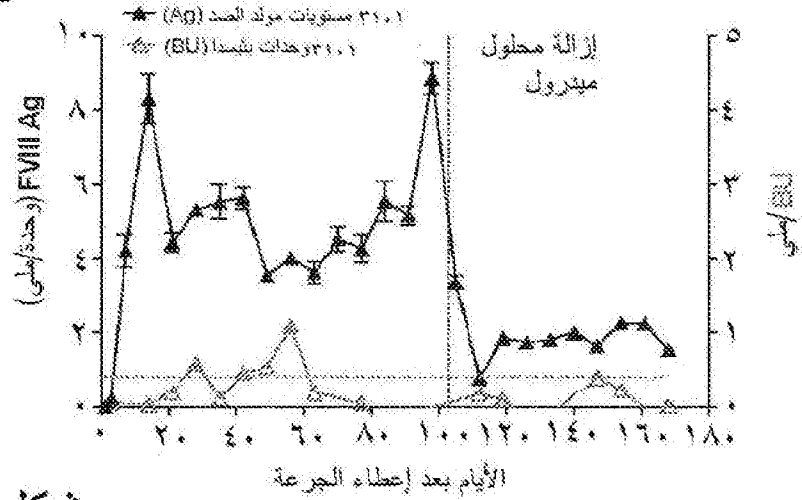


شكل ٣١ ج

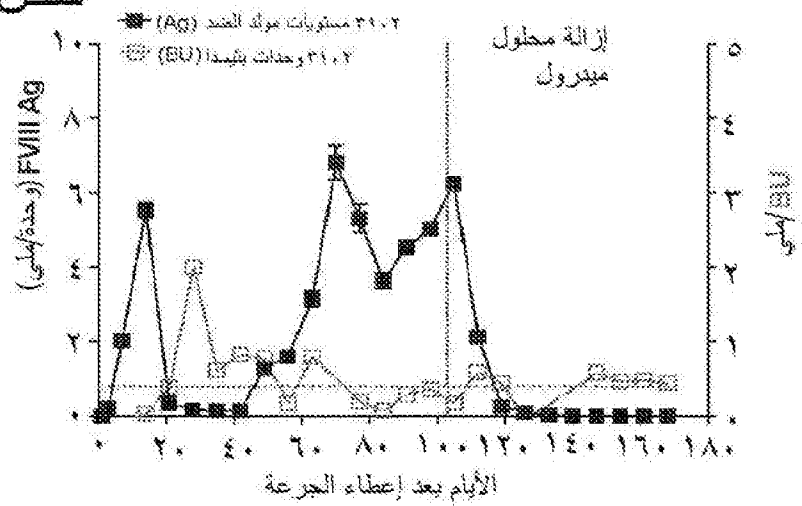


مجموعة AAV2/6 1.0×10^6 ميكروجم/كجم

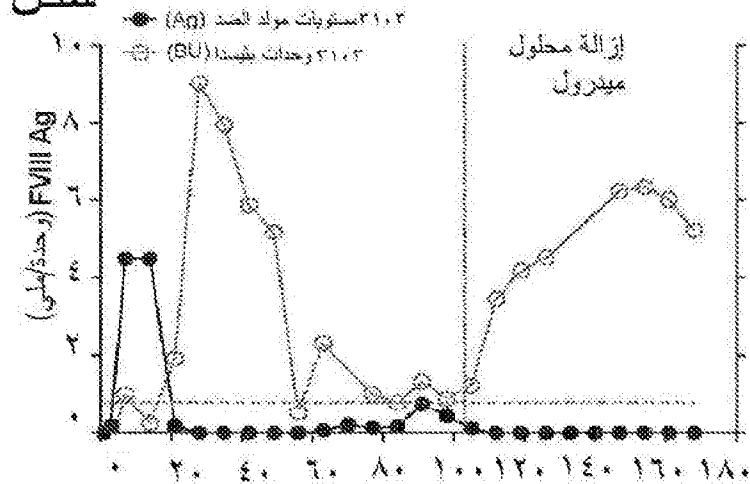
شكل ١٣٢

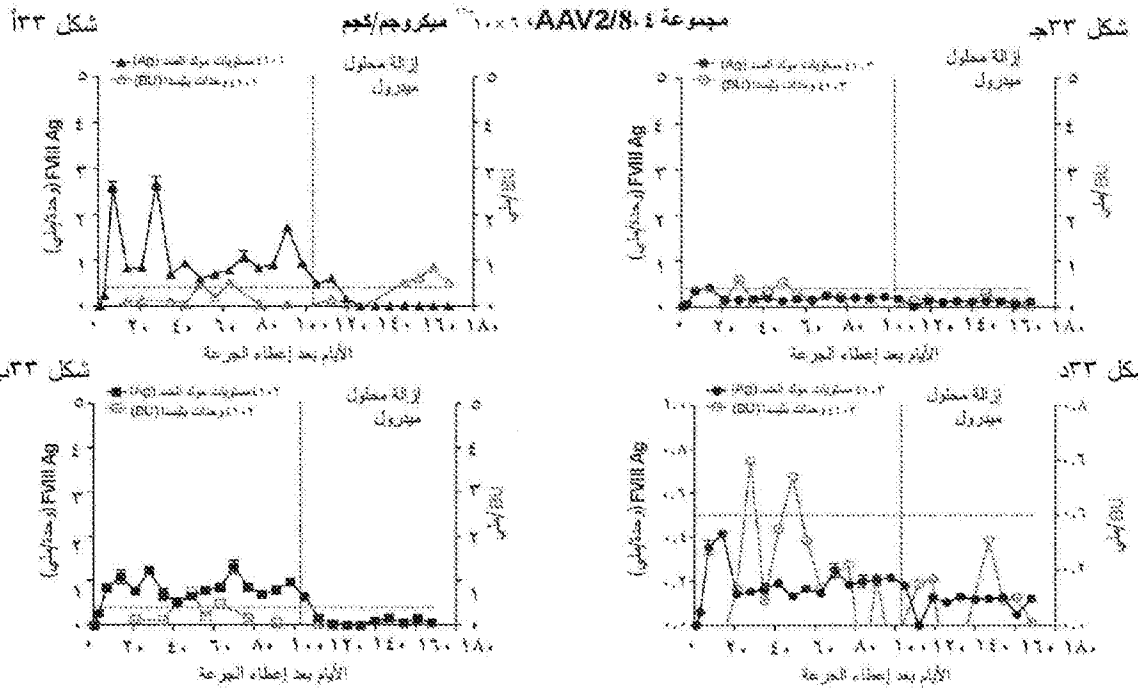


شكل ٣٢ ب

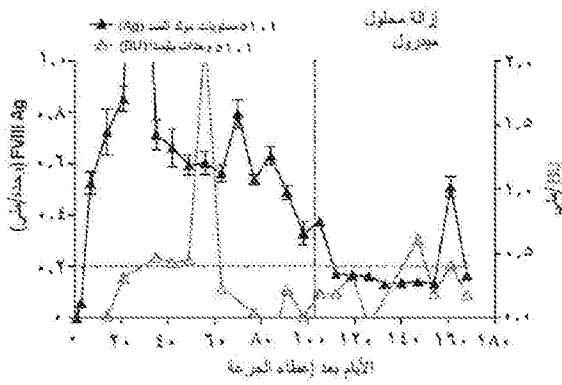


شكل ٣٢ ج

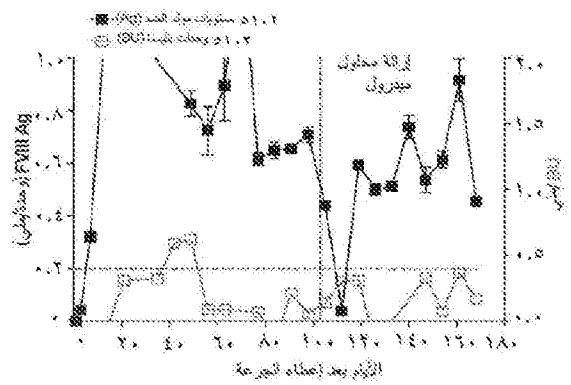




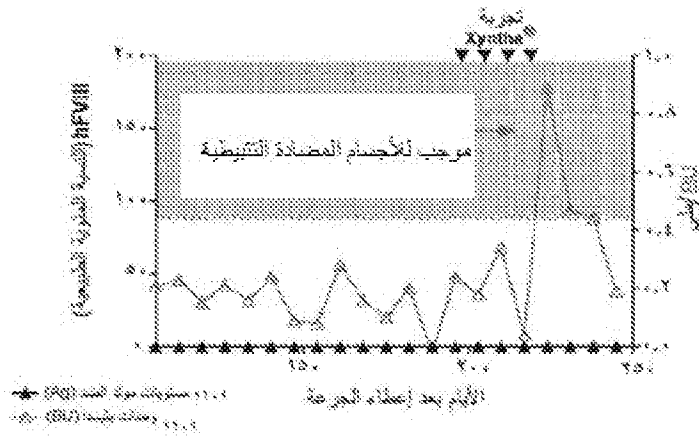
شكل ٤٤



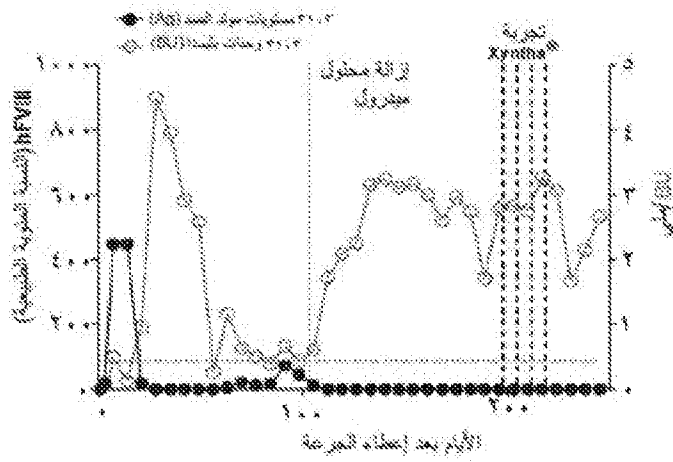
شكل ٤٥



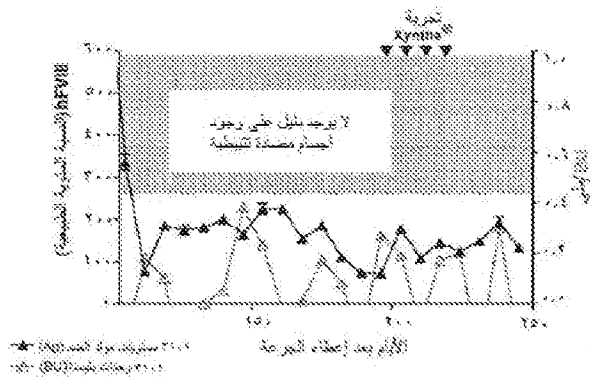
مجموعة ٥. AAV2/8. ١٠٠٠٠٠ ميكروجيم/كجم



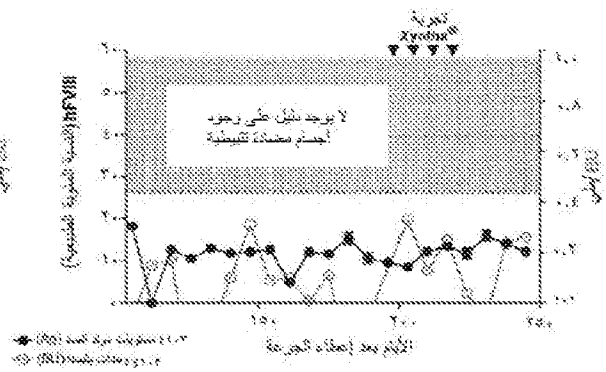
شكل ١٤



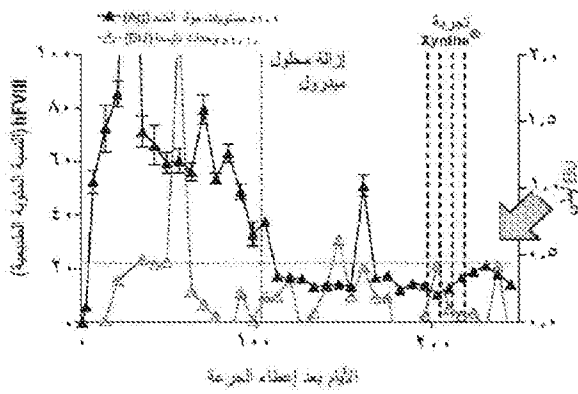
شكل ١٥



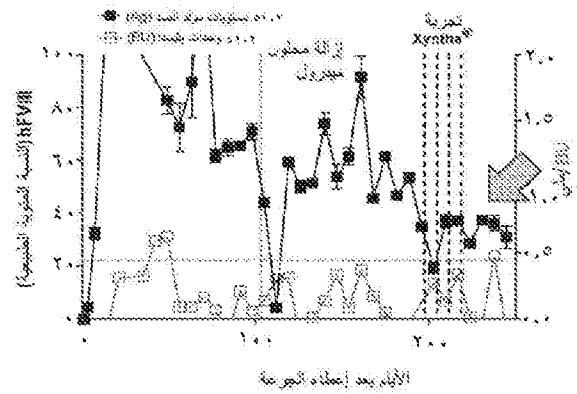
شكل ٣٢



شكل ٣٣

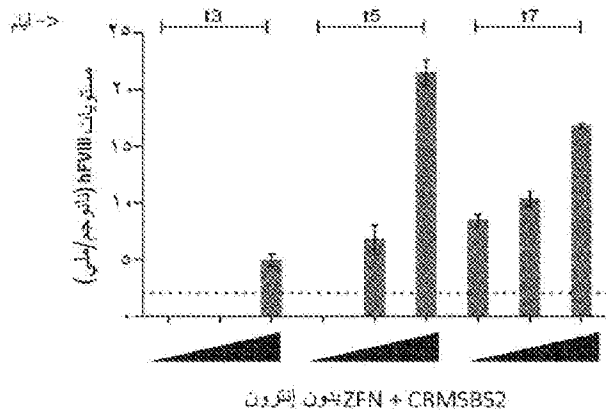


شكل ٤٣

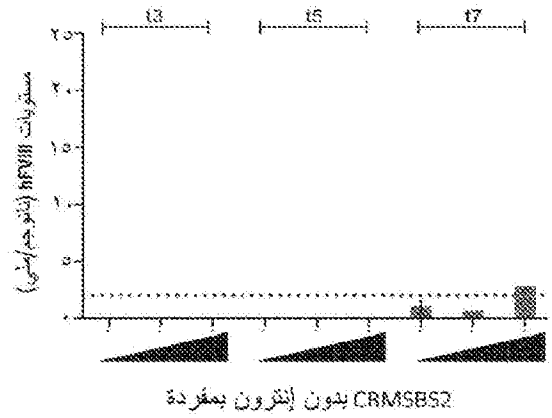


شكل ٤٤

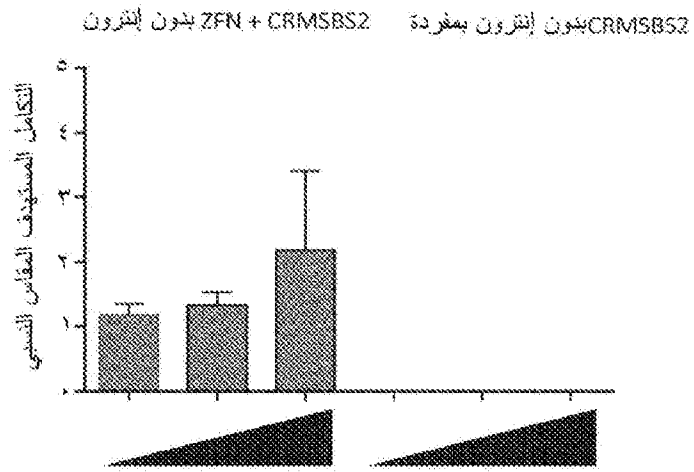
شكل ٣٦ أ



شكل ٣٦ ب



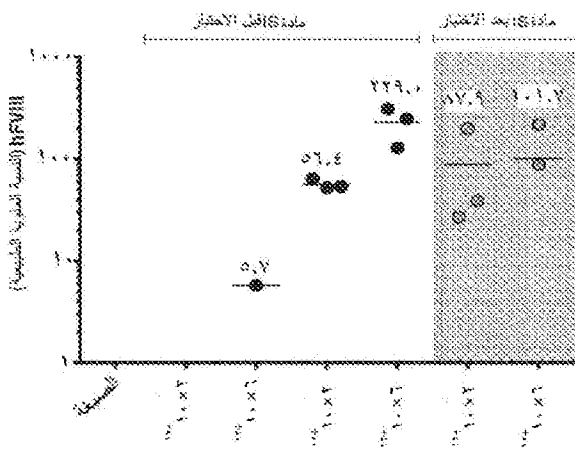
« جرعة ٨٨٧ الميغابايت ودرجات ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢، ١٣، ١٤، ١٥، ١٦، ١٧، ١٨، ١٩، ٢٠، ٢١، ٢٢، ٢٣، ٢٤، ٢٥، ٢٦، ٢٧، ٢٨، ٢٩، ٣٠، ٣١، ٣٢، ٣٣، ٣٤، ٣٥، ٣٦، ٣٧، ٣٨، ٣٩، ٤٠، ٤١، ٤٢، ٤٣، ٤٤، ٤٥، ٤٦، ٤٧، ٤٨، ٤٩، ٥٠، ٥١، ٥٢، ٥٣، ٥٤، ٥٥، ٥٦، ٥٧، ٥٨، ٥٩، ٦٠، ٦١، ٦٢، ٦٣، ٦٤، ٦٥، ٦٦، ٦٧، ٦٨، ٦٩، ٧٠، ٧١، ٧٢، ٧٣، ٧٤، ٧٥، ٧٦، ٧٧، ٧٨، ٧٩، ٨٠، ٨١، ٨٢، ٨٣، ٨٤، ٨٥، ٨٦، ٨٧، ٨٨، ٨٩، ٩٠، ٩١، ٩٢، ٩٣، ٩٤، ٩٥، ٩٦، ٩٧، ٩٨، ٩٩، ١٠٠ »



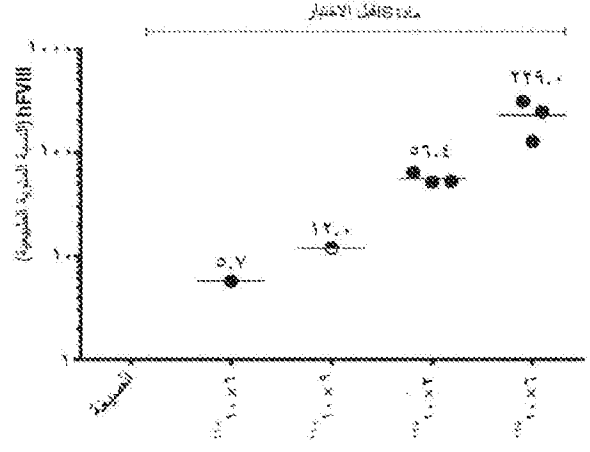
شکل ۳۷

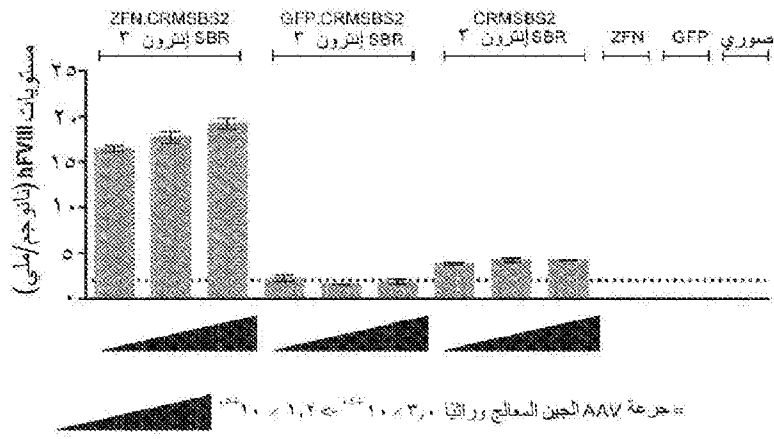
شکل ۳۷

شكل ٢٨

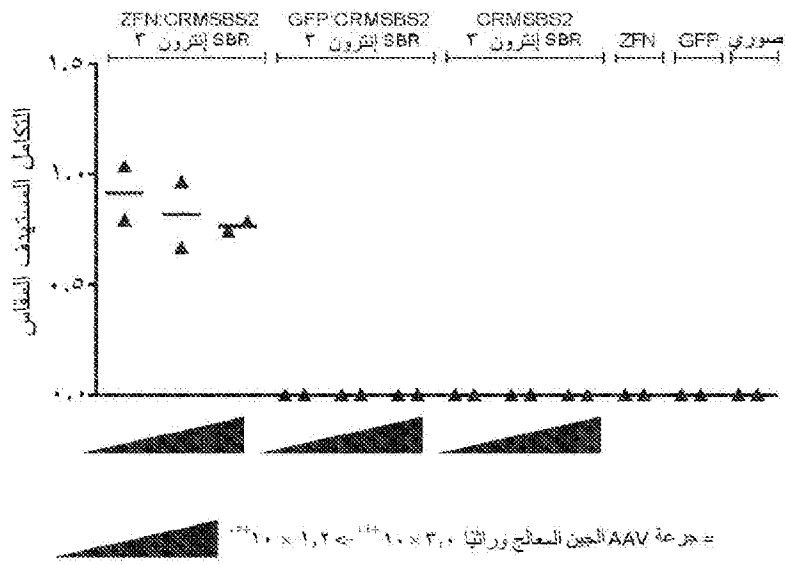


شكل ٢٩





شكل ٤٠ أ



شكل ٤ب



مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية.

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA