الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

براءة اختراع

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

ريسيرش انستيتيوت ات ناشنوايد شيلدرينز هوسبيتال
Research Institute at Nationwide Children's Hospital

براءة اختراع رقم : SA 11475

بتاريخ : 1444/05/01 هـ
الموافق : 2022/11/25 م

عن الإختراع المسمى :

توصيل ناقل فيروس مرتبط بالغدة
J B -
سركوجليكان وميكرونا-29 وعلاج ضمور العضلات

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF -SARCOGLYCAN AND MICRORNA-29 AND THE TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY

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

الرئيس التنفيذي

د. عبدالعزيز بن محمد السويلم

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

[19] **الهيئة السعودية للملكية الفكرية**
[11] **رقم البراءة:** SA 11475 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1444/05/01 هـ
الموافق: 2022/11/25 م

[21] رقم الطلب: 518400245
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1440/02/06 هـ
الموافق: 2018/10/15 م
[30] بيانات الأسبقية:
62/323,333 US 2016/04/15 م
62/433,548 US 2016/12/13 م
[72] اسم المخترع: رودينو – كلاباك لويس، ميندیل جيرى ار
[73] مالك البراءة: ريسيرش انستيتيوت ات ناشنواید شيلدرينز هوسبيتال
عنوانه: 700 شيلدرينز درايف ، روم دبليو 172 ، كولومبوس ، اوهايو 43205 ، الولايات المتحدة الامريكية
جنسيته: امريكية
[74] الوكيل: تركي عبد الكريم عبد الرزاق العليوي
[86] رقم الطلب الدولي: PCT/US2017/027583
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2017/04/14 م
[87] رقم النشر الدولي: WO/2017/180976
تاريخ النشر الدولي: 2017/10/19 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
C12N 015/085, C07K 014/047
A61K 048/000, A61P 021/000
C12N 015/012
[56] المراجع:
ER Pozsgai ET AL" β-Sarcoglycan gene transfer decreases fibrosis and restores force in LGMD2E mice"

ZANOTTI SIMONA ET AL, "Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, AMSTERDAM, NL

Romesh A. Draviam BS ET AL" The β-δ-core of sarcoglycan is essential for deposition at the plasma membrane"

BAODONG SUN ET AL, "Correction of Multiple Striated Muscles in Murine Pompe Disease Through Adeno-associated Virus-mediated Gene Therapy", MOLECULAR THERAPY

POZSGAI ET AL, "172. Pre-Clinical Efficacy Study of Beta-Sarcoglycan Gene Transfer", MOLECULAR THERAPY, United States,

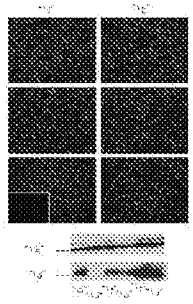
Devin Charles Dressman" AAV-MEDIATED GENE TRANSFER TO MODELS OF MUSCULAR DYSTROPHY: INSIGHTS INTO ASSEMBLY OF MULTI-SUBUNIT MEMBRANE PROTEINS"

الفاحص: حصه بنت عمر البيز

[54] اسم الاختراع: توصيل ناقل فيروس مرتبط بالغدة لـ β-سركوجليكان وميكرونا-29 وعلاج ضمور العضلات
ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF B-SARCOGLYCAN AND MICRORNA-29 AND THE TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بنواقل vectors الفيروس الغدي Adeno-associated virus (AAV)الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني recombinant التي تشتمل على متوالية بولي نوكليوتيد polynucleotide تتضمن β-سركوجليكان β-sarcoglycan وطرق استخدام النواقل الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني recombinant vectors لتقليل أو منع التليف fibrosis لدى الكائنات الثديية التي تعاني من ضمور العضلات muscular dystrophy. كما يصف الاختراع علاجات مشتركة combination therapies تشتمل على إعطاء ناقل (نواقل) الفيروس الغدي التي تعبر عن β-سركوجليكان وmiR-29c إلى الكائنات الثديية التي تعاني من ضمور العضلات. الشكل (5أ)

عدد عناصر الحماية (30)، عدد الأشكال (22)



توصيل ناقل فيروس مرتبط بالغدة لـ β-سركوجليكان وميكرونا-29 وعلاج ضمور العضلات

ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR DELIVERY OF B-SARCOGLYCAN AND MICRORNA-29 AND THE TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يستند هذا الطلب في الأسبقية إلى الطلب الأمريكي المؤقت رقم 62/323.333، المودَع بتاريخ 15 أبريل 2016 والطلب الأمريكي المؤقت رقم 62/433.548 المودَع بتاريخ 13 ديسمبر 2016، حيث يتم تضمينهما كمرجع هنا في مجملهما.

تضمين الإشارة إلى المواد المقدَّمة إلكترونيًا

يحتوي هذا التطبيق، كجزء منفصل من الكشف، على سلسلة متواليات في صورة مقروءة بواسطة الكمبيوتر يتم تضمينها بالإشارة إليها في مجملها ويتم تحديدها على النحو التالي: اسم الملف: 50622A_Seqlisting.txt؛ الحجم: 21.466 بايت، تاريخ الإنشاء: 13 أبريل لعام 2017.

يتم في هذه الوثيقة وصف نواقل علاجية therapy vectors مثل نواقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus (AAV) التي تعبر عن β-سركوجليكان β-sarcoglycan وطريقة استخدام هذه النواقل لتقليل ومنع التليف fibrosis في المرضى الذين يعانون من ضمور العضلات muscular dystrophy. يوفر الاختراع أيضًا طرق علاج جيني مشترك combination gene therapy تشتمل على إعطاء ناقل vector الفيروس الغدي أول يعبر عن β-سركوجليكان وناقل الفيروس الغدي ثاني يعبر عن miR-29 لتقليل ومنع التليف في المرضى الذين يعانون من ضمور العضلات.

إن ضمور عضلات حزام الأطراف Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) من النوع 2E (ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع Limb-girdle muscular dystrophy type 2E 2E اختصارًا (LGMD2E)) عبارة عن اضطراب وراثي صبغي جسدي متنحي autosomal recessive disorder ناتج عن طفرات mutations في تشفير الجين β-سركوجليكان β-sarcoglycan (SGCB)، مما يتسبب في فقدان البروتين الوظيفي functional protein. 1 يمثّل ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E شكلًا شائعًا وشديدًا نسبيًا من مرض ضمور عضلات حزام الأطراف في الولايات المتحدة مع وجود تقارير تشير إلى حدوثه في جميع أنحاء العالم بنسبة 1/200.000-1/350.000. (2) يؤدي غياب β-سركوجليكان إلى الإصابة بالضمور التدريجي progressive dystrophy مع فقدان الألياف العضلية المزمن chronic muscle fiber loss، الالتهابات

inflammation، استبدال الدهون والتليف، وكلها تؤدي إلى تدهور قوة العضلات ووظيفتها. (3، 4) كمعقد، تتسم مركبات سركوجليكان sarcoglycans (-α، β، -γ، δ-)، التي تتراوح في حجمها ما بين 35 و50 كيلو دالتون، (5) بأنها كلها بروتينات عبر الغشاء transmembrane proteins توفر الثبات إلى الغلاف العضلي sarcolemma بما يوفر الحماية من الإجهاد الميكانيكي mechanical stress خلال نشاط العضلة. (3) يؤدي فقدان 3-سركوجليكان 3-sarcoglycan في ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E عادة إلى درجات متفاوتة من الفقد المتزامن لبروتينات سركوجليكان sarcoglycan proteins أخرى تساهم في هشاشة غشاء العضلات fragility of muscle membrane مما يؤدي إلى فقدان الألياف العضلية myofibers. على الرغم من تباين نطاق النمط الظاهري السريري لضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E، يحدث التشخيص عادة قبل سن العاشرة وفقدان المشي في منتصف إلى أواخر سن المراهقة. (1، 6، 7) المرضى الذين يعانون من ارتفاع كرياتين كيناز في المصل serum creatine kinase (CK)، ضعف العضلات القريبة، صعوبة ناشئة عن الفقدان التدريجي للمشي. تحدث إصابة بالقلب Cardiac involvement في ما يصل إلى خمسين بالمائة من الحالات.

إن الفيروس الغدي عبارة عن فيروس صغير يعاني من نقص في النسخ replication-deficient parvovirus، وجينوم genome الحمض النووي مفرد الجديلة الخاص به حوالي 4.7 كيلو قاعدة من حيث الطول متضمنا اثنين من متواليات تكرار طرفية عكسية inverted terminal repeat (ITRs) ذي 145 نوكليوتيد nucleotide. هناك أنماط مصلية متعددة من الفيروس الغدي. ومتواليات النوكليوتيد للجينوم الخاص بأنواع المصل للفيروس الغدي معروفة. على سبيل المثال، يتم تقديم جينوم كامل للفيروس الغدي-1 برقم قيد GenBank هو No. NC_001401 و Srivastava et al., J. Virol., 45: 555-564 (1983)؛ يتم تقديم الجينوم الكامل للفيروس الغدي-3 في رقم قيد GenBank هو NC_1829؛ يتم تقديم الجينوم الكامل للفيروس الغدي-4 في رقم قيد GenBank هو NC_001829؛ يتم تقديم الجينوم الفيروس الغدي-5 في رقم قيد GenBank هو AF085716؛ يتم تقديم الجينوم الكامل للفيروس الغدي-6 في رقم قيد GenBank هو NC_00 1862؛ يتم تقديم أجزاء على الأقل من الجين الفيروس الغدي-7 والفيروس الغدي-8 في أرقام قيد GenBank هي AX753246 وAX753249، على التوالي؛ ويتم تقديم جينوم الفيروس الغدي-9 في Gao *et al., J. Virol.*, 78: 6381-6388 (2004)؛ ويتم تقديم جينوم الفيروس الغدي-10 في *Mol. Ther.*, 13(1): 67-

(2006) 76؛ ويتم تقديم الجينوم الفيروس الغدي-11 في *Virology, 330*(2): 375-383 (2004). يتم تقديم متوالية AAV rh.74 في البراءة الأمريكية رقم 9.434.928 التي يتم تضمينها هنا كمرجع. يتم تضمين المتواليات الفاعلة عند سيس Cis-acting sequences التي توجه نسخ replication (rep) الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) الفيروسي، التغليف/التغليف وتكامل الكروموسوم للخلية المضيفة host cell chromosome في الفيروس الغدي متواليات تكرار طرفية عكسية. يقوم ثلاثة من معززي promoters الفيروس الغدي (وهي p5، p19، و p40 لمواقع الخريطة النسبية) بدفع التعبير عن إطارين للقراءة المفتوحة الفيروس الغدي الداخلية التي تقوم بتشفير الجينات نسخ و كابسيد capsid (cap). يقوم معززان النسخ (وهما p5 و p19)، المقترنين بالتضفير التفاضلي differential splicing للإنترون intron الفيروس الغدي الواحد (على سبيل المثال، في نوكليوتيد 2107 و2227)، بإنتاج أربعة بروتينات النسخ (هي نسخ 78، نسخ 68، نسخ 52، و نسخ 40) من جين النسخ. تمتلك بروتينات النسخ العديد من الخصائص الأنزيمية المسؤولة في النهاية عن تكرار الجينوم الفيروسي viral genome. يتم التعبير عن جين كابسيد من المعزز p40 ويقوم بتشفير ثلاثة بروتينات كابسيد capsid proteins capsid فى بى 1 VP1، فى بى 2 VP2، و فى بى 3 VP3. تعد عمليات الجدْل البديلة ومواقع بدء الترجمة غير التوافقية مسؤولة عن إنتاج بروتينات كابسيد الثلاثة ذات الصلة. يوجد موقع واحد توافقي متعدد التذييل بعديد الأدينيلات single consensus polyadenylation site على موضع الخريطة 95 لجينوم الفيروس الغدي. يتم استعراض دورة حياة وعلم الوراثة للفيروس الغدي في المرجع Muzyczka, *Current Topics in Microbiology and Immunology, 158*: 97-129 (1992).

يمتلك الفيروس الغدي ميزات فريدة تجعله موضع جذب كناقل لتوصيل الحمض النووي الخارجي للخلايا، على سبيل المثال، في العلاج الجيني gene therapy. إن عدوى infection الفيروس الغدي للخلايا في المستنبت culture تكون غير معدية خلويا noncytopathic، وتكون العدوى الطبيعية natural infection للبشر والحيوانات الأخرى صامتة وبلا أعراض. علاوة على ذلك، يصيب الفيروس الغدي العديد من خلايا الثدييات mammalian cells مما يسمح بإمكانية استهداف العديد من الأنسجة tissues المختلفة في داخل جسم الكائن. علاوة على ذلك، يقوم الفيروس الغدي بتحويل الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة ببطء، ويمكن أن يستمر بشكل أساسي في دورة عمر هذه الخلايا كإبيسوم نووي نشيط active nuclear episome تكاثريًا (عنصر خارج الكروموسوم

extrachromosomal element). يتم إدخال الجينوم طليعة الفيروس proviral genome للفيروس الغدي كحمض نووي مستنسخ في البلازميدات plasmids مما يجعل إنشاء جينوم متحور وراثيًا recombinant genomes ممكنا. وعلاوة على ذلك، نظرًا للإشارات التي توجه تكرار الفيروس الغدي، يتم تضمين تغليف الجينوم في متواليات تكرار طرفية عكسية لجينوم الفيروس الغدي، حيث يمكن أن يتم استبدال بعض أو كل الـ 4.3 كيلو قاعدة الداخلية للجينوم (تكرار تشفيري encoding replication وبروتينات كابسيد بنائية structural capsid proteins، نسخ -كابسيد) بحمض نووي خارجي. لتوليد نواقل الفيروس الغدي، يمكن توفير بروتينات نسخ وكابسيد في trans. ميزة أخرى هامة للفيروس الغدي تكمن في أنه فيروس مستقر ومعافى للغاية. من السهل مقاومته للظروف المستخدمة لإبطال نشاط الفيروس الغدي (56 إلى 65 درجة مئوية لعدة ساعات)، مما يجعل الاحتفاظ البارد بالفيروس الغدي أقل أهمية. يمكن تجفيف الفيروس الغدي بالتجميد. وأخيرًا، لا تكون الخلايا المصابة بالتهاب infected cells الفيروس الغدي مقاومة للإصابة بعدوى إضافية superinfection.

أظهرت دراسات متعددة التعبير طويلة المدى عن بروتين بوساطة الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant (< 1.5 سنة) في العضلات. انظر Clark *et al., Hum Gene Ther,* 8: 659-669 (1997); Kessler *et al., Proc Nat. Acad Sc. USA, 93*: 14082-14087 (1996)؛ و Chao *et al., Mol Ther*, 2:619-623 (2000) و Xiao *et al., J Virol, 70*: 8098-8108 (1996). انظر أيضًا Chao *et al., Mol Ther*, 4:217-222 (2001). علاوة على ذلك، نظرا لأن العضلات تكون أوعية دموية بغزارة highly vascularized، فقد أدى تحويل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني إلى ظهور نواتج جين محور transgene products في الدورة الجهازية systemic circulation بعد الحقن في العضل intramuscular injection كما هو موصوف في Herzog *et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94*: 5804-5809 (1997) و Murphy *et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94*: 13921-13926 (1997). علاوة على ذلك، أثبت Lewis *et al., J Virol, 76*: 8769-8775 (2002) أن ألياف العضلة الهيكلية skeletal myofibers تمتلك العوامل الخلوية cellular factors اللازمة من أجل الارتباط الصحيح بالجليكوزيل للجسم المضاد antibody glycosylation، والطي، والإفراز secretion، مما يشير إلى أن العضلات قادرة على التعبير عن علاجات البروتين التي يتم إفرازها secreted protein therapeutics.

تتمثل الصورة الناشئة لعلاج مرض ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E في التوصيل

الجيني بوساطة فيروسية viral-mediated gene delivery لاستعادة البروتين من النوع غير المعالج wild-type protein إلى العضلات المصابة affected muscle مما يؤدي إلى استعادة وظيفة العضلات. وبالنظر إلى إمكانية إصابة مجموعة فرعية من المرضى بمرض القلب cardiomyopathy، (8، 9، 10، 13) فيتوجب أخذ هذا في الاعتبار خلال الرعاية طويلة الأجل لهؤلاء المرضى. في تقارير سابقة، تم تمييز فأرة Sgcb-null بشكل جيد. وقام Araishi وآخرون (3) بتطوير فأر لديه نقص في β-سركوجليكان مصحوبًا بفقدان جميع جزيئات سركوجليكان فضلا عن سركوسبان sarcospan، مع احتفاظ ضئيل على الأقل بالميروسين merosin، جزيئات ديستروجليكان dystroglycans والديستروفين dystrophin، مما يعيد إنتاج الصورة السريرية الملحوظة في ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E. وكانت التغيرات النسيجية histological changes في هذا النموذج الحيواني أيضًا نموذجا أوليا لنظيره السريري، بما في ذلك ظهور تليف العضلات الهيكلية skeletal muscle fibrosis. (14) قام Dressman وآخرون (25) بحقن عضلة البطن العرضية transverse abdominal muscle باستخدام rAAV2.CMV.SGCB. استمر التعبير لمدة 21 شهرًا وتم حماية ألياف العضلات muscle fibers من النخر المتكرر recurrent necrosis. وأدى استخدام الفيروس الغدي المتمم ذاتيًا إلى تحسين التعبير عن الجين المتحور transgene، (16) معزز promoter خاص بعضلة معينة لتحسين العضلة الهيكلية المستهدفة target skeletal muscle (20 و26) وقد تم أيضًا وصف تحسين جين β-سركوجليكان البشري human β-sarcoglycan gene (hSGCB).

إن التحسن الوظيفي في المرضى الذين يعانون من ضمور عضلات حزام الأطراف وأنواع ضمور العضلات الأخرى يتطلب كلا من استعادة الجينات وتقليل التليف. هناك حاجة إلى طرق للحد من التليف التي قد تكون مقترنة بطرق استعادة الجينات لعلاج أكثر فعالية لمرض ضمور عضلات حزام الأطراف وغيره من أنواع ضمور العضلات.

الوصف العام للاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بوصف نواقل العلاج الجيني gene therapy vectors، على سبيل المثال الفيروس الغدي، التي تعبر عن جين β-سركوجليكان وطرق توصيل β-سركوجليكان إلى العضلة لتقليل و/أو منع التليف؛ و/أو زيادة القوة العضلية muscular force، و/أو علاج β-سركوجليكان لدى شخص من الثدييات يعاني من ضمور العضلات.

بالإضافة إلى ذلك، يوفر الاختراع علاجات مشتركة combination therapies وطرق تستخدم نواقل العلاج الجيني لتوصيل β-سركوجليكان لمعالجة عيوب الجينات الملحوظة في ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E ونواقل العلاج الجيني التي توصل miR-29 لمزيد من تثبيط التليف.

في أحد الجوانب، يتعلق الاختراع بوصف ناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على متوالية بولي نوكليوتيد polynucleotide تشفر β-سركوجليكان. في بعض التجسيدات، تشتمل متوالية البولي نوكليوتيد التي تشفر β-سركوجليكان على متوالية تتطابق بنسبة تبلغ على سبيل المثال 65٪ على الأقل، 70٪ على الأقل، 75٪ على الأقل، 80٪على الأقل، 81٪، 82٪، 83٪، 84٪، 85٪، 86٪، 87٪، 88٪، أو 89٪، يُفضل أكثر بنسبة 90٪، 91٪، 92٪، 93٪، 94٪، 95٪، 96٪، 97٪، 98٪، 99٪ أو أكثر مع متوالية النوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 1 وتشفر البروتين الذي يحتفظ بنشاط β-سركوجليكان. في بعض التجسيدات، تشتمل متوالية البولي نوكليوتيد التي تشفر β-سركوجليكان على متوالية النوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 1. في بعض التجسيدات، تتكون متوالية البولي نوكليوتيد التي تشفر β-سركوجليكان من متوالية النوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 1.

في جانب آخر، يشتمل ناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني الموصوف هنا على متوالية بولي نوكليوتيد تشفر β-سركوجليكان تتطابق بنسبة 65٪ على الأقل، 70٪ على الأقل، 75٪ على الأقل، 80٪ على الأقل، 81٪، 82٪، 83 ٪، 84٪، 85٪، 86٪، 87٪، 88٪، أو 89٪، أكثر من 90٪ على الأقل، 91٪، 92٪، 93٪، أو 94٪، و95٪ على الأقل، 96٪ على الأقل أو 97٪ أو 98٪ أو 99٪ مع متوالية الحمض الأميني amino acid ذات رقم تعريف المتوالية: 2، ويحتفظ البروتين بنشاط β-سركوجليكان.

في جانب آخر، يتعلق الاختراع بوصف ناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على متوالية بولي نوكليوتيد تشفر β-السركوجليكان الوظيفي الذي يشتمل على متوالية نوكليوتيد تتجهن في ظل ظروف صارمة إلى متوالية حمض نووي nucleic acid برقم تعريف المتوالية: 1، أو متمم لها.

يُستخدم مصطلح "صارم" للإشارة إلى الظروف المفهومة بشكل شائع في المجال على أنها صارمة. يتم تحديد صرامة التهجين Hybridization بشكل أساسي من خلال درجة الحرارة والقوة الأيونية ionic strength وتركيز عوامل تغيير الدنترة denaturing agents مثل الفورماميد formamide. تتمثل

أمثلة للشروط الصارمة للتهجين والغسيل فيما يلي: 0.015 مولار من كلوريد الصوديوم sodium chloride، 0.0015 مولار من سيترات الصوديوم sodium citrate عند 65-68 درجة مئوية أو 0.015 مولار من كلوريد الصوديوم، 0.0015 مولار من سيترات الصوديوم، و50٪ فورماميد عند 42 درجة مئوية. انظر Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). يمكن أيضًا استخدام ظروف أكثر صرامة (مثل ارتفاع درجة الحرارة، وانخفاض القوة الأيونية، وارتفاع الفورماميد، أو غيرها من عوامل الدنترة)، ومع ذلك، فإن معدل التهجين سيتأثر. في الحالات التي يكون فيها تهجين وحدات ديوكسي أوليجو نوكليوتيد deoxyoligonucleotides معنيًا، تشتمل حالات التهجين الصارمة الإضافية التوضيحية على الغسل في أس أس سى 6× SSC بنسبة 0.05٪ من بيروفوسفات الصوديوم sodium pyrophosphate عند 37 درجة مئوية (لـ 14-أوليجو قاعدة base oligos)، 48 درجة مئوية (لـ 17-أوليجو قاعدة)، 55 درجة مئوية (لـ 20-أوليجو قاعدة)، و60 درجة مئوية (لـ 23-أوليجو قاعدة).

يمكن تضمين عوامل أخرى في المحاليل المنظمة buffers للتهجين والغسيل بغرض تقليل التهجين غير المحدد و/أو في الركيزة. وتتضمن الأمثلة على ذلك 0.1٪ من ألبومين المصل البقري bovine serum albumin، و0.1٪ من بولى ڤينيل بيروليدون polyvinyl-pyrrolidone، و0.1٪ من بيروفوسفات الصوديوم، و0.1٪ من دوديسيل سلفيت الصوديوم sodium dodecylsulfate، و دوديسيل سلفيت الصوديوم sodium dodecylsulfate (NaDodSO4)، دوديسيل سلفيت الصوديوم sodium dodecylsulfate (SDS)، وficoll، ومحلول Denhardt، و الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين للحيوانات المنوية للسالمون المعرض للموجات الصوتية sonicated salmon sperm (أو غيره من الحمض النووي غير التكميلي)، وديكستران سلفات dextran sulfate برغم إمكانية استخدام عوامل أخرى مناسبة. يمكن تغيير تركيز وأنواع هذه المضافات دون التأثير بشكل كبير على صرامة ظروف التهجين. عادة ما يتم إجراء تجارب التهجين عند الرقم الهيدروجيني 6.8-7.4، ومع ذلك، في ظروف القوة الأيونية النموذجية، يكون معدل التهجين مستقلًا تقريبًا عن الرقم الهيدروجيني. انظر Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England). يمكن تعديل ظروف التهجين من قِبَل الشخص الماهر في المجال من أجل استيعاب هذه المتغيرات والسماح بقيام الأحماض النووية من مختلف المتواليات

ذات الصلة بتشكيل أنواع الهجين.

في جانب آخر، يمكن ربط نواقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant Adeno-associated virus (rAAV) الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني الموصوفة هنا بعنصر مقارنة خاص بعضلة محددة بفعالية muscle-specific control element. على سبيل المثال، يكون عنصر المقارنة الخاص بالعضلة عنصر جين أكتين هيكلي بشري human skeletal actin gene، عنصر جين أكتين قلبي cardiac actin gene، عامل ارتباط binding factor محسن خاص بخلية عضلية معينة myocyte-specific enhancer أم إى أف MEF، كرياتين كيناز عضلي muscle creatine kinase (MCK)، tMCK (كرياتين كيناز عضلي مقتضب truncated muscle creatine kinase)، سلسلة ثقيلة للميوسين myosin heavy chain (MHC)، MHCK7 (نسخة مهجنة hybrid version من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي)، C5- 12 (معزز تخليقي synthetic promoter)، عنصر محسن enhancer element كرياتين كيناز فأري murine creatine kinase، عنصر جين gene element تروبونين C هيكلي سريع التحويل skeletal fast-twitch troponin C، عنصر جين تروبونين C قلبي بطيء التحويل slow-twitch cardiac troponin C، عنصر جين تروبونين I بطيء التحويل slow-twitch troponin I، عوامل نووية قابلة للحث بنقص التأكسج hypozia-inducible nuclear factors، عنصر قابل للحث بالستيرويد steroid-inducible element أو عنصر استجابة للجلوكوكورتيكويد glucocorticoid response element (GRE).

في بعض التجسيدات، يكون المعزز الخاص بعضلة معينة muscle-specific promoter هو نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي (رقم تعريف المتوالية: 4). هناك الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني توضيحي موصوف هنا هو pAAV.MHCK7.hSCGB الذي يشتمل على متوالية النوكليوتيد برقم تعريف المتوالية: 3؛ حيث يمتد المعزز أم سى اتش كيه 7 MCHK7 بطول 130-921 نوكليوتيد، يمتد الإنترون الخيمري أس فى 40 SV40 SV40 chimeric intron بطول 931-1078 نوكليوتيد، يمتد β-سركوجليكان بطول 1091-2047 نوكليوتيد ويمتد poly A بطول 2054-2106 نوكليوتيد.

في بعض التجسيدات، يكون المعزز الخاص بعضلة معينة هو كرياتين كيناز عضلي مقتضب (رقم تعريف المتوالية: 6). هناك الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني توضيحي موصوف هنا هو pAAV.tMCK.hSCGB الذي يشتمل على متوالية النوكليوتيد برقم تعريف المتوالية: 3؛ حيث

يمتد المعزز MCHK7 بطول 141-854 نوكليوتيد، يمتد الإنترون الخيمري SV40 بطول 886-1018 نوكليوتيد، يمتد β-سركوجليكان بطول 1058-2014 نوكليوتيد ويمتد poly A بطول 2021-2073 نوكليوتيد.

يمكن أن يكون الفيروس الغدي أي نمط مصلي، على سبيل المثال الفيروس الغدي 1، الفيروس الغدي 2، الفيروس الغدي 3، الفيروس الغدي 4، الفيروس الغدي 5، الفيروس الغدي 6، الفيروس الغدي 7، الفيروس الغدي 8، الفيروس الغدي 9، الفيروس الغدي-10، الفيروس الغدي-11، الفيروس الغدي-12، الفيروس الغدي-13 و AAV rh.74. يتم الكشف عن إنتاج الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الكاذب في، على سبيل المثال، الطلب الدولي 01/83692. كما يتم مراعاة أنواع أخرى من الصور المتغيرة للفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، على سبيل المثال الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني مع طفرات كابسيد capsid mutations، انظر على سبيل المثال المرجع Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014).

يتم أيضًا مراعاة تركيبات تشتمل على أي من نواقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الموصوفة هنا.

يقدم الاختراع أيضًا طرق إنتاج ناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على استنبات خلية تم تحويرها وراثيا بأي ناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني موصوف هنا واستخلاص جسيمات الفيروس الغدي الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني من المادة الطافية للخلايا المتحورة وراثيا supernatant of transfected cells. يراعي الاختراع أيضًا الجسيمات الفيروسية Viral particles التي تشمل أي من نواقل الفيروس الغدي الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني الموصوفة هنا.

يتم أيضًا توفير طرق تقليل التليف في كائن ثديي في حاجة لذلك. في هذا الصدد، تشتمل الطريقة على إعطاء كمية فعالة علاجيًا من ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا (أو التركيبة التي تشتمل على ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا) إلى الخاضع للعلاج الثديي. في بعض التجسيدات، يعاني الخاضع للعلاج الثديي من ضمور عضلي. في بعض التجسيدات، يقلل إعطاء ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا (أو التركيبة التي تشتمل على ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا) من التليف في العضلات الهيكلية skeletal muscle أو في العضلة القلبية cardiac muscle للكائن. قد تشتمل هذه الطرق أيضًا على خطوة إعطاء ناقل الفيروس الغدي ثانٍ ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على

متوالية بولي نوكليوتيد متضمنة لـ miR29C.

يشير مصطلح "ضمور العضلات" كما هو مستخدم هنا إلى اضطراب تتدهور فيه قوة وكتلة العضلات muscle bulk تدريجيًا. يمكن أن تشتمل الأمثلة غير المقيدة لأمراض ضمور العضلات muscular dystrophy diseases على ضمور العضلات لبيكر Becker muscular dystrophy، ضمور العضلات الظنبوبي tibial muscular dystrophy، ضمور العضلات لـ Duchenne، ضمور العضلات لـ Emery-Dreifuss، ضمور العضلات الوجهي الكتفي العضدي facioscapulohumeral muscular dystrophy، اعتلال مرتبط بالسركوجليكان sarcoglycanopathies، ضمور العضلات الخلقي congenital muscular dystrophy مثل ضمور العضلات الخلقي الناجم عن نقص ألفا أيه أم أيه 2 LAMA2 الجزئي، ضمور العضلات الخلقي الناجم عن نقص الميروسين، ضمور العضلات الخلقي من النوع 1D، ضمور العضلات الخلقي لفوكوياما Fukuyama congenital muscular dystrophy، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 1A، ضمور العضلات في حزام الطرف من نوع 2A، ضمور العضلات في حزام الطرف من نوع 2B، ضمور العضلات في حزام الطرف من نوع 2C، ضمور العضلات في حزام الطرف من نوع 2D، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 2E، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 2F، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 2G، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 2H، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 2I، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع 2J، ضمور العضلات في حزام الطرف من النوع بى سى IC، ضمور العضلات الفقري المتصلب rigid spine muscular dystrophy مع انحلال البشرة الفقاعي البسيط epidermolysis bullosa simplex، ضمور العضلات العيني المريئي oculopharyngeal muscular dystrophy، ضمور العضلات الخلقي لـ Ullrich Ullrich congenital muscular dystrophy، ضمور العضلات. في بعض التجسيدات، يعاني الخاضع للعلاج من ضمور عضلات حزام الأطراف. في بعض التجسيدات، يعاني الخاضع للعلاج من ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E (اختصارًا LGMD2E)

يشير مصطلح "تليف" كما هو مستخدم هنا إلى الترسيب المفرط أو غير المنظم لمكونات المصفوفة خارج الخلية extracellular matrix (ECM) وعمليات الإصلاح غير الطبيعية في الأنسجة عند الإصابة بما في ذلك العضلات الهيكلية والعضلة القلبية والكبد liver والرئة lung والكلى kidney

والبنكرياس pancreas. تشتمل مكونات المصفوفة خارج الخلية التي يتم ترسيبها على الكولاجين collagen، على سبيل المثال الكولاجين 1، الكولاجين 2 أو الكولاجين 3، والفيبرونكتين fibronectin.

في جانب آخر، يصف الاختراع هنا طريقة لزيادة القوة العضلية و/أو كتلة العضلات في كائن ثديي تشتمل على إعطاء كمية فعالة علاجيًا من ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا (أو التركيبة التي تشتمل على ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا) إلى الخاضع للعلاج الثديي.

في أي من طرق الاختراع، قد يعاني الخاضع للعلاج من ضمور عضلي مثل ضمور عضلات حزام الأطراف أو أي ضمور عضلي آخر متعلق بالديستروفين.

كما تم توفير طريقة لعلاج ضمور العضلات في خاضع للعلاج ثديي تشتمل على إعطاء كمية فعالة علاجيًا من ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا (أو التركيبة التي تشتمل على ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا) إلى الخاضع للعلاج الثديي. في بعض التجسيدات، يكون ضمور العضلات هو ضمور عضلات الأطراف. قد تشمل أي من الطرق الموصوفة هنا كذلك خطوة إعطاء ناقل ثانٍ الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على متوالية بولي نوكليوتيد متضمنة miR29C.

كما يتم مراعاة العلاجات المشتركة. في هذا الصدد، قد تشتمل أي من الطرق السابقة الموصوفة هنا على إعطاء ناقل ثان الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على متوالية بولي نوكليوتيد متضمِنة miR29C. في بعض التجسيدات، يكون البولي نوكليوتيد المتضمِن miR29C مرتبطًا بشكل فعال بعنصر مقارنة خاص بعضلة معينة. على سبيل المثال، عنصر المقارنة الخاص بعضلة معينة هو عنصر جين أكتين هيكلي بشري، عنصر جين أكتين قلبي، عامل ارتباط محسن خاص بخلية عضلية معينة MEF، كرياتين كيناز عضلي، كرياتين كيناز عضلي مقتضب، سلسلة ثقيلة للميوسين، MHCK7 (نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي)، C5-12 (معزز تخليقي)، عنصر محسن كرياتين كيناز فأري، عنصر جين تروبونين C هيكلي سريع التحويل، عنصر جين تروبونين C قلبي بطيء التحويل، عنصر جين تروبونين I بطيء التحويل، عوامل نووية قابلة للحث بنقص التأكسج، عنصر قابل للحث بالستيرويد أو عنصر استجابة للجلوكوكورتيكويد. في بعض التجسيدات، يشتمل الناقل الثاني الناتج عن عودة الاتحاد الجيني على متوالية البولي نوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 9 أو رقم تعريف المتوالية: 8، كما هو

موضح في الطلب الأمريكي المؤقت رقم 62/323.163 (تم تضمين الكشف عنه هنا بالإشارة إليه في مجمله).

في طرق العلاج المشترك combination therapy الموصوفة هنا والتي يتم فيها توجيه كل من ناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يعبر عن β-سركوجليكان وناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يعبر عن miR29c إلى الخاضع للعلاج الثديي، يمكن أن تُعطى نواقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني بشكل متزامن أو بالتتابع مع ناقل الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الذي يعبر عن β- السركوجليكان مباشرة قبل أو بعد الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الذي يعبر عن miR29c. أو كبديل لذلك، يتم إعطاء ناقل الفيروس الغدي الذي يعبر عن β-سركوجليكان في غضون حوالي 1-24 ساعة (على سبيل المثال، 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 21، 22، 23 أو 24 ساعة) بعد إعطاء الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني معربا عن miR-29 أو طرق الاختراع التي تتم فيها حيث يتم إعطاء نواقل الفيروس الغدي الذي يعبر عن β- السركوجليكان في حدود 1 24 ساعة (على سبيل المثال، 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 21، 22، 23 أو 24 ساعة) قبل إعطاء الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الذي يعبر عن miR-29. في بعض التجسيدات، يتم إعطاء ناقل الفيروس الغدي الذي يعبر عن β-سركوجليكان في غضون حوالي 1-5 ساعات (على سبيل المثال، 1، 2، 3، 4 أو 5 ساعات) بعد إعطاء الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني معربًا عن miR-29 أو يتم تنفيذ طرق الاختراع حيث يتم إعطاء متجه الفيروس الغدي الذي يعبر عن β-سركوجليكان خلال حوالي 1-5 ساعات (على سبيل المثال، 1، 2، 3، 4 أو 5 ساعات) قبل إعطاء الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الذي يعبر عن miR-29c.

في أي من طرق الاختراع، يتم إعطاء الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني عن طريق الحقن في العضل أو الحقن في الوريد intravenous injection. بالإضافة إلى ذلك، في أي طريقة من الاختراع، يتم إعطاء الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني بطريقة منتظمة، مثل إعطاء بطريق غير الجهاز الهضمي parental administration عن طريق الحقن أو التسريب أو الغرس.

يتم صياغة تركيبات الاختراع للحقن في العضل أو الحقن في الوريد. بالإضافة إلى ذلك، يتم تكوين تركيبات الاختراع من أجل الإعطاء الجهازي systemic administration، مثل إعطاء بطريق غير

الجهاز الهضمي عن طريق الحقن أو التسريب أو الغرس.

بالإضافة إلى ذلك، أي تركيبة من التركيبات المصممة للإعطاء إلى خاضع للعلاج يعاني من ضمور العضلات (مثل ضمور عضلات حزام الأطراف أو أي ضمور عضلي آخر متعلق بالديستروفين). في بعض التجسيدات، قد تشتمل التركيبة أيضًا على ناقل الفيروس الغدي ثاني ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على متوالية البولي نوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 9 أو رقم تعريف المتوالية: 8.

في أي من استخدامات الاختراع، يتم صياغة الدواء من أجل الحقن في العضل أو الحقن في الوريد.

بالإضافة إلى ذلك، في أي من استخدامات الاختراع، يتم صياغة الدواء من أجل الإعطاء العام، مثل إعطاء بطريق غير الجهاز الهضمي عن طريق الحقن أو التسريب أو الغرس. بالإضافة إلى ذلك، قد يتم تحضير أي من الأدوية للإعطاء إلى خاضع للعلاج يعاني من ضمور العضلات (مثل ضمور عضلات حزام الأطراف أو أي ضمور عضلي آخر متعلق بالديستروفين). في بعض التجسيدات، قد يشتمل الدواء أيضًا على ناقل الفيروس الغدي ثان ناتج عن عودة الاتحاد الجيني يشتمل على متوالية البولي نوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 9 أو رقم تعريف المتوالية: 8.

لا تهدف الفقرات السابقة إلى تعريف كل جانب من جوانب الاختراع، ويتم وصف جوانب إضافية في أقسام أخرى، مثل الوصف التفصيلي. من المفترض أن تكون الوثيقة الكاملة ذات صلة ككشف موحد، ويجب أن يكون مفهومًا أنه تم تناول جميع توليفات الميزات الموضحة هنا، حتى إذا لم يتم العثور على توليفة من الميزات معًا في نفس الجملة، أو الفقرة، أو قسم من هذا الوثيقة. يتضمن الاختراع، كجانب إضافي، جميع تجسيدات الاختراع الأضيق في النطاق بأي طريقة من التنويعات المحددة بواسطة الفقرات المحددة أعلاه. على سبيل المثال عندما يتعلق الأمر ببعض جوانب الاختراع الموصوفة على أنها جنس، يجب أن يكون مفهوما أن كل عضو في جنس هو، بشكل فردي، جانب من الاختراع.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

توضح الأشكال 1أ-1د أن التعبير عن β-سركوجليكان بوساطة الفيروس الغدي يعيد البروتينات المرتبطة بالديستروفين dystrophin-associated proteins ويحمي سلامة الغشاء. (أ) ناقل الفيروس الغدي المتمم ذاتيا الذي يحتوي على جين β-سركوجليكان البشري المحسَّن بالكودون يتم تحفيزه

بمعزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب خاص بعضلة محددة. يحتوي الكاسيت أيضًا على إنترون خيمري chimeric intron لزيادة إشارة المعالجة وتذييل بعديد الأدينيلات polyadenylation signal من أجل الثبات. (ب) يُظهر الصبغ التألقي المناعي Immunofluorescence staining بجسم مضاد لـ بيتا-SG anti-β-SG antibody مستويات عالية من صبغ الغشاء الخلوي sarcolemmal staining لجين متحور β-سركوجليكان في فئران بالغة 5 أسابيع من العمر بعد الحقن بـ 6 و12 أسبوع. يتم عرض تكبير ×20 للصورة. النسبة المئوية للألياف التي تعبر عن β-سركوجليكان لكل لعضلة الظنبوب الأمامي tibialis anterior (TA) بلغ متوسطها 88.4 ± 4.2٪ بعد 6 أسابيع (n = 9، 4 ذكور، 5 إناث) و76.5 ± 5.8٪ بعد 12 أسبوعًا (n = 6، 4 ذكور، أنثى 2). تم تأكيد التعبير عن البروتين في بقعة ويسترن مع وجود بقع جاما-توبيولين gamma-tubulin blot الموضحة للتحكم في التحميل. (ج) يؤدي توصيل الفيروس الغدي من β-سركوجليكان إلى استعادة أعضاء آخرين من معقد السركوجليكان؛ α-سركوجليكان α-sarcoglycan، ديستروفين. يتم عرض تكبير ×20 للصورة. (د) scAAVrh.74.hSGCB يحمي أغشية sgcb-/- من التلف. صورة توضح مساحة كبيرة من ألياف موجبة positive fibers أزرق إيفانز (أحمر) مترافقة مع مجموعة من الألياف موجبة β-سركوجليكان التي تم حمايتها من تضمين صبغ أزرق إيفانز. يتم عرض تكبير × 40 للصورة.

توضح الأشكال 2أ-2د التحليل النسيجي histological analysis للعضلة الهيكلية المعالجة التي تعاني من نقص في بيتا-SG. يقيس العلاج scAAVrh.74.hSGCB المتغيرات النسيجية histological parameters لفئران $sgcb^{-/-}$. تم إجراء صبغ هيماتوكسيلين Hematoxylin ويوزين Eosin (H&E) وصبغ بيكروسيريوس Pircrosirius الأحمر على عضلة الظنبوب الأمامي من فئران $sgcb^{-/-}$ جنبا إلى جنب مع عينة المقارنة العادية لفئران C57/BL6 والفئران المعالجة بـ scAAVrh.74.hSGCB متبوّعا بالقياس الكمي للمتغيرات النسيجية والنسبة المئوية للصبغ بالكولاجين. (أ) يبين الصبغ بهيماتوكسيلين ويوزين وجود ألياف منواة مركزيًا centrally nucleated fibers، خلايا التهابية inflammatory cells، وتوزيع قطر ألياف كبير في عضلات بها نقص في بيتا-SG β-SG-deficient muscle وتحسن في علم الأنسجة بعد انتقال الجينات. (ب) يظهر صبغ بيركروسيريوس الأحمر انخفاض في الكولاجين الأحمر في العضلات المعالجة treated muscle. (ج) التحديد الكمي للألياف المنواة مركزيًا الذي يظهر نقصا بعد العلاج ($P < 0.0005$، تحليل التباين Analysis of variance (ANOVA) في اتجاه واحد) و(د) تمثيل توزيع حجم الألياف وزيادة

متوسط حجم الألياف لعضلة الظنبوب الأمامي من عينات المقارنة C57/BL6 وفئران $sgcb^{-/-}$ مقارنة بالفئران المعالجة (P <0.0001، تحليل التباين في اتجاه واحد). (هـ) القياس الكمي لـ ٪ للكولاجين في العضلات الظنبوب الأمامي من عينات المقارنة C57/BL6 وفئران $sgcb^{-/-}$ مقارنة بفئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة (P <0.0001، تحليل التباين في اتجاه واحد). شريط مقياس scale bar 100 ميكرو متر لتكبير ×20 للصورة. *** P <0.001؛ **** P < 0.0001.

تظهر الأشكال 3أ-3ج أن التوصيل في العضل لـ scAAVrh.74.hSGCB يصحح القوة الكزازية tetanic force والمقاومة للضرر الناجم عن التقلص contraction-induced injury. تم حصد العضلة الظنبوب الأمامي لفئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة بـ 3×10^{10} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.hSGCB عبر حقنة في العضل بعد 6 أسابيع من نقل الجين، وتم إخضاعها لبروتوكول لتقييم القوة الكزازية وبروتوكول تقلص لامركزي eccentric contraction protocol لتقييم المقاومة للإصابة الناجمة عن التقلص. (أ) أظهرت العضلة المعالجة بـ AAVrh.74.hsGCB تحسنًا ملحوظًا في كل من القوة الكزازية المطلقة (P <0.01، اختبار تي مقترن) و(ب) قوة محددة مقاسة (P <0.05، اختبار تي مقترن)، الذي لم يختلف عن القوة من النوع غير المعالج (C57/BL6). (ج) أبدت الظنبوب الأمامي المعالجة بـ AAVrh.74.hSGCB تحسنًا ملحوظًا في مقاومة الإصابات الناجمة عن التقلص مقارنة بعينات المقارنة غير المعالجة لـ $sgcb^{-/-}$ (P <0.01، تحليل التباين في اتجاهين). يتم عرض قوة الاحتفاظ بعد 10 تقلصات contractions. * P <0.05؛ ** P <0.01.

توضح الأشكال 4أ-4ج نتائج تحليل الفئران التي عولجت في العضل باستخدام scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. (أ) الصبغ التألقي المناعي لعضلة الظنبوب الأمامي من فئران *sgcb-/-* البالغة 6 أشهر من العمر المعالجة بعد 12 أسبوع من الحقن (n = 5، 5 ذكر) يظهر التعبير في الغشاء الخلوي sarcolemmal expression عن الجين المتحور وراثيا β-سركوجليكان عند مستويات بمتوسط 80 ٪ في الفئران المحقونة مقارنة بغير المعالجة (n = 4، 4 ذكور). (ب) الصبغ ببيكروسيريوس الأحمر لعضلات الظنبوب الأمامي المعالجة وغير المعالجة. (ج) القياس الكمي للكولاجين الموجود الأنسجة المصبوغة ببيكروسيريوس الأحمر Picrosirius red stained tissue يبين انخفاضًا كبيرًا في كمية الكولاجين بعد العلاج باستخدام rAAVrh.74.tMCK.hSGCB (P <0.0001، تحليل التباين في اتجاه واحد). شريط مقياس 100 ميكرو متر موضح لتكبير ×20 للصورة. **** P <0.0001.

تظهر الأشكال من 5أ-5ج نتائج توصيل الأوعية الدموية vascular delivery لـ scAAVrh.74.hSGCB. تم علاج فئران عمرها أربعة (n = 5، 5 ذكر) وخمسة (n = 4، 2 ذكرا، 2 أنثى) أسابيع بها نقص في β-SG باستخدام ناقل عبر الشريان الفخذي femoral artery لتوصيل الناقل إلى عضلات الأطراف السفلية lower limb muscles. عند جرعة بمقدار 5×10^{11} جينوم فيروسي، كان التعبير عن β-SG بمقدار 90.6 ± 2.8٪ في الظنبوب الأمامي و91.8 ± 4.7٪ في عضلة الساق gastrocnemius (GAS) للفئران المعالجة مصحوبًا بتحسينات في علم الأنسجة مما أدى إلى تحسن كبير في قوة محددة مقارنة بالحيوانات غير المعالجة حتى بعد نموذج الإصابة. (أ) التعبير عن البروتين β-SG من ثلاثة فئران تمثيلية. يتم عرض العضلات من الفأر β-SG KO غير المعالج للمقارنة في اللوحة الداخلية (أسفل اليمين). يتم التكبير ×20 للصورة. يتم عرض التعبير في العضلات المعالجة treated muscles المؤكدة عن طريق بقعة ويسترن وجاما-توبولين كعينة تحميل مقارنة. (ب) تحسن بشكل ملحوظ علم أمراض الأنسجة بعد العلاج بجرعة عالية high dose treatment. اللوحات العلوية: عضلات الظنبوب الأمامي وعضلات ساق معالجة gastrocnemius muscles. اللوحات السفلية: عينات مقارنة غير معالجة بها نقص في β-SG. شريط مقياس 100 ميكرو متر موضح للتكبير ×20 للصورة. (ج) النسبة المئوية للقوة النوعية المحتفظ بها في عضلة باسطة إبهام اليد extensor digitorum longus (EDL) بعد 10 دورات من الإصابة الناشئة عن التقلص. العلاج باستخدام 5×10^{11} جينوم فيروسي باستخدام AAVrh.74.hSGCB أدى إلى تحسن كبير في القوة التي كانت تعادل عضلات العينة المقارنة (العادية) من النوع غير المعالج دبليو تى WT (P<0.05، تحليل التباين في اتجاه واحد). * P <0.05

تظهر الأشكال 6أ-6ب انخفاضًا في التليف في β-SG KO المعالجة بالتروية المعزولة isolated perfusion (ILP). (أ) يظهر الصبغ ببيكروسيريوس الأحمر انخفاض التليف في الفئران المعالجة كما هو مبين بانخفاض ترسيب الكولاجين مقارنة بالفئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة. (ب) القياس الكمي لمستويات الكولاجين في الظنبوب الأمامي وعضلات عضلة الساق من BL6 WT، فئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة والفئران المعالجة يؤكد وجود انخفاض في مستويات الكولاجين في الفئران المعالجة (P <0.001، تحليل التباين في اتجاه واحد). شريط مقياس 100 ميكرو متر موضح للتكبير ×20 للصورة. *** P <0.001.

يوضح الشكلان 7 أ و7 ب التوزيع الحيوي للناقل والتعبير عن البروتين. (أ) المخطط التكراري

لمتوسط توزيع الناقل في الأنسجة المحصودة من الفئران المعالجة بالتروية المعزولة الواردة في نسخ من نسخة لكل ميكرو جرام من الحمض النووي المضافة إلى تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي quantitative polymerase chain reaction (qPCR). تم علاج الطرف الأيسر. (ب) لا يوجد تعبير بروتيني عن طريق بقعة ويسترن التي تُرى في الأعضاء المستهدَفة target organs.

يقدم الشكل 8أ–د أوجه نقص نسيجية ووظيفية فئران *sgcb*$^{-/-}$ عند عمر 7 أشهر. يبين الصبغ بالترايكوم Trichome في الحجاب الحاجز diaphragm (أ) والقلب (ب) لفئران sgcb$^{-/-}$ تليف واسع extensive fibrosis (أحمر). يتم تخفيض مخرجات القوة force output من الحجاب الحاجز بشكل ملحوظ في الحجاب الحاجز (ب) ويتم تخفيض نسبة الانقباض القلبي cardiac ejection أيضًا في فئران *sgcb*$^{-/-}$ (د).

يقدم الشكل 9 مخططًا لطقم جين متحور علاجي هو β–سركوجليكان therapeutic β-sarcoglycan transgene. يحتوي الناقل المتمم ذاتيا Self-complementary vector للفيروس الغدي على جين β–سركوجليكان البشرى. يؤدي معزز نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي خاص بعضلة معينة إلى التعبير. يحتوي الطقم أيضًا على إنترون خيمري لزيادة إشارة المعالجة والتذييل بعديد الأدينيلات للثبات.

يقدم الشكل 10 إجراء صبغ تألق مناعي لـ β–سركوجليكان في مختلف العضلات الهيكلية بما يوضح التعبير القوي باستخدام الألياف السالبة النادرة rare negative fibers بعد 1 أو 4 أو 6 أشهر من العلاج (موضح 1 شهر).

يقدم الشكل 11 إجراء صبغ تألق مناعي لـ β–السركوجليكان في الحجاب الحاجز والقلب بما يوضح التعبير القوي باستخدام الألياف السالبة النادرة بعد 1، 4، أو 6 أشهر من العلاج (موضح 1 شهر).

يوضح الشكل 12أ–د استعادة التعبير عن β–سركوجليكان بعد توصيل لـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB في الوريد. (أ) طقم scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (ب) تصوير التألق المناعي 6 أشهر بعد الحقن للعضلات الهيكلية، والحجاب الحاجز، والقلب من فئران *sgcb*$^{-/-}$ تم حقنها وريديا بجرعة بإجمالي 1e12 جينوم فيروسي من scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. تبدي الصور التمثيلية للعضلات الهيكلية متوسط 98.13 ± 0.31٪ من التحوير الوراثي transduction. يتم عرض الصورة مكبرة ×20. تبدي الصور التمثيلية لأنسجة القلب heart tissue مستويات عالية من التعبير عن الجين المتحور β–سركوجليكان البشري.

يتم عرض الصور بتكبير ×10. (ج) تؤكد بقعة ويسترن لكل العضلات من فأر $sgcb^{-/-}$ واحد معالج التعبير عن جين متحور وراثيا β-سركوجليكان البشري. (د) تبين بقعة ويسترن للتعبير عن β-سركوجليكان البشري في قلوب خمسة من الفئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة بالقياس الكمي للكثافة التعبير المفرط عن β-سركوجليكان البشري حتى 72.0 ٪ من مستويات BL6 WT.

يوضح الشكل 13أ-د تأثير المعالجة الجهازية systemic treatment باستخدام scAAVrh74.MHCK7.hSGCB على أمراض العضلات. (أ) صبغ هيماتوكسيلين ويوزين للحجاب الحاجز والعضلات رباعية الرؤوس quadriceps (QUAD) من C57BL/6 WT، $sgcb^{-/-}$، والفئران المعالجة بـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB تبدي علم أمراض أنسجة مقاسة normalized histopathology. (ب) القياس الكمي للانخفاض في الألياف المنواة مركزيًا في العضلات المعالجة $sgcb^{-/-}$ مقارنة بالعضلات $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (الظنبوب الأمامي، عضلة الساق، العضلة الألوية gluteal (GLUT)، الحجاب الحاجز، $P < 0.0001$) (العضلة رباعية الرؤوس، العضلة القطنية الكبرى psoas major (PSOAS)، العضلة ثلاثية الرؤوس triceps (TRI)، $P < 0.05$). (ج) قياس توزيع الألياف في عضلة الساق، العضلة القطنية الكبرى، والعضلة ثلاثية الرؤوس، و(د) زيادة في متوسط حجم الألياف في العضلات المعالجة مقارنة بعضلات $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة ($P < 0.001$) (تحليل التباين في اتجاه واحد) ($n = 5$) لكل مجموعة).

يوضح الشكل 14 أ و14 ب ترسب كولاجين مخفض في فئران β-SG KO المعالجة وريديا. (أ) أظهر صبغ بيكروسيريوس الأحمر انخفاض التليف في الفئران المعالجة وهو ما دل عليه انخفاض في ترسب الكولاجين مقارنة بفئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة في الحجاب الحاجز وعضلة الساق. (ب) القياس الكمي لمستويات الكولاجين في الحجاب الحاجز وعضلات عضلة الساق من الفئران C57BL/6 WT ($n = 4$)، غير المعالجة فئران $sgcb^{-/-}$ ($n = 4$)، وفئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة ($n = 5$) انخفاض في مستويات الكولاجين في كل من العضلات المعالجة ($P < 0.0001$، تحليل التباين في اتجاه واحد). شريط مقياس 100 ميكرو متر موضح لتكبير الصور 20X.

يوضح الشكل 15 أن توصيل scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB عبر الوريد الذيلي tail vein لفئران $sgcb^{-/-}$ يعيد القوة تمامًا في الحجاب الحاجز. بعد 6 أشهر من العلاج (إعطاء وريدي (1e12vg)). تم حصد شرائط عضلات الحجاب الحاجز Diaphragm muscle strips من الفئران المعالجة وعينات المقارنة $sgcb^{-/-}$ وفئران من النوع غير المعالج WT وتعريضها لقياسات القوة، استعاد العلاج القوة

إلى مستويات النوع غير المعالج.

يقدم الشكل 16 مخططًا لرسومات rAAV scAACrh.74.CMV.miR29c ومتوالية نوكليوتيد لـ miR-29c في السلسلة الرئيسية الطبيعية لـ miR-30.

يوضح الشكل 17 أنه بعد 3 أشهر من العلاج باستخدام AAVrh.74.CMV.miR29C، تم حصد عضلات الظنبوب الأمامي من فئران معالجة ومقارنة $sgcb^{-/-}$ وفئران من النوع غير المعالج WT وتحليلها للكشف عن التليف (مستويات الكولاجين) (n = 5 لكل مجموعة). باستخدام الصبغ بسيريوس الأحمر وقياس حجمه، تم تخفيض مستويات الكولاجين بعد العلاج (انظر الشكل 18). أشارت النتائج إلى أن مستويات النسخ من Col1A، Col3A، وFbn كانت طبيعية وتم زيادة حجم ألياف العضلات muscle fiber.

يقدم الشكل 18 صورًا تمثيلية للأقسام الكاملة الممسوحة scanned full sections ضوئيًا لعضلات الظنبوب الأمامية غير المعالجة والمعالجة بـ ACRrh.74.CMV.miR29C المصبوغة بسيريوس الأحمر التي تصبغ الكولاجين 1 و3. ويرد القياس الكمي في الشكل 17.

يوضح الشكل 19 أ و19ب تصحيح الجنف الحدابي kyphoscoliosis في العمود الفقري الصدري thoracic spine. (أ) الإصابة بالجنف الحدابي في فئران $sgcb^{-/-}$ كما يتضح من الأشعة السينية. (ب) درجة مؤشر الجنب الحدابي Kyphotic Index (KI) لفئران $sgcb^{-/-}$ (3.69) منخفض مقارنة بـ C57BL/6 WT (6.01) ($p < 0.01$)، ولكنها تزيد عند العلاج بـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB (5.39) ($p < 0.05$ مقارنة بـ $sgcb^{-/-}$) (تحليل التباين في اتجاه واحد) (عدد = 6 لكل مجموعة).

يقدم الشكل 20أ–د تقييم اعتلال عضلة القلب cardiomyopathy في عضلة القلب heart muscle. (أ) إجراء صبغ باستخدام هيماتوكسيلين ويوزين وبيكروسيريوس الأحمر لفئران بالغة 7 أشهر من العمر من نوع BL6 WT، $sgcb^{-/-}$، وفئران $sgcb^{-/-}$ معالجة بـ AAV.MHCK7.hSGCB بعد 6 أشهر من العلاج بما يدل على تنكس عضلة القلب في عضلات *sgcb*$^{-/-}$ غير المعالجة وتحسن العلاج التالي. (ب) يبين تحليل التصوير بالرنين المغناطيسي magnetic resonance imaging (MRI) القلبي انخفاض في قلوب فئران $sgcb^{-/-}$ من حيث حجم السكتة stroke ($p < 0.01$)، وخرْج القلب cardiac output، ونسبة الانقباض القلبي ($p < 0.05$) (تحليل التباين في اتجاه واحد) والتحسن بعد 6 أشهر من المعالجة (= n 6 لكل مجموعة). (ج) إجراء بقعة ويسترن لقلبي فأرين من C57BL/6 WT، وقلبي فأرين من $sgcb^{-/-}$، و5 فئران $sgcb^{-/-}$ معالجة باستخدام AAV.MHCK7hSGCB يظهر

انخفاض مستويات التروبونين القلبي I في الفئران المصابة. (د) القياس الكمي لقياس الكثافة يظهر انخفاض التروبونين القلبي cardiac troponin I I (cTrpI) إلى 60.38٪ من مستويات BL6 WT وتعبير مفرط عن نسبة تصل إلى 135.8٪ من مستويات BL6 WT.

يوضح الشكل 21أ–ب تصحيح وظيفة الحجاب الحاجز وزيادة نشاط القفص في الحقل المفتوح. (أ) تم حصاد أشرطة عضلات الحجاب الحاجز لقياس القوة ومقاومة الإرهاق في الفئران BL6 WT (n = 5)، فئران $sgcb^{-/-}$ (n = 4)، وفئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة بـ AAV.MHCK7.hSGCB (n = 5) وكلها في الشهر السابع من العمر. أدى ستة أشهر من العلاج إلى استعادة القوة إلى مستويات WT ($P < 0.01$) مقارنة بفئران $sgcb^{-/-}$) وتحسين مقاومة الإرهاق. (ب) انخفض المشي العام على المستويين x وy بشكل كبير في فئران $sgcb^{-/-}$ ($p < 0.0001$) وظهور تحسن طفيف في الفئران المعالجة بـ MCHK7 ($P < 0.05$). كما انخفض نشاط النشاط العمودي على الأطراف الخلفية في فئران $sgcb^{-/-}$ ($p < 0.01$) وزاد بشكل ملحوظ في الفئران المعالجة بـ MCHK7 ($P < 0.05$) (تحليل التباين في اتجاه واحد) (عدد = 6 لكل مجموعة).

يقدم الشكل 22أ–ب توزيعًا حيويًا وتحليلًا بعيدًا عن الهدف للتعبير عن جين محور وراثيًا لتوصيل جهازي scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. (أ) مخطط مكرر لتوزيع نسخ جينوم فيروسي في المتوسط للنسخ لكل ميكرو جرام من الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين المضاف إلى تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمى في الأنسجة المختلفة من اثنين من فئران $sgcb^{-/-}$ بعد التوصيل وريديًا لعلاج scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB بجرعة إجمالية 1e12 جينوم فيروسي. (ب) يدل التوزيع الحيوي لبقع ويسترن على العضلات والأعضاء من فئران $sgcb^{-/-}$ المحقونة بشكل نظامي بـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB على عدم التعبير عن الجين المتحور وراثيا β–سركوجليكان البشري في أي عينات لغير العضلات non-muscle samples.

الوصف التفصيلي:

يستند الكشف الحالي على اكتشاف أن إعطاء ناقل الفيروس الغدي يحتوي على بولي نوكليوتيد يعبر عن β–سركوجليكان يؤدي إلى انخفاض أو عكس كامل للتليف العضلي muscle fibrosis في نموذج حيواني لضمور عضلات حزام الأطراف. كما هو موضح في الأمثلة، فإن إعطاء ناقل الفيروس الغدي الموصوف هنا أدى إلى عكس مظاهر الضمور بما في ذلك عدد أقل من الألياف المتحللة degenerating fibers، وانخفاض الالتهابات وتحسين الاستعادة الوظيفية عن طريق الحماية

ضد التقلص اللامركزي مع زيادة في توليد القوة.

كما هو مستخدم هنا، فإن المصطلح "AAV" يشير إلى اختصار قياسي لفيروس مرتبط بالغدة. إن الفيروس المرتبط بالغدة هو طليعة فيروس حمض نووي أحادي الجديلة ينمو فقط في الخلايا التي يتم فيها توفير وظائف معينة بواسطة فيروس مساعد يصيب بعدوى مشتركة co-infecting helper virus. هناك حاليا ثلاثة عشر أنماط مصلية من الفيروس الغدي التي تم وصفها. يمكن الاطلاع على معلومات عامة ومقالات مرجعية عن الفيروس الغدي في، على سبيل المثال، Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228، و Berns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York). ومع ذلك، فمن المتوقع تماما أن هذه المبادئ نفسها قابلة للتطبيق على أنماط مصلية الفيروس الغدي إضافية لأنه من المعروف جيدا أن الأنماط المصلية المختلفة ترتبط ارتباطا وثيقا، سواء من الناحية الهيكلية والوظيفية، حتى على المستوى الجيني genetic level. (انظر، على سبيل المثال، Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed. ؛ و(Rose, Comprehensive Virology 3:1-61 (1974)). على سبيل المثال، تظهر جميع الأنماط المصلية الفيروس الغدي على ما يبدو خصائص تكرار مشابهة جدا بوساطة جينات تماثلية متماثلة؛ وتحمل جميعها ثلاثة بروتينات كابسيد مثل تلك التي تم التعبير عنها في الفيروس الغدي 2. يتم اقتراح درجة الصلة كذلك من خلال تحليل المزدوجات المتغايرة heteroduplex analysis والتي تكشف عن التهجين الشامل بين الأنماط المصلية بطول الجينوم؛ إن وجود قطاعات متناظرة ذاتية التلدين analogous self-annealing segments في الأطراف يناظر "متواليات تكرار طرفية عكسية". وتشير أنماط العدوى المماثلة أيضًا إلى أن وظائف النسخ المتماثل في كل نمط مصلي تخضع لسيطرة تنظيمية مماثلة.

يشير "ناقل الفيروس الغدي" كما هو مستخدم في هذه الوثيقة إلى ناقل يحتوي على واحد أو أكثر من البولي نوكليوتيدات polynucleotides محل الاهتمام (أو الجينات المحورة transgenes) التي تحيط بها بشكل مجانح متواليات تكرار طرفية الفيروس الغدي. يمكن تكرار مثل هذه النواقل الفيروس الغدي وتعبئتها في جزيئات فيروسية معدية infectious viral particles عندما تكون موجودة في خلية مضيفة host cell تم تحويرها وراثيا بواسطة ناقل يشفر ويعبر عن منتجات جينات نسخ وكابسيد.

يشير "فيريون الفيروس الغدي" أو "جسيم فيروسي vector particle للفيروس الغدي" أو "جسيم ناقل

الفيروس الغدي" إلى جسيم فيروسي يتكون من بروتين كابسيد الفيروس الغدي واحد على الأقل وناقل الفيروس الغدي بولي نوكليوتيد مغلف encapsidated polynucleotide. إذا كان الجسيم يشتمل على بولي نوكليوتيد غير متجانس heterologous polynucleotide (أي بولي نوكليوتيد خلاف جينوم الفيروس الغدي من النوع غير المعالج مثل جين متحور وراثيا ليتم تسليمه إلى خلية ثديية mammalian cell)، فإنه يشار إليه عادة باسم "جسيم ناقل الفيروس الغدي " أو ببساطة "ناقل الفيروس الغدي". وبالتالي، فإن إنتاج جسيم ناقل الفيروس الغدي يتضمن بالضرورة إنتاج ناقل الفيروس الغدي، حيث أن مثل هذا الناقل موجود داخل جسيم ناقل الفيروس الغدي.

الفيروس الغدي

تشتمل جينومات الفيروس الغدي الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع على جزيء حمض نووي وفقًا للاختراع وواحد أو أكثر من الفيروس الغدي متواليات تكرار طرفية عكسية يحيط بجزيء الحمض النووي. يمكن أن يكون الحمض النووي الفيروس الغدي في جينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني من أي نمط مصلي الفيروس الغدي يمكن اشتقاق فيروس ناتج عن عودة الاتحاد الجيني له، على سبيل المثال لا الحصر، أنماط مصلية للفيروس الغدي: الفيروس الغدي-1، الفيروس الغدي-2، الفيروس الغدي-3، الفيروس الغدي-4، الفيروس الغدي-5، الفيروس الغدي-6، الفيروس الغدي-7، الفيروس الغدي-8، الفيروس الغدي-9، الفيروس الغدي-10، الفيروس الغدي-11، الفيروس الغدي-12، الفيروس الغدي-13، وAAV rh.74. يتم الكشف عن إنتاج الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الكاذب في، على سبيل المثال، الوثيقة الدولية 01/83692. يتم أيضًا مراعاة أنواع أخرى من متغيرات الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، على سبيل المثال الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني ذات طفرات كابسيد. انظر على سبيل المثال، Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014). كما لوحظ في قسم الخلفية التقنية للاختراع أعلاه، فإن متوالية النوكليوتيد للجينومات من أنواع مصلية مختلفة الفيروس الغدي معروفة في المجال. لتعزيز التعبير النوعي عن العضلات الهيكلية، يمكن استخدام الفيروس الغدي 1، الفيروس الغدي 5، الفيروس الغدي 6، الفيروس الغدي 8 أو الفيروس الغدي 9.

تشتمل بلازميدات الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين على جينومات الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني. يتم نقل البلازميدات الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين إلى الخلايا المسموح بها للعدوى بفيروس مساعد الفيروس الغدي (على سبيل المثال، فيروس غدي

adenovirus، أو فيروس غدي محذوف E1-deleted adenovirus E1 أو فيروس الهربس herpesvirus) لتجميع جينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني في جسيم فيروسي معدي infectious viral particles. تُعد تقنيات إنتاج جسيمات الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، حيث يتم توفير جينوم الفيروس الغدي المراد تعبئته وجينات نسخ وكابسيد، ووظائف الفيروس المساعد في الخلية، موحدة في المجال. يتطلب إنتاج الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني أن تكون المكونات التالية موجودة داخل خلية (يشار إليها هنا كخلية تغليف packaging cell): جينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني وجينات نسخ وكابسيد للفيروس الغدي منفصلة عن (أي ليست في) جينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، ووظائف الفيروس المساعد. يمكن أن تكون جينات نسخ وكابسيد للفيروس الغدي من أي نمط مصلي الفيروس الغدي يمكن اشتقاق الفيروس الناتج عن عودة الاتحاد الجيني، وربما يكون من نمط مصلي الفيروس الغدي مختلف عن جينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، متواليات تكرار طرفية عكسية، بما في ذلك، ولكن ليس على سبيل الحصر، الأنماط المصلية للفيروس الغدي وهي: الفيروس الغدي-1، الفيروس الغدي-2، الفيروس الغدي-3، الفيروس الغدي-4، الفيروس الغدي-5، الفيروس الغدي-6، الفيروس الغدي-7، AAVrh.74، الفيروس الغدي-8، الفيروس الغدي-9، الفيروس الغدي-10، الفيروس الغدي-11، الفيروس الغدي-12، الفيروس الغدي-13، و AAV rh.74. يتم الكشف عن إنتاج الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني الكاذب في، على سبيل المثال، في الطلب الدولي 01/83692 الذي يتم تضمينه بالإشارة إليه هنا في مجمله.

تتمثل طريقة توليد خلية التغليف في إنشاء خط خلوي cell line يعبر بشكل ثابت عن جميع المكونات الضرورية لإنتاج جسيمات الفيروس الغدي. على سبيل المثال، يتم دمج البلازميد plasmid (أو البلازميدات متعددة) التي تشتمل على جينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني تفتقر جينات نسخ وكابسيد للفيروس الغدي، جينات نسخ وكابسيد للفيروس الغدي منفصلة عن الجينوم الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، وواسم قابل للاختيار، مثل جينات مقاومة نيوميسين neomycin resistance gene، وذلك في جينوم خلية genome of cell. تم إدخال الجينوم الفيروس الغدي في البلازميدات البكتيرية bacterial plasmids عن طريق إجراءات مثل GC tailing (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. S6. USA, 79:2077-2081)، إضافة روابط تخليقية synthetic linkers تحتوي على مواقع تقييد نوكلياز داخلي restriction endonuclease cleavage

sites (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73) أو إلحاق طرف متلبد مباشر (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). بعدئذ، يتم إدخال عدوى إلى سلالة خلية التغليف packaging cell line بفيروس مساعد مثل فيروس مرتبط بالغدة. وتتمثل مزايا هذه الطريقة في أن الخلايا قابلة للاختيار وهي مناسبة للإنتاج على نطاق واسع للفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني. تستخدِم أمثلة أخرى للطرق المناسبة فيروس غدي أو فيروس عصوي baculovirus بدلًا من بلازميدات لإدخال جينومات الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني و/أو جينات نسخ وكابسيد في خلايا التغليف packaging cells.

يتم مراجعة المبادئ العامة لإنتاج الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني في، على سبيل المثال، Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539؛ و Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). يتم وصف أساليب مختلفة في Ratschin et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mo1. Cell. Biol. 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988) ؛ و Lebkowski et al., 1988 Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988). Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828)؛ البراءة الأمريكية رقم 5.173.414؛ البراءة الدولية 95/13365 والبراءة الأمريكية المناظرة رقم 5.658.776؛ البراءة الدولية 95/13392؛ البراءة الدولية 96/17947؛ منشور طلب البراءة الأمريكية 98/18600؛ البراءة الدولية 97/09441 (منشور طلب البراءة الأمريكية 96/14423)؛ البراءة الدولية 97/08298 (منشور طلب البراءة الأمريكية 97/13872)؛ البراءة الدولية 97/21825 (منشور طلب البراءة الأمريكية 96/20777)؛ البراءة الدولية 97/06243 (منشور طلب البراءة الفرنسية 96/01064)؛ البراءة الدولية 99/11764؛ Perrin et al. (1995) Vaccine 13:1244-1250; Paul et al. (1993) Human Gene Therapy 4:609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy 3:1124-1132؛ البراءة الأمريكية رقم 5.786.211؛ البراءة الأمريكية رقم 5.871.982؛ والبراءة الأمريكية رقم 6.258.595. ويتم تضمين الوثائق المذكورة أعلاه بالإشارة إليها في هذه الوثيقة بأكملها، مع التركيز بشكل خاص على تلك الأجزاء من الوثائق المتعلقة بإنتاج الفيروس الغدي ناتج عن عودة الاتحاد الجيني.

يوفر الاختراع بالتالي خلايا تغليف تنتج الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني المعدية. في أحد التجسيدات، يمكن أن تتحول الخلايا المغلفة بشكل ثابت إلى خلايا سرطانية cancer cells مثل خلايا HeLa، وخلايا 293 وخلايا PerC.6 (سلالة مماثلة لـ 293). في تجسيد آخر، تكون خلايا

التغليف عبارة عن خلايا لا يتم تحويلها إلى خلايا سرطانية، مثل خلايا المسار المنخفض 293 (خلايا الكلى البشرية الجنينية human fetal kidney cells التي تم تحويلها بـ E1 للفيروس الغدي)، وخلايا MRC-5 (خلايا ليفية أولية جنينية بشرية human fetal fibroblasts)، وخلايا WI-38 (خلايا ليفية أولية جنينية بشرية)، خلايا فيرو Vero cells (خلايا كُلى النسناس monkey kidney cells) وخلايا FRhL-2 (خلايا الرئة الجنينية للريسوس rhesus fetal lung cells).

يشتمل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني (أي، جسيمات الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني مغلفة معدية) وفقًا للاختراع على جينوم الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني. تتضمن تجسيدات، على سبيل المثال وليس الحصر، الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني التي تُدعى pAAV.MHCK7.hSCGB التي تشتمل على متوالية البولي نوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 3، وpAAV.tMCK.hSCGB التي تشتمل على متوالية البولي نوكليوتيد المذكورة في رقم تعريف المتوالية: 5.

يمكن تنقية الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني بواسطة الطرق القياسية في المجال مثل الاستشراب بالعمود column chromatography أو تدرجات كلوريد السيزيوم cesium chloride. إن طرق تنقية نواقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني من الفيروس المساعد معروفة في المجال وتشمل الطرق التي تم الكشف عنها في، على سبيل المثال، Clark *et al., Hum. Gene Ther., 10*(6): 1031-1039 (1999); Schenpp and Clark, *Methods Mol. Med., 69* 427-443 (2002)؛ البراءة الأمريكية رقم 6.566.118 والطلب الدولي 98/09657.

في تجسيد آخر، يراعي الاختراع تركيبات تشتمل على الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع الحالي. تشتمل التركيبات الموصوفة هنا على الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني ومادة حاملة مقبولة صيدلانيًا pharmaceutically acceptable carrier. قد تشتمل التركيبات أيضًا على مكونات أخرى مثل المواد المخففة diluents والمواد المساعدة adjuvants. تتسم المواد الحاملة carriers، المواد المخففة والمواد المساعدة بأنها غير سامة للمستقبلين ويفضل أن تكون خاملة في الجرعات dosages والتركيزات المستخدمة، وتتضمن محاليل منظمة مثل الفوسفات phosphate أو السيترات citrate أو الأحماض العضوية organic acids الأخرى؛ مضادات أكسدة antioxidants مثل حمض الأسكوربيك ascorbic acid؛ بولي ببتيدات ذات وزن جزيئي منخفض low molecular weight polypeptides؛ بروتينات، مثل ألبومين مصلي serum albumin، جيلاتين

gelatin، أو جلوبيولينات مناعية immunoglobulins؛ بوليمرات آلفة للماء hydrophilic polymers مثل بولي ڤينيل بيروليدون polyvinylpyrrolidone؛ أحماض أمينية amino acids مثل جليسين glycine أو جلوتامين glutamine أو هليونين asparagine أو أرجينين arginine أو ليسين lysine؛ مونو سكاريد monosaccharides، داي سكاريد disaccharides، أو غيرها من الكربوهيدرات carbohydrates بما في ذلك الجلوكوز glucose، المانوز mannose، أو الديكسترون dextrins؛ عوامل خلابية chelating agents مثل ثنائي أمين الإيثيلين رباعي حمض الأسيتيك Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)؛ كحوليات سكرية sugar alcohols مثل المانيتول mannitol أو السوربيتول sorbitol؛ أيونات مضادة لتشكيل الملح salt-formig counterions مثل الصوديوم sodium و/أو مواد خافضة للتوتر السطحي غير أيونية nonionic surfactants مثل توين Tween، بلورونيك pluronics، أو بولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol (PEG).

سوف تتباين عيارات الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني المراد إعطاؤها بطرق وفقًا للاختراع، على سبيل المثال، على الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني المعين، ووضع الإعطاء، والهدف العلاجي، والمرء، ونوع (أنواع) الخلية المستهدفة، ويمكن تحديدها من خلال الأساليب القياسية في المجال. يمكن أن تتراوح عيارات الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني من حوالي 1×10^{6}، حوالي 1×10^{7}، حوالي 1×10^{8}، حوالي 1×10^{9}، حوالي 1×10^{10}، حوالي 1×10^{11}، حوالي 1×10^{12}، حوالي 1×10^{13} إلى حوالي 1×10^{14} أو أكثر من جزيئات ديوكسي ريبو نوكلياز deoxyribonuclease (DNase) المقاومة DNase resistant particles (DRP) لكل ملليلتر. يمكن أيضًا التعبير عن الجرعات بوحدات الجينوم الفيروسي viral genomes (vg).

يتم مراعاة طرق تحوير خلية مستهدفة target cell باستخدام الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني، في داخل جسم الكائن أو في المختبر، بواسطة الاختراع. تشتمل الطرق في داخل جسم الكائن على خطوة إعطاء جرعة فعالة effective dose، أو جرعات متعددة فعالة effective multiple doses، من تركيبة تشتمل على الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع إلى كائن حيواني (بما في ذلك الإنسان) في حاجة إليه. إذا كانت الجرعة تُعطى قبل الإصابة باضطراب/مرض، فإن الإعطاء يكون وقائيًا. إذا كانت الجرعة تُعطى بعد حدوث اضطراب/مرض، فإن الإعطاء يكون علاجيًا. في تجسيدات الاختراع، تكون الجرعة الفعالة جرعة لتخفيف (إزالة أو تقليل) عرض واحد على الأقل مرتبط بحالة الاضطراب/المرض المراد علاجه، حيث تبطئ أو تمنع

تقدم حالة الاضطراب/المرض، حيث تبطئ أو تمنع تقدم حالة اضطراب/مرض، حيث تقلل من نطاق المرض، حيث تؤدي إلى سكون المرض (جزئيًا أو كليًا)، و/أو حيث تطيل البقاء على قيد الحياة. يُعد ضمور العضلات، على سبيل المثال ضمور العضلات لحزام الأطراف، مثالًا على مرض يُراعى منعه أو علاجه بطرق الاختراع.

يتم أيضًا مراعاة العلاجات المشتركة من خلال الاختراع. تشتمل التوليفة طبقًا لما هو مستخدم هنا على كل من العلاجات المتزامنة simultaneous treatment والعلاجات التتابعية. يتم بشكل خاص مراعاة توليفات من طرق الاختراع باستخدام العلاجات الطبية القياسية standard medical treatments (مثل الكورتيكوستيرويدات corticosteroids)، وكذلك التوليفات باستخدام العلاجات الجديدة.

الكمية الفعالة علاجيا من ناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني عبارة عن جرعة من الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني تتراوح من حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 5e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 2e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 4e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 6e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 7e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 8e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 9e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 1e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 2e14 جينوم فيروسي/كجم، أو 1e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 3e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e13 إلى حوالي 4e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 4e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 6e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 7e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 8e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 9e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى

حوالي 1e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 2e14 جينوم فيروسي/كجم، أو 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 3e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 إلى حوالي 4e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 5e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 6e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 7e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 8e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 9e13 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 1e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 2e14 جينوم فيروسي/كجم، أو 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 3e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 إلى حوالي 4e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 5e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e14 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 2e14 جينوم فيروسي/كجم، أو 1e14 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 3e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e14 إلى حوالي 4e14 جينوم فيروسي/كجم، أو حوالي 1e14 جينوم فيروسي/كجم إلى حوالي 5e14 جينوم فيروسي/كجم. يشتمل الاختراع أيضًا على تركيبات تتضمن هذه النطاقات لناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني.

على سبيل المثال، الكمية الفعالة علاجيا من ناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني عبارة عن جرعة تبلغ 1e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 2e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 3e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 4e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 5e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 6e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 7e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 8e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 9e13 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 1e14 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 2e14 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 3e14 جينوم فيروسي/كجم، حوالي 4e14 جينوم فيروسي/كجم و5e14 جينوم فيروسي/كجم. يشتمل الاختراع أيضًا تركيبات تتضمن هذه الجرعات من ناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني.

يمكن أن يتم إعطاء جرعة فعالة من التركيبات من خلال مسارات قياسية في المجال بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، الحقن في العضل أو الحقني أو الوريدي أو فمويًا أو في الشدق buccal أو في الأنف nasal أو في الرئة pulmonary أو داخل الجمجمة intracranial أو داخل الجنين intraosseous أو داخل العين intraocular أو في المستقيم rectal أو في المهبل vaginal.

يمكن اختيار و/أو مواءمة مسار (مسارات) الإعطاء والنمط المصلي (الأنماط المصلية) لمكونات الفيروس الغدي للفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني (على وجه الخصوص، الفيروس الغدي متواليات تكرار طرفية عكسية وبروتين كابسيد) وفقًا للاختراع من قِبَل المهرة في المجال مع الأخذ في الاعتبار العدوى و/حالة المرض الذي يتم علاجه والخلايا/الأنسجة المستهدفة التي تعبر عن β-سركوجليكان.

يراعي الاختراع الإعطاء الموضعي والجهازي لجرعة فعالة من الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وتركيبات وفقًا للاختراع. على سبيل المثال، يشير الإعطاء الجهازي إلى إعطاء في الجهاز الدوري circulatory system بحيث يتأثر الجسم بأكمله. يشمل الإعطاء الجهازي الإعطاء المعوي enteral administration على سبيل المثال الامتصاص عبر الجهاز الهضمي gastrointestinal tract والإعطاء بغير مسار الجهاز الهضمي من خلال الحقن أو التسريب أو الغرس.

على وجه الخصوص، يمكن تحقيق الإعطاء الفعلي للفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع الحالي باستخدام أي طريقة جسدية تنقل ناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني الناتج عن عودة الاتحاد الجيني إلى النسيج المستهدف لكائن حيواني. يشمل الإعطاء طبقًا للاختراع، على سبيل المثال لا الحصر، الحقن في العضلات، و/أو مجرى الدم bloodstream و/أو في الكبد مباشرة. ببساطة، لقد ثبت أن إعادة تعليق الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني في محلول ملحي منظَّم بالفوسفات phosphate buffered saline يكفي لتوفير ناقل مفيدة لتعبير عن أنسجة العضلات muscle tissue، ولا توجد قيود معروفة على الناقلات أو المكونات الأخرى التي يمكن إعطاؤها بشكل مشترك مع الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني (على الرغم من أن التركيبات التي تحلل الحمض النووي يجب تجنبها بطريقة طبيعية مع الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني). يمكن تعديل بروتينات كابسيد للفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني بحيث يتم توجيه الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني إلى نسيج مستهدف معين محل الاهتمام مثل العضلات. انظر، على سبيل المثال، الطلب الدولي 02/053703، حيث يتم تضمين الكشف الخاص به هنا كمرجع. يمكن تحضير التركيبات الصيدلانية Pharmaceutical compositions كتركيبات قابلة للحقن injectable formulations أو كتركيبات موضعية topical formulations لتوصيلها إلى العضلات عن طريق النقل عبر الجلد transdermal transport. وقد تم

تطوير العديد من الصيغ لكل من الحقن في العضل والنقل عبر الجلد ويمكن استخدامها في ممارسة الاختراع عمليًا. يمكن استخدام الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني مع أي مادة حاملة مقبولة صيدلانيًا لسهولة الإعطاء والمناولة.

لأغراض الحقن في العضل، يمكن استخدام المحاليل في مادة مساعدة adjuvant مثل زيت السمسم أو زيت الفول السوداني أو في بروبيلين جليكول مائي aqueous propylene glycol، بالإضافة إلى المحاليل المائية المعقمة sterile aqueous solutions. يمكن تنظيم هذه المحاليل المائية بمحاليل منظمة، إذا رغبت في ذلك، ويتم جعل المادة المخففة السائلة liquid diluent متساوية التوتر isotonic أولا باستخدام محلول ملحي أو جلوكوز. يمكن تحضير محاليل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني كحمض حر free acid (الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين يحتوي على مجموعات فوسفات حمضي acidic phosphate) أو ملح مقبول صيدلانيا a pharmacologically acceptable salt في الماء المخلوط بشكل مناسب مع مادة خافضة للتوتر السطحي surfactant مثل هيدروكسي بروبيل سيليولوز hydroxpropylcellulose. ويمكن أيضًا أن يتم تحضير مشتت الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني في جليسرول glycerol، بولي إيثيلين جليكول سائل liquid polyethylene glycols وخلائط منها وزيوت. تحت الظروف العادية للتخزين والاستخدام، تحتوي هذه المستحضرات على مواد حافظة preservative لمنع نمو الكائنات الحية الدقيقة. وفي هذا الصدد، يمكن الحصول بسهولة على وسائط مائية معقمة sterile aqueous media باستخدام تقنيات قياسية معروفة جيدا لأولئك المهرة في المجال.

تشتمل الصور الصيدلانية المناسبة للاستخدام عن طريق الحقن على محاليل مائية معقمة أو مشتتات dispersions ومساحيق معقمة sterile powders لتحضير محاليل أو مشتتات معقمة قابلة للحقن. في جميع الحالات، يجب أن يكون شكل الجرعة معقما ويجب أن يكون سائلًا إلى الحد الذي توجد فيه قابلية سهلة لنشره. يجب أن يكون مستقرًا في ظل ظروف التصنيع والتخزين ويجب الحفاظ عليه ضد التلوث الذي قد تحدثه كائنات حية دقيقة مثل البكتيريا والفطريات. يمكن أن يكون الناقل عبارة عن مذيب solvent أو وسط تشتيت dispersion medium يحتوي على سبيل المثال، على ماء، إيثانول ethanol، بوليول polyol (على سبيل المثال، جليسيرول، بروبيلين جليكول، بولي إيثيلين جليكول سائل liquid polyethylene glycol وما شابه)، خلائط مناسبة منها، وزيوت نباتية vegetable oils. يمكن الحفاظ على السيولة المناسبة، على سبيل المثال، عن طريق استخدام غلاف

coating مثل الليسيثين lecithin، عن طريق الحفاظ على حجم الجسيمات المطلوبة في حالة التشتيت واستخدام المواد الخافضة للتوتر السطحي. يمكن تحقيق الوقاية من تأثيرات الكائنات الحية الدقيقة من خلال عوامل مضادة للجراثيم ومضادة للفطريات، على سبيل المثال، بارابين parabens، كلوروبوتانول chlorobutanol، فينول phenol، حمض السوربيك sorbic acid، الثيمروزال thimerosal وما شابه. في كثير من الحالات، سيكون من الأفضل تضمين عوامل متساوية التوتر isotonic agents، على سبيل المثال، السكريات أو كلوريد الصوديوم. يمكن أن يحدث الامتصاص المطول Prolonged absorption للتركيبات القابلة للحقن عن طريق استخدام عوامل تأخير الامتصاص agents delaying absorption، على سبيل المثال، أحادي ستيارات الألومنيوم aluminum monostearate والجيلاتين.

يتم تحضير المحاليل القابلة للحقن المعقمة Sterile injectable solutions من خلال دمج الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني بالكمية المطلوبة في المذيب المناسب مع المكونات الأخرى المختلفة المذكورة أعلاه، كما هو مطلوب، يتبعها تعقيم المرشح filter sterilization. بشكل عام، يتم تحضير التشتيت عن طريق دمج المادة الفعالة المعقمة sterilized active ingredient في ناقل معقم sterile vehicle يحتوي على وسط التشتيت الأساسي basic dispersion medium والمكونات الأخرى المطلوبة من تلك المذكورة أعلاه. في حالة المساحيق المعقمة لتحضير المحاليل القابلة للحقن المعقمة، فإن الطرق المفضلة للتحضير هي التجفيف بالتفريغ والتجفيف بالتجميد التي تنتج مسحوقًا من المكون النشط بالإضافة إلى أي مكون مرغوب إضافي من المحلول المرشح بالتعقيم sterile-filtered solution مسبقًا.

يمكن أيضًا إجراء عملية تحوير باستخدام الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني في المختبر. في أحد التجسيدات، تتم إزالة الخلايا العضلية المستهدفة target muscle cells المرغوبة من الخاضع للعلاج، ويتم تحويرها باستخدام الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وإعادة إدخالها في الخاضع للعلاج. وكبديل لذلك، يمكن استخدام خلايا العضلات المتماثلة أو غير المتماثلة النمط الجيني، حيث لا تولّد هذه الخلايا استجابة مناعية immune response مناسبة في الخاضع للعلاج.

من المعروف أن الطرق المناسبة لتحوير الخلايا المحورة transduced cells وإعادة إدخالها في خاضع للعلاج معروفة في المجال. في أحد التجسيدات، يمكن تحوير الخلايا في المختبر عن طريق

الجمع بين الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وخلايا العضلات، على سبيل المثال، في الأوساط المناسبة، وفرز تلك الخلايا التي تؤوي الحمض النووي محل الاهتمام باستخدام التقنيات التقليدية مثل بقع سزرن و/أو تفاعل البوليميراز المتسلسل polymerase chain reaction (PCR)، أو باستخدام علامات الوسم القابلة للاختيار. يمكن بعد ذلك صياغة الخلايا التي يتم تحويرها إلى تركيبات صيدلانية، ويتم إدخال التركيبة إلى الخاضع للعلاج عن طريق تقنيات مختلفة، مثل الحقن في العضل أو الوريدي أو تحت الجلد أو داخل الغشاء البريتوني intraperitoneal injection، أو عن طريق الحقن في العضلات الملساء والقلبية، باستخدام قسطرة catheter.

ينتج عن تحوير الخلايا ذات الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع تعبير مستمر عن β-سركوجليكان. يوفر الاختراع الحالي بالتالي طرق إعطاء/توصيل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني التي تعبر عن β-سركوجليكان لكائن ثديي، ويفضل أن يكون إنسانًا. وتشمل هذه الأساليب الأنسجة المحوِّرة transducing tissues (بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، أنسجة مثل العضلات والأعضاء مثل الكبد والدماغ والغدد glands مثل الغدد اللعابية salivary glands) مع واحد أو أكثر من الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع الحالي. يمكن إجراء التحوير باستخدام أطقم الجينات التي تحتوي على عناصر تحكم control elements خاصة بالنسيج. على سبيل المثال، يوفر أحد التجسيدات للاختراع طرقًا لتحويل الخلايا العضلية والأنسجة العضلية muscle tissues الموجهة بواسطة عناصر التحكم العضلية المحددة، بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، تلك المشتقة من عائلات جينات الأكتين والميوسين، مثل عائلة جين myoD [انظر Weintraub *et al., Science, 251*: 761-766 (1991)]، عامل ربط محسن خاص بخلية عضلية [Cserjesi and Olson, *Mol Cell Biol* 11: 4854-4862 (1991)]، عناصر تحكم مشتقة من جين الأكتين العظمي البشري [Muscat *et al., Mol Cell Biol*, 7: 4089-4099 (1987)]، جينة الأكتين القلبي cardiac actin gene، عناصر متوالية كرياتين كيناز العضلات muscle creatine kinase [أنظر Johnson *et al., Mol Cell Biol, 9*:3393-3399 (1989)] وعنصر الكرياتين كيناز المحسن للفئران murine creatine kinase enhancer (mCK)، عناصر التحكم المشتقة من جين تروبونين C الهيكلي سريع التحويل، جين تروبونين C القلبي بطيء التحويل، وجين تروبونين I بطيء التحويل: عوامل نووية قابلة للحث بنقص الأكسجين (Semenza *et al., Proc Natl Acad Sci USA, 88*: 5680-5684 (1991))، معززات وعناصر قابلة للحث

بالاستيروید بما في ذلك عنصر استجابة للجلايكورتيكود (انظر Mader and White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5603-5607 (1993))، وعناصر تحكم أخرى.

النسيج العضلي هدف جذاب لتوصيل الحمض النووي في داخل جسم الكائن، لأنه ليس عضو حيوي vital organ ويسهل الوصول إليه. يراعي الاختراع التعبير المستمر عن أحماض ريبوزية نووية ميكروية microRibonucleic acids (miRNAs) من الألياف العضلية المحورة وراثيا transduced myofibers.

يُقصد بالمصطلح "خلية عضلية" أو "أنسجة عضلية" خلية أو مجموعة خلايا مشتقة من العضلات من أي نوع (على سبيل المثال، العضلات الهيكلية والعضلات الملساء smooth muscle، على سبيل المثال من الجهاز الهضمي أو المثانة البولية urinary bladder أو الأوعية الدموية blood vessels أو أنسجة القلب cardiac tissue). قد تكون خلايا العضلات متمايزة أو غير متمايزة، مثل الخلايا العضلية الليفية myoblasts، الخلايا العضلية myocytes، الخلايا العضلية الأنبوبية myotubes، الخلايا العضلية القلبية cardiomyocytes، الخلايا العضلية القلبية الأولية cardiomyoblasts.

يُستخدم مصطلح "تحوير" أو تحوير وراثي للإشارة إلى إعطاء/توصيل بولي نوكليوتيد محل اهتمام (على سبيل المثال، متوالية بولي نوكليوتيد مشفرة لـ β-سركوجليكان) إلى خلية مستقبلة recipient cell إما في داخل جسم الكائن أو في المختبر، عن طريق الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني ناقص التكرار تم وصفه مما يؤدي إلى التعبير عن β-سركوجليكان من قِبَل الخلية المستقبِلة. من هنا، يصف الاختراع هنا طرقًا لإعطاء جرعة فعالة (أو جرعات، يتم إعطاؤها بشكل أساسي في وقت واحد أو جرعات تعطى على فترات) من الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني الذي يشفر β-سركوجليكان إلى كائن ثديي في حاجة إلى ذلك.

يتم تضمين جميع المطبوعات وبراءات الاختراع المذكورة هنا بالإحالة إليها في مجملها كما لو أن كل منشور أو براءة اختراع قد تم ذكرها بشكل محدد أو فردي لتضمينها. في حالة التعارض، فإن الطلب الحالي يسود بما في ذلك أي تعريفات هنا.

يتم أيضا وصف الاختراع في الأمثلة التالية، التي لا تقيد نطاق الاختراع الموصوف في عناصر الحماية.

الأمثلة

المواد والطرق

نماذج حيوانية – تمت الموافقة على جميع الإجراءات من قِبَل معهد البحوث في لجنة رعاية واستخدام الحيوان المؤسسية لمستشفى الأطفال على الصعيد الوطني (البروتوكول AR12-00040). تم شراء فئران متغايرة الزيجوت من نوع B6.129-Sgcbtm1Kcam/1J من مختبر جاكسون (بار هاربور، أم إى ME، الولايات المتحدة الأمريكية؛ سلالة # 006832). تم إنشاء فئران $sgcb^{-/-}$ عن طريق تربية الفئران متغايرة الزيجوت. تم تربية فئران كيه أوه KO والحفاظ عليها كحيوانات متماثلة الزيجوت في ظل ظروف موحدة في مركز الثروة الحيوانية في معهد البحوث بمستشفى الأطفال على الصعيد الوطني. تم الحفاظ على الفئران وفقًا للنظام الغذائي العالمي Teklad Global Rodent Diet (ألياف 3.8z5، 18.8٪ بروتين، 5٪ طعام دهني) مع دورة ليل ظلام بمقدار 12: 12 ساعة. تم إجراء تحديد فئران $sgcb^{-/-}$ بواسطة التنميط الجيني باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل. تم إيواء جميع الحيوانات في أقفاص الفئران القياسية مع حرية وصولها للطعام والشراب.

إنشاء جين β–سركوجليكان. تم إخضاع الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين المتمم cDNA) complementary Deoxyribonucleic acid) لـ β–سركوجليكان بشري كامل الطول (برقم وصول GenBank هو NM_0034994.3) لتحسن بالكودون وتخليقه بواسطة av;m GenScript Inc، Piscataway، نيوجيرسي، الولايات المتحدة الأمريكية. إن عملية التحسين الكودوني من خلال GenScript تستخدم خوارزمية تأخذ بعين الاعتبار المتغيرات التي تشمل النسخ، ومعالجة واستقبال الحمض النووى الريبوزى المرسل Messenger Ribonucleic acid (mRNA)، والترجمة الوراثية وطي البروتين لتصميم متوالية الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين المتمم ينتج عنها أقصى تعبير في الأنسجة العضلية (www.genscript.com).

بالنسبة للجزء المنشأ pAAV.tMCK.hSGCB، تم استنساخ الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين المتمم بعد ذلك إلى بلازميدة تحتوي على متواليات تكرار طرفية عكسية للفيروس الغدى 2 وتضمن الطقم متوالية Kozak توافقية consensus Kozak sequence (CCACC)، إنترون خيمري SV40، وموقع تذييل بعديد الأدينيلات تخليقي (53 زوج قاعدة). كان معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب الناتج عن عودة الاتحاد الجيني منحة من الدكتور شياو شياو (جامعة نورث كارولينا). وهو تعديل للمعزز كرياتين كيناز 6 الموصوف مسبقًا ويشتمل على تعديل في مُعزِّز قبل منطقة المعزز التي تحتوي على مواقع ربط عوامل النسخ. يتكون المعزز من مربعي E (أيمن وأيسر) يتضمن تعديل معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب طفرة في تحويل مربع E الأيسر إلى مربع E أيمن

(تعديل 2R) وإدخال 6 زوج قاعدة (تعديل S5). تم إنشاء ناقل pAAV.tMCK.hSGCB عن طريق ربط شظية KpnI/XbaI 1040 زوج قاعدة من pUC57-BSG، (Genscript Inc) بمواقع مواقع KpnI/XbaI لـ pAAV. tMCK.hSGCA.26.

تم إنشاء ناقل pAAV.MHCK7.hSGCB عن طريق إزالة معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب وإنترون خيمري SV40 بمواقع NotI/KpnI وإدخال شظية متضخمة amplified fragment تفاعل البوليميراز المتسلسل تحتوي على معزز نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي وإنترون خيمري SV40 متطابق مع مواقع NotI/KpnI. يُعد نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي مُعزّز أساسه كرياتين كيناز عضلي يستخدم محسن 206 زوج قاعدة مأخوذ من، 1.2كيلو بايت عند 5' لموقع بدء النسخ داخل جين كرياتين كيناز العضلة ذاتي المنشأ مع معزز قريب (enh358MCK, 584-bp)[3,12]. يحتوي المعزز نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي نفسه على هذا الطقم المعدل كرياتين كيناز 7 من عائلة جينات كرياتين كيناز عضلي المرتبطة بمحسن α-MyHC α-MyHC (سلسلة ثقيلة لـ α-MyHC 188) عند 5' لبروتين كرياتين كيناز لتعزيز التعبير القلبي[12]. إن جزء كرياتين كيناز للمعزز يتطابق بنسبة 96٪ بين كرياتين كيناز عضلي مقتضب ونسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي. وأخيرًا، تم إنشاء ناقل pAAV.MHCK7.hSGCB عن طريق ربط شظية إنترون NotI/KpnI MHCK7 + ذات 960 زوج قاعدة من pAAV.MHCK7.DYSF5'DV44 بمواقع NotI/KpnI من pAAV.tMCK.hSGCB (Pozgai et al., *Gene Ther.* 23: 57-66, 2016).

إنتاج الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني. تم استخدام طريقة تغليف تبادلي معدل، سبق وصفها بواسطة Rodino-Klapac et al. (*J. Trans. Med.* 5:45, 2007)، وذلك لإنتاج ناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني. في هذه الوثيقة، تسمح طريقة التحوير الوراثي الثلاثية التي تتضمن ترسيب فوسفات الكالسيوم calcium orthophosphates ($CaPO_4$) في خلايا كلوية جنينية بشرية 293 Human embryonic kidney 293 cells (HEK293) بتجميع وحدات متواليات تكرار طرفية عكسية للفيروس الغدي 2 في نوع مصلي مختلف من كابسيد الفيروس الغدي. (28، 29). كانت بلازميدات الإنتاج production plasmids (1) pAAV.tMCK.hSGCB أو pAAV.MHCK7.hSGCB، (2) بلازميدات مساعدة الفيروس الغدي معدلة بـ rep2-caprh.74 تشفر نمط مصلي كابسيد عازلة لـ rh.74، و(3) بلازميدة مساعدة من النمط الفيروسي الغدي 5

adenovirus type 5 helper plasmid (pAdhelper)، التي تعبر عن الجين E1A E2A، E4 ORF6 وVA I/II I/II. تم تنقية النواقل وتم تحديد عيار جينوم فيروسي مغلف (باستخدام نظام كاشف Prism 7500 Taqman detector system؛ PE Applied Biosystems، Carlsbad، كاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية) كما هو موضح مسبقًا. (30) استهدف البادئ primer والمسبار المتألق fluorescent probe معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب وكان كالتالي: بادئ أمامي forward primer كرياتين كيناز عضلي مقتضب، 5′-ACC CGA GAT GCC TGG TTA TAA TT-3′ (رقم تعريف المتوالية: 10)؛ بادئ عكسي reverse primer كرياتين كيناز عضلي مقتضب، 5′-TCC ATG GTG TAC AGA GCC TAA GAC-3′ (رقم تعريف المتوالية: 11)؛ ومسبار كرياتين كيناز عضلي مقتضب، 5′-FAM-CTG CTG CCT GAG CCT GAG CGG TTA C-TAMRA-3′ (رقم تعريف المتوالية: 12). استهدف البادئ والمسبار المتألق معزز نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي وكان على النحو التالي: بادئ أمامي نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي، 5’-CCA ACA CCT GCT GCC TCT AAA-3′ (رقم تعريف المتوالية: 16)؛ بادئ عكسي نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي، 5’-GTC CCC CAC AGC CTT GTT C-3 (رقم تعريف المتوالية: 17)؛ ومسبار نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي، 5’-FAM-TGG ATC CCC-Zen-TGC ATG CGA AGA TC-3IABKFQ-3′ (رقم تعريف المتوالية: 18).

توصيل الجين العضلي. للحقن في العضل، تم تخدير الفئران والاحتفاظ بها تحت 1–4 ٪ من أيزو فلوران isoflurane (في O^2). تم تنظيف الحجيرة الأمامية anterior compartment للطرف السفلي الأيسر لفئران $sgcb^{-/-}$ البالغة من العمر 4–6 أسابيع باستخدام 95٪ من إيثانول Ethanol (EtOH) ثم تم حقن عضلة البطن العرضية transverse abdominal muscle باستخدام 3×10^{11} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.HSGCB المخفف في محلول ملحي بحجم 30 ميكرو لتر باستخدام حقنة إنسولين دقيقة للغاية ultra-fine insulin syringe بمقياس 30. تُركت العضل في الجانب المقابل دون علاج لتكون بمثابة عينة مقارنة. تمت إزالة عضلة الظنبوب الأمامي من كلا الطرفين بعد 6 (n = 9، 4 ذكور، 5 إناث) أو 12 (n = 6، 4 ذكور، إناث 2) أسابيع من الحقن لتقييم كفاءة نقل الجينات. في التجارب التي شملت الفئران البالغة من العمر 6 أشهر (n = 5، 5 ذكور)، تكون العلاج من الحقن في العضل في الظنبوب الأمامي الأيسر بمقدار 3×10^{11} جينوم

فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. لتجارب تروية الطرف المعزول، تم تروية فئران sgcb$^{-/-}$ عند 4 (n = 5، 5 ذكور) و5 (n = 4، 2 ذكور، أنثى 2) أسابيع من العمر بمقدار 5 × 10^{11} جينوم فيروسي من scAAVrh.74. tMCK.hSCBB عن طريق الحقن في الشريان الفخذي كما هو موضح مسبقًا. تم التخلص من الكائنات الحيوانية بالموت الرحيم وتم تحليل العضلات بعد 8 أسابيع من نقل الجينات.

توصيل الجينات جهازيًا: تم تحقيق التوصيل الجهازي من خلال حقن الناقل في الوريد الذيلي لفئران sgcb$^{-/-}$. تم حقن الفئران باستخدام 1 × 10^{11} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB المخفف في محلول ملحي بحجم 212 ميكرو لتر باستخدام حقنة إنسولين دقيقة للغاية بمقياس 30. تم الاحتفاظ بالفئران في أنبوب احتفاظ holding tube بحيث وُضع الذيل مرة أخرى خلال فتحة الذيل لتدفئته من أجل توسيع الأوعية الدموية لتيسير الحقن. بعد تحديد موقع الشريان أسفل خط المنتصف للذيل، تم إجراء الحقن في أحد الأوردة الجانبية lateral veins الأرجوانية/الزرقاء التي تمتد بطول الوريد الذيلي tail artery. تم حقن جميع الفئران المعالجة عند 4–5 أسابيع من العمر والتخلص منها بالقتل الرحيم بعد 6 أشهر من الحقن.

توليد قوة باسطة إبهام اليد وحمايتها من التقلصات اللامركزية eccentric contractions. تم إجراء تحليل فسيولوجي لعضلات باسطة إبهام اليد من الفئران التي عولجت بالتروية المعزولة. تم تشريح العضلات باسطة إبهام اليد من كل من الطرفين الخلفيين السفليين من الفئران التي عولجت في أوتارها tendons وخضعت لبروتوكول الفسيولوجيا لتقييم وظيفة سبق وصفها من قِبَل المختبر لدينا وغيره (19، 31) مع بعض التعديلات. خلال بروتوكول التقلص اللامركزي، تم تنفيذ عملية إعادة إطالة بنسبة 5٪ بين 500 و700 ملي ثانية (إطالة بنسبة 5٪ لأكثر من 100 ملي ثانية، متبوعةً بالعودة إلى الطول الأمثل في 100 ملي ثانية). بعد بروتوكول الكزاز والتقلص اللامركزي، تمت إزالة العضلات، ووزنها في الحالة الرطبة، وتم تثبيتها على حامل باستخدام صمغ الكثيراء gum tragacanth، ثم تجميدها في ميثيل–بيوتان methyl-butane مبرد في نيتروجين سائل liquid nitrogen.

توليد قوة الظنبوب الأمامي وحمايتها من التقلصات اللامركزية. تم تنفيذ بروتوكول لتقييم النتائج الوظيفية في عضلات الظنبوب الأمامي على العضلات المستخلصة من الفئران التي عولجت بحقنة في العضل. تم توضيح هذا الإجراء الظنبوب الأمامي في العديد من الدراسات السابقة. (32، 33)

بعد التقلص اللامركزي، تم التخلص من الفئران بالقتل الرحيم ثم تم تشريح عضلات الظنبوب الأمامي، وزنها وتجميدها لتحليلها. تم إجراء تحليل للبيانات بشكل محجوب عن الخاضع للتجربة ولكن ليس بشكل عشوائي.

التألق المناعي. تم تحضين مقاطع محفوظة عند درجة حرارة مخفضة (12 ميكرو متر) باستخدام أجسام مضادة أولية بشرية أحادية النسيلة من β-سركوجليكان (Leica Biosystems, New Castle, UK; Cat. No. NCL-L-b-SARC) عند تخفيف بنسبة 1: 50 في محلول منظم كتلة block buffer (1 × تيرت-بيوتيل داى ميثيل سيليل *tert*-butyldimethylsilyl (TBS)، 10٪ من مصل الماعز، 0.1٪ من توين) لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الحجيرة في حجيرة رطبة wet chamber. ثم تم غسل المقاطع باستخدام تيرت-بيوتيل داى ميثيل سيليل ثلاث مرات، كل منها لمدة 20 دقيقة وإعادة الإعاقة لمدة 30 دقيقة. تم استخدام جسم مضاد جلوبولين مناعي ج1 Immunoglobulin G1 (IgG1) ثانوي ضد فأري من ماعز مرتبط بـ AlexaFluor 594، (Life Technologies, Grand Island, NY, USA; Cat. No. A21125) عند تخفيف بنسبة تخفيف 1: 250 لمدة 45 دقيقة. تم غسل المقاطع في تيرت-بيوتيل داى ميثيل سيليل ثلاث مرات لمدة 20 دقيقة، وتثبيتها باستخدام وسط تثبيت Vectashield mounting medium Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). تم التقاط أربع صور عشوائية ×20 تغطي الأرباع الأربعة المختلفة لمقطع العضلات باستخدام كاميرا Zeiss AxioCam MRC5. تم تحديد النسبة المئوية للألياف الإيجابية لـ β-سركوجليكان (450٪ لشدة صبغ غشاء العضلات muscle membrane) لكل صورة ومتوسطها لكل عضلة.

تحليل بقعة ويسترن. تم جمع مقاطع الأنسجة من عضلة الظنبوب الأمامي المعالجة اليسرى وعضلة الظنبوب الأمامي المقابلة (بسمك 20-20 ميكرون) في جهاز الطرد المركزي الدقيق micro-centrifuge والوصول بها إلى تجانس باستخدام 100 ميكرو لتر من محلول منظم التجانس homogenization buffer (تريس-حمض الهيدروكلوريك Tris Hydrochloric acid (Tris-HCl) بتركيز 125 مللي مولار، 4٪ من دوديسيل سلفيت الصوديوم، يوريا بتركيز 4 مولار) في وجود قرص كوكتيل مثبط 1 بروتياز protease inhibitor 1 (Roche, Indianapolis, IN, USA). بعد التجانس، تم طرد العينات عند 10.000 لفة في الدقيقة لمدة 10 دقائق عند 4 درجات مئوية. تم تحديد كمية البروتين باستخدام جهاز NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). تم

نقل عينات البروتين كهربائيا (20 ميكرو جرام) على هلام بولي أكريلاميد تريس-أسيتات polyacrylamide Tris-acetate gel بنسبة 3-8٪ (NuPage, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) لمدة 1 ساعة و5 دقائق عند 150 فولط ثم نقله إلى غشاء بولى فينيليدين داى فلوريد polyvinylidene difluoride (PVDF) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) لمدة 1 ساعة و15 دقيقة عند 35 فولط. تم إعاقة الغشاء في حليب جاف غير دهني بنسبة 5٪ في تى بى أس تى TBST لمدة ساعة واحدة، ثم تم تحضينه باستخدام جسم مضاد بشري متعدد النسائل أرنبي من β-سركوجليكان (Novus Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; Cat. No. NBP-1-90300 1:100 or 1:250 dilution) وتخفيف بنسبة 1: 5000 من جسم مضاد فأري أحادي النسيلة من جاما توبولين (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; Cat. No. T6557) أو تخفيف بنسبة 1: 5000 من جسم مضاد فأري أحادي النسيلة من ألفا-أكتينين α-actinin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA; Cat. No. A7811). تم استخدام تخفيف بنسبة 1: 500 من جسم مضاد فأري متعدد النسائل أرنبي من تربونين قلبي I (Abcam, Cambridge, MA; Cat. No. ab47003) وتخفيف بنسبة 1: 1000 من جسم مضاد فأري متعدد النسائل أرنبي من فينكولين vinculin (Invitrogen, Frederick, MD; Cat. No. 70062). تم استخدام أجسام مضادة لفأر (Millipore, Billerica, MA, USA; Cat. No. AP308P) ولأرنب (Life Technologies; Cat. No. 656120) من اتش آر بى HRP ثانوي من أجل الكشف المناعي immunodetection إى سى أل ECL.

اختبار صبغة ايفانز الزرقاء Evans blue dye (EBD). تم توصيل جرعة من 3×10^{10} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSGCB إلى فئران sgcb-/- عمرها 4 أسابيع إلى عضلة الظنبوب الأمامي اليسرى من خلال الحقن في العضل. بعد الحقن بأربعة أسابيع، تم حقن الفئران في التجويف داخل الغشاء البريتوني على الجانب الأيمن في 5 ميكرو لتر/جرام من وزن الجسم لمرشح تعقيم 10 مجم/ملليلتر من صبغة ايفانز الزرقاء في x1 محلول منظم فوسفات. بعدها، تم التخلص من الفئران بالقتل الرحيم بعد 24 ساعة من الحقن وتم حصد الأنسجة وتقطيعها إلى مقاطع. تم تثبيت المقاطع في الأسيتون البارد cold acetone لمدة 10 دقائق ثم تم استخدام بروتوكول التألق المناعي لصبغ β-سركوجليكان البشري.

تحليل مورفومترى Morphometric analysis. تم تحديد أقطار الألياف العضلية والنسبة المئوية للألياف العضلية ذات النويات المركزية من عضلات الظنبوب الأمامي وعضلات عضلة الساق

المصبوغة بالهيماتوكسيلين واليوزين. تم التقاط أربع صور عشوائية ×20 لكل مقطع لكل حيوان باستخدام كاميرا Zeiss AxioCam MRC5. تم تحديد كمية الألياف ذات النويات المركزية باستخدام برنامج NIH ImageJ (Bethesda, MD, USA). تم قياس أقطار الألياف كأقصر قطر من خلال الألياف العضلية باستخدام برنامج Zeiss Axiovision LE4، (Carl Zeiss Microscopy, Munich, Germany).

تحليل التوزيع الحيوي لتفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي. تم إجراء تقييم قياس كمي لتفاعل البوليميراز المتسلسل لتاكمان من أجل تحديد عدد نسخ جينوم الناقل الموجود في العضلة المقابلة المستهدفة وغير المستهدفة، وكذلك الأعضاء غير المستهدفة non-targeted organs كما هو موضح مسبقًا. (18، 30) تم استخدام مسبارات بادئة primer probe خاصة بناقل معين لتضخيم سلسلة من منطقة إنترون intronic region تقع بعد معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب مباشرة يتسم بأنه فريد من نوعه ويقع ضمن طقم الجين المتحور وراثيا scAAVrh.74.tMCK.hSGCB. تم استخدام البوادئ والمسبارات التالية في هذه الدراسة: بادئ أمامي للإنترون كرياتين كيناز عضلي مقتضب ونسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي: 5′-GTG AGG CAC TGG GCA GGT AA -3′ (رقم تعريف المتوالية: 13)؛ بادئ أمامي للإنترون كرياتين كيناز عضلي مقتضب ونسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي: 5′-ACC TGT GGA GAG AAA GGC AAA G -3′ (رقم تعريف المتوالية: 14)؛ ومسبار إنترون intron Probe كرياتين كيناز عضلي مقتضب ونسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي: 5′-6FAM-ATC AAG GTT ACA AGA CAG-GTT TAA GGA GAC CAA TAG AAA -tamra-3′ (IDT) (رقم تعريف المتوالية: 15). يتم ذكر عدد النسخة كجينومات ناقل vector genomes لكل ميكرو جرام من الحمض النووي الجينومي.

الخصائص الكيميائية النسيجية المناعية لصبغ خلية مناعية immune cell. تم استخدام خصائص الكيمياء النسيجية المناعية Immunohistochemistry لتحديد الخلايا المناعية immune cells. تم تحضين مقاطع من الأنسجة المجمدة Frozen tissue sections على شرائح مجهر مشحونة Fisherbrand Superfrost باستخدام أجسام مضادة للفئران أحادية النسيلة من جرذان تستخدم طقم كشف Ig HRP المضادة للفئران (BD Pharmagen, San Jose, CA, USA; Cat: 551013)؛ الفئة: CD3 (الفئة: 551013)، CD4 (الفئة: 555273) وCD8 (الفئة: 550280) وMac-3 (الفئة: 550281)

للخلايا الملتهمة الكبيرة macrophages (الفئة: 550292). تم تخفيف جميع الأجسام المضادة الأولية primary antibodies في 1:20 باستخدام محلول ملحي منظم بالفوسفات. تم تصور الصبغ المناعي الموجب باستخدام دى أيه بى DAB كروماجين chromagen مخفف في محلول منظم DAB يتضمن سترتبافيدين HRP–Streptavidin بيروكسيداز إكتاستاتين peroxidase ectastain أيه بى سى ABC بيروكسيداز. تم التقاط عشرة صور عشوائية ×40 لكل عضلة وكل صبغ مناظر. تم حساب عدد الخلايا أحادية النواة mono-nuclear cells والتعبير عنها كإجمالي لكل مم2.

صبغ بيكروسيريوس الأحمر والقياس الكمي للكولاجين. تم تثبيت المقاطع المجمدة الموضوعة على شرائح مجهر مشحونة Fisherbrand Superfrost في 10٪ من فورمالين منظَّم متعادل Neutral Buffered Formalin لمدة 5 دقائق، ثم شطفه بالماء المقطر. تم تحضين الشرائح في المحلول أ (حامض فوسفوموليدبيك Phosphomolydbic acid) من طقم صبغ بيكروسيريوس الأحمر (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA; Catalog # 24901) لمدة دقيقتين. بعد الشطف الشامل في الماء المقطر، تم وضع الشرائح في المحلول ب (Direct Red 80/2 4 6-Trinitrophenol) لمدة 15 دقيقة، ثم تم إجراء شطف إضافي في الماء المقطر ثم تم التحضين في المحلول ج (0.1 عياري من حمض هيدروكلوريد hydrochloride acid) لمدة 2 دقيقة. تم صبغ الشرائح بشكل مقابل لمدة 2.5 دقيقة باستخدام 1٪ أخضر سريع في 1٪ حمض أسيتيك الجليدي Glacial Acetic Acid من Poly Scientific (كتالوج # S2114) باستخدام تخفيف بنسبة 1: 10 في ماء منزوع الأيونات. وأخيرا، تم شطف الشرائح مرة أخرى في الماء المقطر، تجفيفها في الإيثانول المتدرج graded ethanol، تصفيتها في زيلين xylene وتثبيتها باستخدام أغطية شرائح باستخدام أوساط Cytoseal 60 من Thermo-Scientific (Waltham, MA, USA; Cat#8310). تم التقاط الصور باستخدام برنامج AxioVision الإصدار ٤,٩,١، (Carl Zeiss Microscopy). لتحليل صبغ سيريوس الأحمر والقياس الكمي لنسبة ٪ للكولاجين، تم تحسين التباين بين اللونين الأحمر والأخضر باستخدام Adobe Photoshop. تم اختيار التطبيق الصغير المتعلق بإزالة الالتفاف اللوني في برنامج ImageJ وتم استخدام خيار RGB color deconvolution. تتضمن الصورة الحمراء جميع الأنسجة الضامة connective tissue من صبغ سيريوس الأحمر. وتتضمن الصورة الخضراء جميع العضلات من الصبغ المقابل للأخضر السريع. تم استخدام الصورة الحمراء والصورة الأصلية فقط. ثم تم تطبيق عتبة حدية على الصور للحصول على صور بالأبيض والأسود ذات مناطق موجبة للكولاجين

في المناطق السوداء والسالبة في الأبيض. باستخدام دالة القياس، تم حساب مساحة الكولاجين. ثم تم تحديد إجمالي مساحة الأنسجة بتحويل الصورة الأصلية إلى "8 بت" وضبط القيمة الحدية إلى 254، والتي ستكون وحدة واحدة أقل من تشبع الصورة تمامًا. ثم تم قياس إجمالي مساحة الأنسجة كما أُجري مسبقًا وسُجلت المساحة الإجمالية. ثم تم حساب النسبة المئوية للكولاجين عن طريق قسمة منطقة الكولاجين على مجموع مساحة الأنسجة. ثم تم حساب متوسط النسبة المئوية لكل فرد.

التقلص الكزازي للحجاب الحاجز Diaphragm Tetanic Contraction للتقييم الوظيفي: تم التخلص من الفئران بالقتل الرحيم وتم تشريح الحجاب الحاجز مع عدم المسام بالملحقات الضلعية rib attachments والأوتار الوسطى central tendon، ووضعها في محلول منظم K-H كما سبق وصفه من قبل بواسطة Beastrom وآخرون. (Beastrom et al. (*Am. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011),* Rafael-Forney *et al.* (*Circulation* 124: 582-8, 2011 و Moorwood *e t al.* (*J. Visualized Experiments* 71:e50036, [year?]). تم عزل مقطع من الحجاب الحاجز بعرض 2–4 ملليمتر، وتم ربط أشرطة الحجاب الحاجز بثبات بخيوط حرارية جراحية مضفرة braided surgical silk (6/0; Surgical Specialties, Reading, PA) في الوتر المركزي central tendon، والتخييط من خلال جزء من عظمة الضلع rib bone المثبت بالطرف البعيد للشريط. تم نقل كل عضلة إلى حمام مائي مملوء بمحلول K-H بالأكسجين تم الحفاظ عليه في 37 درجة مئوية. تم محاذاة العضلات أفقيا وربطها مباشرة بين دبوس ثابت ومحرك تحويل تآزري لقوة مزدوجة dual-mode force transducer- servomotor (305C; Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canada). تم وضع اثنين من إلكترودات لوح البلاتين platinum plate electrodes في حمام العضو organ bath لتمديد العضلة. تم إطالة العضلة إلى الطول الأمثل لقياس التقلصات المنقبضة، ثم السماح بالراحة لمدة 10 دقائق قبل البدء في بروتوكول كزازي. وبمجرد ثبات العضلة، تم ضبط العضلة على طول مثالي لـ 1جم وإخضاعها للتدفئة الذي يتكون من ثلاث انقباضات 1 هرتز كل 30 ثانية تليها ثلاث انقباضات 150 هرتز كل دقيقة. بعد فترة راحة لمدة 3 دقائق، يتم تنبيه الحجاب الحاجز عند 20، 50، 80، 120، 150، 180 هرتز، مما يسمح بفترة راحة لمدة دقيقتين بين كل منبه، كل منها لمدة 250 مللي ثانية لتحديد أقصى قوة كزازية. تم قياس طول العضلات والوزن. تم قياس القوة لوزن العضلات وطولها.

التصوير بالرنين المغناطيسي للقلب: تم تحليل وظيفة القلب باستخدام نظام التصوير بالرنين

المغناطيسي لفتحة أفقية بقدرة 9.4T وملف بحجم فأري mouse volume coil (Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA). تم تخدير الفئران باستخدام 2.5 ٪ أيزو فلوران isofluorane مختلط بالكربوجين carbogen (1 لتر/دقيقة) لمدة 3 دقائق قبل وضعه على سرير التصوير. عند وضع الفئران في جهاز التصوير imaging aparatus وبدء التصوير، انخفض خليط الأيزوفلوران/الكربوجين إلى 1.5 ٪ لبقية الدراسة. تم رصد إى كيه جى EKG والتنفس باستخدام نظام متوافق مع التصوير بالرنين المغناطيسي (Model 1025, Small Animal Instruments, Stonybrook, NY, USA). تم الحصول على صور مرجحة بـ T1 بنظام فلاش قصيرة المحور للقلب على كامل البطين الأيسر left ventricle (LV) للفأر (تى آر TR = 8 مللي ثانية؛ تى إى TE = 2.8 مللي ثانية؛ □ = 180؛ المصفوفة = 256 × 256؛ أف أوه فى FOV = 3.0 × 3.0 سم؛ سمك الشريحة = 1 مم، الشرائح = 7، حتى 20 إطارًا لكل دورة قلبية). بالنسبة لتحليل الصور، تم تحديد النقطة الزمنية الانبساطية النهائية والانقباضية النهائية لكل صورة قصيرة المحور وتم تتبع حدود القلب الشغافية والنخابية يدويًا. تم استبعاد العضلات الحليمية papillary muscles من حدود الشغاف endocardial boundary لأل فى LV. من هذه المناطق المقاسة، تم حساب حجم الانبساط النهائي end-diastolic volume (EDV)، حجم الانقباض النهائي end-systolic volume (ESV)، حجم النفضة stroke volume (SV)، المخرجات القلبية cardiac output (CO)، نسبة الانقباض القلبي ejection fraction (EF)، ومتوسط كتلة LV.

التألق المناعي: تم إخضاع مقاطع مخفضة درجة الحرارة Cryostat sections (12 ميكرو متر) من الظنبوب الأمامي، عضلة الساق، العضلة رباعية الرؤوس، العضلة القطنية الكبرى، العضلة الألوية، العضلة ثلاثية الرؤوس، وعضلات الحجاب الحاجز diaphragm muscles جنبا إلى جنب مع القلب وذلك للصبغ المتألق المناعي للجين المتحور وراثيا β-سركوجليكان البشري عبر البروتوكول المستخدم مسبقًا كما هو موضح في Pozgai وآخرون، Gene Therap. 23: 57-66, 2016. تم تحضين المقاطع باستخدام جسم مضاد حيوي أولي ضد بشري أحادي النسيلة من فأر من نوع بيتا-لسركوجليكان beta-sarcoglycan (Leica Biosystems, New Castle, UK; Cat. No. NCL-L-b-SARC) بتخفيف 1: 100. تم التقاط أربع صور عشوائية 20X تغطي الأرباع الأربعة المختلفة لمقطع العضلات باستخدام كاميرا Zeiss AxioCam MRC5. تم تحديد النسبة المئوية للألياف الموجبة لبيتا-لسركوجليكان (< 50 ٪ من صبغ الغشاء العضلي) لكل صورة وأخذ المتوسط لكل

عضلة.

التحليل المورفومتري: تم إجراء صبغ هيماتوكسيلين ويوزين على مقاطع مخفضة درجة الحرارة بسمك 12 ميكرو متر لعضلات فئران C57BL6 WT بالغة من العمر 7 أشهر (n =5)، فئران $sgcb^{-/-}$ (n =5)، وفئران $sgcb^{-/-}$ معالجة بـ rAAV.MHCK7.hSGCB 6 (n =5) لستة أشهر لتحليلها. تم تحديد النسبة المئوية للألياف العضلية المنواة مركزيًا في عضلات الظنبوب الأمامي، عضلة الساق، العضلة رباعية الرؤوس، العضلة القطنية الكبرى، العضلة الألوية، العضلة ثلاثية الرؤوس، والحجاب الحاجز. بالإضافة إلى ذلك، تم قياس أقطار الألياف العضلية في العضلات عضلة الساق، العضلة القطنية الكبرى، والعضلة ثلاثية الرؤوس. تم التقاط أربع صور عشوائية 20X لكل عضلة لكل حيوان باستخدام كاميرا Zeiss AxioCam MRC5. تم قياس كمية الألياف المنواة مركزيًا باستخدام برنامج NIH ImageJ وتم قياس أقطار الألياف باستخدام برنامج Zeiss Axiovision LE4.

صور الأشعة السينية: تم إجراء أشعة سينية للجسم بالكامل على فئران C57BL6 WT البالغة من العمر 7 أشهر (n = 6)، ولم يتم علاج فئران $sgcb^{-/-}$ (n = 6)، وفئران معالجة بـ rAAV.MHCK7.hSGCB لـ 6 أشهر $sgcb^{-/-}$ (n = 6) باستخدام نظام الأشعة السينية الرقمية MX-20 Faxitron في 26 كيلو فولط لمدة 3 ثوانٍ (Faxitron X-Ray Corp, Lincolnshire, USA).

المراقبة بالليزر لنشاط القفص الميداني المفتوح: تم استخدام حجيرة نشاط مجال مفتوح لتحديد النشاط الكلي للفئران التجريبية. تم إخضاع الفئران عند عمر 7 أشهر من مجموعات المقارنة C57BL6 WT (n = 6) ومجموعات $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (n = 6) جنبا إلى جنب مع الفئران المعالجة بـ rAAV.MHCK7.hSGCB لمدة 6 أشهر من $sgcb^{-/-}$ (n = 6) لتحليلها وفقًا لبروتوكول تم وصفه مسبقًا (Kobayashi et al., *Nature* 456: 511-5, 2008, Beastrom et al., *Am. J. Pahol.* 179: 2464-74, 2011) مع العديد من التعديلات. تم اختبار جميع الفئران في نفس الوقت من اليوم في الصباح الباكر بالقرب من نهاية دورة الظلام عندما تكون الفئران في أوج نشاطها. تم اختبار جميع الفئران في حجيرة معزولة، تحت ضوء خافت وبنفس المعالج في كل مرة. للحد من القلق والحفاظ على المتغيرات السلوكية عند الحد الأدنى، والتي يمكن أن تؤثر على النشاط الطبيعي للفئران وبالتالي نتائج الفحص، لم يتم تبييت الفئران التي خضعت للاختبار بشكل فردي (Voikar et al., *Genes Brain Behav.* 4: 240-52, 2005). تم رصد نشاط الفئران باستخدام نظام نشاط Photobeam (San Diego Instruments, San Diego, CA). يستخدم هذا النظام شبكة من أشعة الضوء غير

المرئية بالأشعة تحت الحمراء infrared التي تخترق حجيرة الحيوانات من الأمام إلى الخلف ومن اليسار إلى اليمين لمراقبة موضع وحركة الفئران ضمن مستوى X-Y-Z. تم تسجيل النشاط لدورات مدتها 1 ساعة في فترات زمنية 5 دقائق. تأقلمت الفئران مع حجيرة اختبار النشاط لجلسة أولية مدتها ساعة واحدة قبل عدة أيام من بدء الحصول على البيانات. تم اختبار الفئران في حجيرات فردية في مجموعات من 4. تم تنظيف معدات الاختبار بين كل استخدام للحد من المتغيرات السلوكية الرجعية للفئران التي يمكن أن تغير نتائجنا. تم تحويل البيانات التي تم جمعها إلى ورقة عمل Microsoft Excel وتم إجراء جميع العمليات الحسابية داخل برنامج Excel. تمت إضافة فواصل شعاع beam breaks فردية للحركة في المستويين X و Y لكل فأر لتمثيل المشي الكلي، وتمت إضافة فواصل شعاع في المستوى Z للحصول على نشاط رأسي خلال فاصل زمني قدره ساعة واحدة.

المثال 1

إنشاء scAAVrh.74.tMCK.hSGCB وفعالية الناقل

تم إنشاء طقم جين محور وراثيا يحتوي على الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين المتمم ل SCGB بشري كامل الطول محسن بالكودون كما هو موضح في الأشكال 1أ. يحتوي الطقم على متوالية كوزاك توافقية (CCACC)، وإنترون خيمري SV40، وموقع تذييل بعديد الأدينيلات التخليقي synthetic polyadenylation site، ومعزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب خاص بعضلة محددة (20) يُستخدم للتعبير عن الطقم. تم تغليف الطقم إلى ناقل متمم ذاتيًا AAVrh.74 والذي يتطابق بنسبة 93٪ مع الفيروس الغدي 8. تم إثبات أن AAVrh.74 فعال وآمن في الفئران والرئيسيات لغير الإنسان، وبخاصة في عبور حاجز الأوعية الدموية عند توصيله إلى العضلات من خلال الدورة الدموية. (17، 18، 21). تم تحديد قوة الناقل عن طريق الحقن في العضل إلى عضلة الظنبوب الأمامي يسرى في فأر Sgcb-null. أدى توصيل 3×10^{10} جينوم فيروسي إلى التحوير الوراثي لـ 70.5 ± 2.5٪ من الألياف العضلية و 1×10^{11} جينوم فيروسي إلى التحوير الوراثي لـ 89.0 ± 4.0٪ من الألياف العضلية، بعد 3 أسابيع من نقل الجين.

المثال 2

التوصيل في العضل لـ scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

بعد قوة الناقل، تم تمديد الدراسات لتحليل فعالية العلاج بعد 6 و12 أسبوعًا من نقل الجين. نتيجة

لمستويات عالية من التعبير في أعقاب دراسة فعالية قصيرة على مدى 3 أسابيع، تم اختيار جرعة من 3×10^{10} جينوم فيروسي إجمالا للدراسات اللاحقة لاستخدام أقل جرعة فعالة. تم علاج فئران $sgcb^{-/-}$ لمدة 5 أسابيع باستخدام 3×10^{10} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSCGB في العضل إلى عضل البطن العرضي الأيسر وتم توضيح التعبير عن β-سركوجليكان باستخدام التألق المناعي في 88.4 ± 4.2٪ من الألياف العضلية بعد 6 أسابيع من الحقن (n = 9)، وفي 76.5 ± 5.8 ٪ من ألياف العضلات 12 أسبوعا بعد الحقن (n = 6)، وتم تأكيد التعبير عن طريق بقعة ويسترن (الشكل 1ب). ترافق التعبير عن β-سركوجليكان عن طريق ترميم مكونات مركب البروتين المرتبط بالديستروفين (α-سركوجليكان وديستروفين) (الشكل 1ج). باستخدام صبغة ايفانز الزرقاء كعلامة لنفاذية الغشاء (22، 23) وجدنا أن جميع الألياف التي تعبر عن β-سركوجليكان كانت محمية من التسرب وتضمين صبغة ايفانز الزرقاء (الشكل 1د). وتبدي عضلة من فئران $sgcb^{-/-}$ ضمور عضلي حاد بألياف منوّاة مركزيا، نخر متكرر لألياف العضلات، أنسجة متليفة fibrotic tissue وتقلبات كبيرة في حجم الألياف الممثلة بكل من الألياف الضمورية والتضخمية atrophic and hypertrophic fibers. (3، 4) كما يظهر في الشكل 2 أ، يظهر الصبغ بالهيماتوكسيلين واليوزين تحسنا عاما في النمط الظاهري للعضلة المريضة بما في ذلك انخفاض في النواة المركزية central nuclei ($sgcb^{-/-}$ غير المعالجة - 76.8 ± 2.3 ٪ مقابل الفيروس الغدي ل hSCGB. المعالجة- 38.86 ± 3.5 ٪؛ P <0.0001) (الشكل 2ج). وقد تم أيضًا مراقبة قياس توزيع حجم الألياف، مع زيادة في متوسط قطر الألياف بعد العلاج ($sgcb^{-/-}$ غير المعالجة - 32.6 ± 0.31 ميكرومتر مقابل الفيروس الغدي β-سركوجليكان البشري المعالجة - 35.56 ± 0.22 ميكرو متر؛ P <0.0001) (الشكل 2د).

السمة المرضية النسيجية للفأر scgb -/- هي التليف الذي يتميز باستبدال واسع لنسيج العضلة بالدرجة الأولى بالكولاجين جنبا إلى جنب مع مكونات أخرى خارج الخلية مثل الفبرونيكتين fibronectin والإيلاستين elastin والليمينين laminin والديكورين decorin. (14) هذا الاستبدال للأنسجة العضلية للنسيج الضام يتحدى القيمة المحتملة لاستبدال الجين وقد يحد من درجة التحسن. (24) لاختبار ذلك، تم اختبار الفئران التي تمت معالجتها لمدة 12 أسبوعًا لتقليل الإصابة بالتليف. تم تقييم عضلة الظنبوب الأمامي تحديدًا نظرًا لتحديد درجة تليفها الكامنة في نموذج KO ولأنها تمثل هدفًا محتملًا بعد توصيل الجين التروية المعزولة الوعائي. وأظهر الصبغ ببيكروسيريوس الأحمر

لكل من الكولاجين، النوعين الأول والثالث، لعضلات الظنبوب الأمامي وجود انخفاض كبير (52.74 ٪) في كمية الكولاجين الموجودة داخل العضلات scAAVrh.74.tMCK.hSGCB المعالجة مقارنة بعضلات الفأر $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (20.7 ± 0.57٪ مقابل 43.8 ± 2.3٪، AAV.hSGCB المعالجة مقابل $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة، على التوالي؛ P< 0.0001) (الشكل 2 ب وه). إن العضلة غير المعالجة لـ $sgcb^{-/-}$ البالغ عمرها 5 أسابيع في وقت الحقن حققت 24.05 ± 1.5 ٪ من ترسب الكولاجين، مما يشير إلى وجود انخفاض طفيف (14.0 ٪) في كمية الكولاجين بعد 12 أسبوعا من العلاج.

المثال 3

التصحيح الوظيفي في العضلة الهيكلية بعد نقل جين scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

لتحديد ما إذا كان نقل الجين β–سركوجليكان البشري يمكن أن يحسن وظيفة العضلات، قمنا بتقييم الخصائص الوظيفية لعضلة الظنبوب الأمامي من فئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة باستخدام scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. بعد التوصيل العضلي لـ 3×10^{10} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSCGB إلى الظنبوب الأمامي لفئران $sgcb^{-/-}$ التي عمرها أربعة أسابيع، تم خضوع عضلات الظنبوب الأمامي بعد 6 أسابيع بعد العلاج لقياسات القوة في الموقع (n = 4). تم مقارنة العضلات المعالجة بالعضلات المقابلة غير المعالجة وتلك من الفئران C57BL/6 WT. أظهرت العضلات المعالجة بـ scAAVrh.74.tMCK.hSCGB تحسنًا كبيرًا في كل من القوة الكزازية المطلقة والقوة النوعية المعدلة (الشكلين 3أ–3ب). تتضمن العضلات المعالجة متوسط قوة مطلقة 1436.9 ± 199.5 ملي نيوتن مقارنة بـ 770.9 ± 118.3 ملي نيوتن لعينات المقارنة $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (p<0.01). وبالمثل، أنتجت عضلات الظنبوب الأمامي المعالجة قوة متوسطة محددة تبلغ 254.01 ± 6.9 ملي نيوتن/مم^2 وتنتج العضلات غير المعالجة 124.2 ± 13.9 ملي نيوتن/مم^2 من القوة (p<0.01). وأخيرًا، أظهرت العضلات المعالجة باستخدام scAAVrh.74.tMCK.hSCGB مقاومة أكبر للإصابة الناجمة عن التشنج مقارنة بعضلات التحكم غير المعالجة untreated contralateral muscles (الشكل 3ج). فقدت عضلات الظنبوب الأمامي المعالجة 34.0 ± 5.1٪ من القوة الناتجة عن ذلك بعد التشنج الأول بينما فقدت العضلات المريضة غير المعالجة 54.1 ± 3.8٪ (p<0.01) من القوة وفقًا لبروتوكول التقلص اللامركزي. توضح هذه البيانات أن نقل الجين β–سركوجليكان البشري يوفر فائدة وظيفية للعضلات المريضة التي تعاني من

نقص في β-سركوجليكان.

المثال 4

علاج العضلات الهرمة باستخدام scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

أظهرت الدراسات تطور المرض في هذا النموذج من فأر ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E أنه على الرغم من أن إعادة تشكيل الأنسجة الأكثر شدة في العضلات يستغرق بين 6 و20 أسبوعًا، فإن تشريح الأنسجة العضلي يستمر في التفاقم مع التقدم في السن، مما يشبه تطور المرض لدى المرضى (3، 4، 14). وبالتالي، لمحاكاة الإعداد السريري حيث يمكن أن يحدث العلاج في سن أكبر مع حدوث تدهور أكثر تقدمًا في العضلات وتليفًا خارجًا، قمنا بعلاج فئران $sgcb^{-/-}$ البالغة من العمر 6 أشهر (n = 5) عضليًا في الظنبوب الأمامي باستخدام 3×10^{10} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSCGB. بعد 12 أسبوع من العلاج، في 9 أشهر من العمر، تم التحوير الوراثي لـ 80.1 ± 4.8٪ من ألياف العضلات (الشكل 4أ). أوضحت صبغ بيكروسيريوس الحمراء لأنواع الكولاجين I وIII انخفاض 42.2٪ في النوعان الأول والثالث في كمية الكولاجين الموجودة في عضلات الفئران المعالجة مقارنةً بعضلات فئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (AAV.hSGCB المعالجة- 20.0 ± 0.80٪ مقابل $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة - 34.6 ± 1.4٪، $p<0.0001$) (الشكلان 4ب-4ج). في عمر العلاج، تضمنت فئران $sgcb^{-/-}$ ذات الـ 6 أشهر ترسب الكولاجين 30.8 ± 2.0٪ (n = 4، 4 الذكور)؛ وبالتالي، فإن هذه النتائج تشير إلى أن العلاج باستخدام scAAVrh.74.tMCK.hSCGB لا يمنع فقط التليف الموجود، ولكن أيضًا لديه القدرة على عكسه.

المثال 5

التروية المعزولة لـ scAAVrh.74.tMCK.hSGCB في فئران $sgcb^{-/-}$

تكون القدرة على استهداف عضلات متعددة في أحد الأطراف متاحة لطريقة توصيل أكثر ملائمة من الناحية السريرية للنقل إلى مرضى ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E. تم تحليل توصيل 5×10^{11} جينوم فيروسي لـ scAAVrh.74.tMCK.hSGCB بواسطة التروية المعزولة في فئران $sgcb^{-/-}$ التي يتراوح عمرها من 4 إلى 6 أسابيع (n= 9، 7 ذكور، 2 إناث) لمدة شهرين بعد نقل الجين. وصل التعبير عن بيتا-سركوجليكان 91.8±2.8٪ في الظنبوب الأمامي (الشكل 5أ). أدى توصيل scAAVrh.74.tMCK.hSGCB إلى حماية كبيرة من الإصابات الناجمة عن التقلص اللامركزي ($p<0.05$)، التي لم تكن مختلفة عن WT، مقارنة بالعضلات المقابلة غير المعالجة

untreated contralateral muscles (الشكل 5ج). قام التوصيل عبر الأوعية الدموية أيضًا باستعادة المتغيرات المرضية للأنسجة العضلية uscle histopathological parameters (الشكل 5ب). انخفضت النوى المركزية Central nuclei في الظنبوب الأمامي ($sgcb^{-/-}$ غير معالج – 2.8±76.9٪ مقابل β–سركوجليكان البشري للفيروس الغدي. معالج – 5.7±23.2٪، p<0.001) وعضلة الساق ($sgcb^{-/-}$ غير معالج – 2.8±78.2٪ مقابل β–سركوجليكان البشري للفيروس الغدي. معالج – 6.6±16.8٪، p<0.001). يؤدي نقل الجين أيضًا إلى زيادة متوسط حجم الألياف في الظنبوب الأمامي ($sgcb^{-/-}$ غير معالج – 0.52±30.53 ميكرو متر مقابل β–سركوجليكان البشري للفيروس الغدي. معالج – 0.46±41.9 ميكرو متر، p<0.0001) وعضلة الساق ($sgcb^{-/-}$ غير معالج – 0.37±38.9 ميكرو متر مقابل β–سركوجليكان البشري للفيروس الغدي. معالج – 0.44±33.3 ميكرو متر، p<0.0001)، مع ضبط توزيع قطر الألياف، تم ملاحظة انخفاض كبير (60٪ تقريبًا) في عدد خلايا CD3، CD4 والخلايا الملتهمة الكبيرة (الجدول 1).

لجدول 1. الاستجابة المناعية في الفئران المعالجة بـ scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

وع الخلية	لظنبوب الأمامي ليسرى المعالجة (خلية/مم^2)	لظنبوب الأمامي ليمنى غير لمعالجة (خلية/مم^2)	لظنبوب الأمامي غير المعالجة لـ $^{SGCB-/-}$ (خلية/مم^2)
CD3	3.2±15.6	6.2±37.85	1.7±29.8
CD4	4.7±20.9	2.9±58.1	0.8±49.0
CD8	1.8±8.2	2.4±12.7	5.8±15.5
لخلايا الملتهمة الكبيرة	5.0±28.2	5.6±75.2	5.9±100.2

لاختصارات: ANOVA، تحليل التباين؛ ILP، تروية طرف معزول؛ SGCB، β–سركوجليكان؛ TA، الظنبوب الأمامي. القياس الكمي للخلايا المناعية الموجودة في فئران $^{SGCB-/-}$ غير المحقونة، والعضلة المعالجة بـ scAAVrh.74.tMC.hSGCB وغير المعالجة. تتبع البيانات المبينة توصيل التروية المعزولة للفيروس وتمثل متوسط عدد الخلايا/مم^2 ± س إى أم SEM، n = 8 لكل مجموعة. تم استخدام تحليل التباين أحادي الاتجاه لمقارنة لقيم من ثلاث مجموعات مختلفة. تم تخفيض مستويات الخلايا المناعية باستخدام فرق

.لالي إحصائيا ($P < 0.01$) بين العضلة الظنبوب الأمامي اليسرى المعالجة والظنبوب الأمامي اليمنى غير المعالجة و/أو الظنبوب الأمامي اليسرى المعالجة والظنبوب الأمامي غير المحقونة في كل الصبغ باستثناء CD8.

أوضح صبغ بيكروسيريوس الأحمر للظنبوب الأمامي وعضلة الساق أيضًا انخفاضًا كبيرًا في كمية الكولاجين مقارنةً بعضلة $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة بعد التوصيل الوعائي (الشكل 6أ). تم تخفيض مستويات الكولاجين في الظنبوب الأمامي إلى 21.6 ± 1.3٪ في العضلات المعالجة مقارنةً بـ 40.2 ± 1.5٪ في فئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة في عمر نقطة النهاية ($p<0.0001$). كما هو مذكور مسبقًا، تدل فئران $sgcb^{-/-}$ التي تكون في عمر الحقن المقدم بالكولاجين 24.1 ± 1.5٪ في عضلة الظنبوب الأمامي مرة أخرى على انخفاض طفيف (10.0٪) في ترسب الكولاجين بعد 8 أسابيع من العلاج. وبالمثل، أظهر صبغ عضلة عضلة الساق أن الفئران المعالجة كانت تحتوي على كولاجين 22.9 ± 0.99٪ مقارنةً بـ 37.9 ± 1.3٪ في فئران غير المعالجة عند نقطة النهاية ($p<0.0001$). تم إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل النوعي للكشف عن مستويات نَسخ الكولاجين في العضلات، والتي ترتبط بنتائج صبغ سيريوس الأحمر. عند دمجهما معًا، أوضحت هذه البيانات أن التوصيل المتوسط بالفيروس الغدي لبيتا-سركوجليكان للإنسان يقلل من التليف العضلي، ويحسن وظيفة العضلات ويعكس مرض حثلي لعضلة فئران $sgcb^{-/-}$ المريضة.

المثال 6

السلامة والتوزيع الحيوي لـ rAAVrh.74.tMCK.hSGCB

في البداية، لم تظهر فئران WT العادية التي تم حقنها بـ 3×10^{10} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSGCB في العضل في الظنبوب الأمامي أي علامات للسمية من صبغ بهيماتوكسيلين ويوزين مما يشير إلى عدم وجود آثار عكسية بسبب الفيروس. بعد التوصيل الوعائي للتروية المعزولة لإجمالي جرعة 5×10^{11} جينوم فيروسي من scAAVrh.74.tMCK.hSGCB كما هو موضح في الجزء السابق، تم تقييم السلامة في مجموعة صغيرة من الفئران في هذه المجموعة ($n = 4$). أولًا، تم تحليل العضلات المستهدفة بالتعبير عن الجين بشكل كبير، وكذلك خارج الأجهزة المستهدفة بما في ذلك القلب، الرئة، الكبد، الكلى، الطحال spleen، الغدد التناسلية gonads، والحجاب الحاجز. تمت مراجعة مقاطع البارافين Paraffin رسميًا من قبل طبيب بيطري، ولم يكن

هناك أي دليل على وجود سمية في أي جهاز تم ملاحظته (البيانات غير موضحة). تم أيضًا تقييم البروتين والتوزيع الحيوي للناقل في جميع الأنسجة والأعضاء المذكور أعلاه مع بقعة ويسترن وتفاعل البوليميراز المتسلسل الكمى، على التوالي. تم الكشف عن نُسَخ جينوم ناقل في جميع الأعضاء التي تم اختبارها؛ ومع ذلك، لم يتم الكشف عن أي تعبير عن البروتين في أي عينة أخرى غير العضلة المعالجة treated muscle (الشكل 7). وأخيرًا، لا يظهر تحليل الأوزان الرطبة للعضلات المعالجة وغير المعالجة فرقًا أو ميلًا كبيرًا عند مقارنة متوسط أوزان أي منهما (البيانات غير موضحة). توفر هذه البيانات دليلًا على أن معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب النوعي تجاه العضلات قام بتقييد التعبير بالعضلة الهيكلية ويكون الناقل غير سام.

المثال 7

القصور النسيجي والوظيفي في القلب والحجاب الحاجز لفئران β-سركوجليكان$^{-/-}$

تم تحليل WT وفئران β-سركوجليكان البالغة من العمر 7 أشهر (n = 6 لكل سلالة) التي لم يتم علاجها بواسطة التصوير بالرنين المغناطيسي للقلب وعلم وظائف الأعضاء للحاجز للبحث عن القصور. بعد تلك التحاليل المذكورة، تم التضحية بالحيوانات وتقييمها لأمراض الأنسجة (الشكل 8). أظهر الصبغ ثلاثي الألوان تليفًا كبيرًا (باللون الأحمر) في كل من الحجاب الحاجز (الشكل 8أ) والقلب (الشكل 8ج). قد يكون ذلك مصحوبًا بالقصور الوظيفي لقوة محددة في الحجاب الحاجز (116.24 ملي نيوتن/مم^2 لفئران β-سركوجليكان$^{-/-}$ مقابل 236.67 ملي نيوتن/متر^2 من WT، الشكل 8ب) والقصور الكبير في نسبة الانقباض القلبي مقاسًا بواسطة التصوير بالرنين المغناطيسي (WT، 78٪ مقابل 65٪ لفئران β-سركوجليكان$^{-/-}$، الشكل 8د).

المثال 8

فعالية الناقل وإنشاء scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

تم إنشاء طقم الجين المتحور وراثيًا الذي يحتوي على الحمض النووى الريبوزى منقوص الأكسجين المتمم ل SCGB بشري كامل الطول مُحسَّن بواسطة كودون كما هو موضح بالشكل 9أ. يشتمل الغلاف على متوالية كوزاك التوافقية (CCACC)، إنترون خيمري SV40، موقع تذييل بعديد الأدينيلات تخليقي، ونسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي خاص بعضلة محددة لتوجيه التعبير عن الغلاف. يكون ذلك عبارة عن محفز متوقف على كرياتين كيناز عضلي يستخدم مُحسن 206-bp المأخوذ من 1.2 كيلو قاعدة تقريبًا 5' من موقع بدء الانتساخ

transcription start site داخل جين كيناز الكرياتين للعضلة داخلية المنشأ التي بها محفز قريب (enh358MCK, 584-bp)[3,12]. تم تعبئة الطقم في ناقل AAVrh لمتمم ذاتي self-complementary (sc) الذي يكون متجانس بنسبة 93٪ للفيروس الغدي 8. تم توضيح الفيروس الغدي 8 في الفئران والرئيسات غير البشرية لتكون آمنة وفعالة، وبشكل محدد في عبور الحاجز الوعائي vascular barrier عند توصيله إلى العضلات من خلال الدوران. تم تأسيس فعالية الناقل (17، 18، 21) عن طريق الحقن في العضل إلى عضلة الظنبوب الأمامي اليسرى في فأر Sgcb-null. إن توصيل 3×10^{10} جينوم فيروسي قد أدى إلى تحويل أكثر من 90٪ من الألياف العضلية بعد 4 أسابيع من نقل الجين.

المثال 9

التوصيل الجهازي لـ scAAV.MHCK7.hSGCB

قمنا بتوصيل ناقل من خلال حقن الوريد الذيل إلى 14 فأر β-سركوجليكان$^{-/-}$ بجرعة مقدارها 1×10^{12} جينوم فيروسي من الجرعة الإجمالية (5×10^{13} جينوم فيروسي/كيلو جرام) لتقييم التعبير عن الجين المتحور وراثيًا وفعالية ناقلنا عند توصيله بشكل نظامي لمدة طويلة الأجل تكون 6 أشهر. تم حقن الفئران في عمر 4 أسابيع وتم إجراء تشريح كامل بعد 6 أشهر بعد الحقن (تم أخذ فأر واحد عمره شهر واحد وتم أخذ فئران عمرهما 4 أشهر كتقييمات وسيطة للتعبير). تم استخراج جميع العضلات الهيكلية skeletal muscles التي نوقشت أعلاه جنبًا إلى جنب مع الحجاب الحاجز والقلب للتحليل. كما تم إزالة الأعضاء لتحليل السموم وتحليل التوزيع الحيوي. تم استخدام الصبغ المناعي الوميضي للبيتا-سركوجليكان البشرية لتحديد التعبير عن الجين المتحور وراثيًا جين β-سركوجليكان البشري في 5 عضلات طرفية limb muscles، اليسار واليمين، بالإضافة إلى أنه تم إعطاء الحجاب الحاجز وقلب 6 من فئران KO حقن نظامية من ناقل β-سركوجليكان البشري. تضمنت هذه العضلات الظنبوب الأمامي، عضلة الساق، عضلات الفخذ، العضلة الألوية (غير موضحة)، العضلة القطنية الرئيسية، العضلة ثلاثية الرؤوس (الشكل 10). تم استخدام تحليل نوعي لنسيج القلب أيضًا لتقييم المستوى النسبي للتعبير عن الجين المتحور وراثيًا في عضلة القلب عند التوصيل. تم التقاط أربع صور 20X لكل عضلة وتم تحديد النسبة المئوية للألياف الإيجابية لـ β-سركوجليكان البشري لكل صورة مما أدى إلى تحويل متوسط النسبة المئوية لكل عضلة من كل فأر. تظهر النتائج الموضحة في الشكل 10 والشكل 11 تحويل أكبر من أو يساوي 98٪ في جميع العضلات المُحلَّلة

بما في ذلك الحجاب الحاجز والقلب. كانت الفئران التي تفتقر بيتا-سركوجليكان غير موجودة تمامًا بالبروتين عند تحليلها بواسطة الوميضية المناعية immunofluorescence. أدت الجرعة العلاجية therapeutic dose من إجمالي جرعة 1×10^{12} جينوم فيروسي إلى متوسط تحويل ناقل بنسبة 97.96 ± 0.36٪ (± SEM) عبر جميع العضلات الهيكلية بما في ذلك الحجاب الحاجز، وحوالي 95٪ أو أكثر في عضلة القلب cardiac muscle (البيانات غير موضحة).

المثال 10

التوصيل الجهازي طويل الأجل لـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB في فئران β-سركوجليكان$^{-/-}$

للبناء على نتائج اختبار الفعالية لشهر واحد الموصوفة في المثال رقم 9، تم التحقق من التوصيل الجهازي طويل الأمد (لمدة 6 أشهر) لطقم الجين المتحور وراثيًا للبيتا-سركوجليكان إلى فئران sgcb$^{-/-}$. تم علاج فئران sgcb$^{-/-}$ التي تتراوح أعمارها من 4 إلى 5 أسابيع بـ 1×10^{12} جينوم فيروسي scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB عبر وريد الذيل (n = 5). تم تشريح الفئران بعد 6 أشهر من الحقن وتم توضيح التعبير عن الجين المتحور وراثيًا β-سركوجليكان البشري عن طريق استخدام الفلورة المناعية في ستة عضلات هيكلية، كل من اليسرى واليمنى، بالإضافة إلى الحجاب الحاجز والقلب لجميع الفئران المعالجة. تضمنت العضلات الهيكلية المُحلَّلة الظنبوب الأمامي، عضلة الساق، العضلة رباعية الرؤوس، الألوية، العضلة القطنية الكبرى، والعضلة ثلاثية الرؤوس. كانت قيمة متوسط التعبير عن β-سركوجليكان البشري الناتج عن التوصيل الجهازي في الفئران المعالجة هي 98.13 ± 0.31٪ (± SEM) عبر جميع العضلات الهيكلية العظمي بما في ذلك الحجاب الحاجز، باستخدام التعبير في القلب الذي يزيد عن 95٪. يتم إظهار الصور التوضيحية في الشكل 12ب. تظهر مستويات التعبير في كل نوع من أنواع العضلات الفردية من جميع الفئران المعالجة الموضحة في الجدول 2. تؤكد بقعة ويسترن الموضحة في الشكل 12ج التعبير عن الجين المتحور يكون في جميع العضلات. توجد قيم التعبير الموضحة في الجدول 2 للعضلات المختلفة كمتوسط العضلات اليسرى واليمنى من الفئران المحقونة جهازيًا (n = 5). يتم تحديد القيم باسم SEM ± أيه فى جى AVG. بالإضافة إلى ذلك، فإن قياس التعبير عن الجين المتحور وراثيًا β-سركوجليكان البشري في قلوب الفئران المعالجة عن طريق بقعة ويسترن وقياس الكثافة يدل على الإفراط في التعبير عن β-سركوجليكان البشري لما يصل إلى 72.0٪ فوق مستويات التعبير عن BL6 WT (الشكل 12د)، ويرتبط بمستويات عالية كميًا في العضلات الهيكلية.

الجدول 2: التعبير المتألق المناعي عن β-سركوجليكان

لعضلة	سار لتوصيل Delivery Route	لجرعة (إجمالي جرعة جينوم يروسي)	قطة النهاية (أشهر)	لنسبة المئوية لـ β-سركوجليكان التي عبر عن الألياف
لظنبوب لأمامي	ي الوريد	1e12	6	0.55 ± 98.88
عضلة الساق	ي الوريد	1e12	6	0.82 ± 98.24
كيو دى QD	ي الوريد	1e12	6	0.19 ± 99.32
لعضلة الألوية	ي الوريد	1e12	6	0.39 ± 97.50
لعضلة القطنية لكبرى	ي الوريد	1e12	6	0.23 ± 98.75
لعضلة ثلاثية لرؤوس	ي الوريد	1e12	6	1.35 ± 97.21
لحجاب الحاجز	ي الوريد	1e12	6	1.26 ± 97.00
لقلب	ي الوريد	1e12	6	٪95≤

تكون إحدى سمات عضلة $sgcb^{-/-}$ الموصوفة في التقارير السابقة (Araishi et al, Hum. Mol. Genet 8: 1589-98, 1999, Durbeej et al., Mol. Cell. 5:141-51, 2000) والموضحة بواسطة صبغ الهيماتوكسيلين واليوزين لعضلة الساق والحجاب الحاجز في الشكل 13أ عبارة عن مرض تشوه الحثل بما في ذلك التنوي المركزي central nucleation، النخر، تسلل الإتهابات، والتليف. حسنت عملية نقل الجينات بشكل كبير هذا المرض، مما يخفف من العديد من هذه المزايا التصورية (الشكل 13أ). أظهر تحديد المتغيرات النسيجية histological parameters انخفاض كبير في التنوي المركزي في مختلف العضلات الهيكلية المُحلَلَة كنتيجة لنقل الجينات (الشكل 13ب). باستخدام المستويات المنخفضة المتوقعة للتنوي المركزي في فئران BL6 WT عبر جميع العضلات بمتوسط 1.89±0.39٪، كما هو ملاحظ هنا، مع الأخذ في الاعتبار جميع العضلات المُحلَلَة، بمتوسط

66.85±1.86٪ من النواة المركزية في فئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة مقارنةً بـ 36.30±5.16٪ في الفيروس الغدي. توفر عضلة $sgcb^{-/-}$ المُعالَجَة باستخدام MHCK7.hSGCB (p<0.0001) في الجدول 3 أدناه أعداد نواة مركزية وأقطار الألياف الموفَرَة للعضلات المختلفة كمتوسط (±SEM) العضلات اليسرى واليمنى من BL6 WT، $sgcb^{-/-}$، والفئران المحقونة جهازيًا (n= 5 لكل مجموعة). كما هو ملاحظ هنا، تحدث الموجة الأكثر أهمية من التنكس/التجدد في 3 أسابيع في عضلة $sgcb^{-/-}$ المشار إليها بواسطة النواة الموضوعة مركزيًا centrally placed nuclei. تم علاج الحيوانات بعد هذه الأذية، وبالتالي لم يكن متوقعا انعكاس كامل للنواة المركزية. أظهر تحليل علم أنسجة العضلات الأكثر عمقًا أن هناك تعديل في توزيع حجم الألياف مصحوبًا بزيادة في متوسط قطر الألياف في الفئران المصابة المُعالَجَة بالناقل مقارنةً بفئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة في جميع العضلات الثلاثة التي تم فحصها (عضلة الساق: عدم المعالجة بـ $sgcb^{-/-}$ 28.37±0.23− ميكرو متر مقابل المعالجة بـ AAV.Hsgcb 36.04±0.17− ميكرو متر؛ p<0.0001) (بى أس أوه PSOS: عدم المعالجة بـ $sgcb^{-/-}$ 24.75±0.23− ميكرو متر مقابل المعالجة بجين β−سركوجليكان البشري للفيروس الغدى 38.43±0.28− ميكرو متر؛ p<0.0001) (العضلة ثلاثية الرؤوس: عدم المعالجة بـ $sgcb^{-/-}$ 28±0.31− ميكرو متر مقابل المعالجة بجين β−سركوجليكان البشري للفيروس الغدى 35.56±0.22− ميكرو مولار؛ p<0.0001) (الشكلان 13ج، 13د، الجدول 3).

الجدول 3. تحليل النسبة المئوية للتنوي المركزي

مجموعة الحيوان	الجرعة (إجمالي الجرعة)	العضلة	النسبة المئوية للتنوي المركزي (A جينوم فيروسي ±SEM)	A جينوم فيروسي المدمج لنسبة المئوية لـ CN (±SEM)	قطر الألياف بالميكرو متر (A جينوم فيروسي ±SEM)
C57BL6 WT	N/A	الظنبوب الأمامي	0.86 ± 1.78	1.89 ± 0.39	N/A
		عضلة	0.41 ± 0.83		0.18 ± 39.69

مجموعة الحيوان	الجرعة (إجمالي الجرعة)	العضلة	النسبة المئوية النتوي المركزي (A جينوم بيروسي ±SEM)	A جينوم بيروسي المدمج النسبة المئوية لـ CN (±SEM)	قطر الألياف بالميكرو متر (A جينوم بيروسي ±SEM)
		الساق			
		QD	0.31 ± 0.98		N/A
		العضلة الألوية	0.68 ± 2.50		N/A
		العضلة القطنية الكبرى	0.28 ± 1.26		0.22 ± 40.96
		العضلة الثلاثية الرؤوس	0.36 ± 2.13		0.24 ± 41.53
		DIA	1.30 ± 3.75		N/A
Sgcb-/	N/A	الظنبوب الأمامي	± 70.45 3.04	± 66.85 1.86	N/A
		عضلة الساق	± 67.26 1.81		0.23 ± 28.37
		QD	± 63.57 2.09		N/A
		العضلة الألوية	± 61.34 2.05		N/A
		العضلة	± 62.73 5.20		0.22 ± 24.75

مجموعة الحيوان	الجرعة (إجمالي الجرعة)	العضلة	النسبة المئوية النتوي المركزي (A جينوم فيروسي ±SEM)	A جينوم فيروسي المدمج النسبة المئوية لـ CN (±SEM)	قطر الألياف بالميكرو متر (A جينوم فيروسي ±SEM)
		القطنية الكبرى			
		العضلة الثلاثية الرؤوس	67.11 ± 2.83		28.74 ± 0.22
		DIA	75.47 ± 3.79		N/A
AAV.MHCK7.hS GCB Treated	1.00E+12	الظنبوب الأمامي	43.85 ± 3.89	36.30 ± 5.16	N/A
		عضلة الساق	38.71 ± 3.50		36.04 ± 0.18
		QD	46.10 ± 6.26		N/A
		العضلة الألوية	42.11 ± 5.48		N/A
		العضلة القطنية الكبرى	21.00 ± 4.69		38.43 ± 0.28
		العضلة الثلاثية	48.39 ± 6.20		39.92 ± 0.27

مجموعة الحيوان	الجرعة (إجمالي الجرعة)	العضلة	النسبة المئوية التنوي المركزي (A جينوم بيروسي ±SEM)	A جينوم بيروسي المدمج النسبة المئوية لـ CN (±SEM)	قطر الألياف بالميكرو متر (A جينوم بيروسي ±SEM)
		الرؤوس			
		DIA	11.59 ± 2.08		N/A

بسبب الدور الهام الذي يلعبه مسبب المرض في نشوء مرض ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E وفعالية العلاج، فمن الحاسم إظهار نفس الفعالية في الحد من التليف. تم مشاهدة ذلك مع نقل جين β–سركوجليكان الآن بعد التوصيل الجهازي لـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB. باستخدام صبغ البيروكسيروس الأحمر للكولاجين من الأنواع I وIII، قمنا بتحليل مستويات الكولاجين في عضلة الساق وتم تحليل عضلات الحجاب الحاجز في فئران BL6 WT ذات السبعة أشهر (n=4)، فئران $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (n=4)، وفئران $sgcb^{-/-}$ المعالجة ذات الستة أشهر (n=5) بعد الحقن. أوضحت العضلات المعالجة على نحو كبير ترسب كولاجين بنسبة أقل مقارنةً بعضلات $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة (الشكل 14أ). تضمنت عضلة الساق المنتقلة بواسطة ناقل على كولاجين بنسبة 17.55±0.59٪ مقارنةً بالكولاجين 43.55±3.33٪ في عضلات $sgcb^{-/-}$ عضلة الساق غير المعالجة ($p<0.0001$). علاوة على ذلك، أظهرت عضلة الحجاب الحاجز المعالجة كولاجين بنسبة 21.67±1.09٪ كولاجين مقارنةً بـ 44.05±2.39٪ في عضلة $sgcb^{-/-}$ غير المعالجة ($p<0.0001$) (الشكل 14ب) التي أظهرت قدرة نقل جين β–سركوجليكان البشري للتخفيف عن المكون المتليف للنمط الظاهري ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E.

المثال 11

تجديد وظيفة الحجاب الحاجز بعد التوصيل الجهازي

لتحديد ما إذا كان نقل جين β–سركوجليكان البشري يمكن أن يحسن وظيفة العضلات، قمنا بتقييم الخصائص الوظيفية لعضلة الحجاب الحاجز من فئران $^{SGCB-/-}$ المعالجة باستخدام

scAAVrh.74.MHCK7.hSCGB (انظر Griffin et al. for methods). تم حدوث عجز وظيفي أول في عضلات الحجاب الحاجز لفئران β-سركوجليكان$^{-/-}$. أظهرت عضلات الحجاب الحاجز KO مخرج قوة محددة منخفض بنسبة 50.9٪ (11.24 مللي نيوتن/مم^2) مقارنةً بفئران BL6 WT (116.24 مللي نيوتن/مم^2 مقابل 236.67 مللي نيوتن/مم^2) وفقدان أكبر في القوة التالية لبروتوكول التعب الشديد rigorous fatigue protocol (فقدان 23٪ في β-سركوجليكان$^{-/-}$؛ فقدان 7٪ في BL6 WT). يؤدي توصيل الوريد الذيلي scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB الناتج في التعبير بنسبة 100٪ تقريبًا من β-سركوجليكان البشري في الحجاب الحاجز مما يؤدي إلى تجديد وظيفة الحجاب الحاجز بمخرج قوة معينة مُحسَّنَة إلى 226.07 مللي نيوتن/مم^2 ومقاومة أكبر للتعب عن طريق فقدان القوة بنسبة 12٪ (n=5) (الشكل 15).

المثال 12

توصيل scAAVrh.74.CMV.miR29C يحد من التليف في فئران β-سركوجليكان$^{-/-}$

أظهر التليف الهائل الذي حددناه في كل من العضلات الهيكلية (الأشكال 2 و4 و6) وكذلك القلب والحجاب الحاجز (الشكل 8) الحاجة إلى علاج ترسب الكولاجين (التليف) في ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E. وجدنا مسبقًا أن Mir29C هو أكثر ما تم تخفيضه من (Mir29A، Mir29B وMir29C) في ضمور العضلات muscular dystrophy. بافتراض أن Mir-29C سيتم تخفيضه أيضًا في الفئران التي تعاني من نقص في بيتا-سركوجليكان (نموذج فأر خاص بضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E). لقد تم إثبات صحة ذلك (الشكل 15). تم تخفيض مستويات Mir29C، تم زيادة مستويات التليف (الكولاجين)، وتم زيادة مكونات التليف (Co1A، Co13A، وEbn) عند مستوى الحمض النووى الريبوزى. لاختبار ما إذا كان يمكننا منع التليف باستخدام Mir29C، تم حقن ناقل العلاج الجيني scrAAVrh.74.CMV.miR29c (3×10^{11} جينوم فيروسي) في عضلة الظنبوب الأمامية لفئران β-سركوجليكان$^{-/-}$ ذات عمر الأربعة أسابيع (n=5). تم توضيح scrAAVrh.74.CMV.miR29c في الشكل 16 ووصفه في البراءة الأمريكية رقم 62/323.163، حيث يتم تضمينه هنا بالكامل كمرجع. بعد شهرين من العلاج باستخدام AAVrh.74.CMV.miR29C، تم تجميع عضلات الظنبوب الأمامي من فئران β-سركوجليكان$^{-/-}$ المعالجة والمتحكم بها وفئران WT وتحليلها للتليف (مستويات الكولاجين) (n= 5 لكل مجموعة). باستخدام قياس وصبغ سيريوس الأحمر، تم تخفيض مستويات الكولاجين بعد العلاج (انظر الشكل

17). تم ضبط مستويات نص Col1A، Col3A، وFbn وتم زيادة حجم ألياف العضلات. يتم توضيح الصورة التوضيحية للمقاطع الممسوحة ضوئيًا بالكامل من AAVrh.74.CMV.miR29C غير المعالجة والعضلات الأمامية الظنبوطية المعالجة الملونة بسيريوس الأحمر الذي يتلون بالكولاجين 1 و3 في الشكل 118. يدل ذلك على مبدأ أن scAAVrh.74.CMV.miR29C يقلل من التليف في فئران β-سركوجليكان$^{-/-}$ ويمكن استخدامه في توليفة مع الاستبدال الجيني بـ scAAVrh.74.tMCK.hSGCB أو scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB.

المثال 13

نقل جين وريدي إلى فئران β-سركوجليكان$^{-/-}$ يقلل من تقوس العمود الفقري Kyphoscoliosis للعمود الفقري الصدري

يمكن أن يرجع تنكس عضلات الجذع torso muscles بسبب تدهور الحالة المرضية للمرضى الذين يعانون من مرضى ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E إلى حداب kyphosis. يمكن أن يؤدي قصور العمود الفقري الصدري إلى إضعاف العضلات التي تدعم العمود الفقري إلى دفع الحجاب إلى الأمام، مما يزيد من قدرة الرئة ووظيفة الحجاب الحاجز. ونتيجة لشدة النمط الظاهري في فأر sgcb$^{-/-}$ مع ظهور التشريحي العياني gross anatomical appearance لتقوس العمود الفقري، وكان يستخدم لكامل الجسم الأشعة السينية التصوير الشعاعي x-ray radiography لتحديد درجة الحداب في فئران BL6 WT ذات السبعة أشهر (n=6). قامت درجة مؤشر الحدابية kyphotic index (KI) بتحديد قيمة كميّة لمستوى الجَنَف الحدابي (Laws et al. J. Appl. Physiol. 97: 1970-7, 2004). كما هو موضح باللوحة WT في الشكل 19أ، تكون درجة مؤشر الحدابية عبارة عن نسبة طول من القائمة الأمامية إلى القائمة الخلفية مقارنةً بطول الخط الأوسط إلى قمة انحناء العمود الفقري. في حين وجود فئران sgcb$^{-/-}$ مع مع العمود الفقري المنحني بشدة وانخفاض درجة مؤشر الحدابية 3.64±0.16 (n=6)، تتضمن الفئران BL6 WT عمود فقري أكثر استقامة على نحو كبير مما يؤدي إلى درجة مؤشر الحدابية أعلى 6.01±0.41 (n =6) (p<0.01) (الشكل 19ب). تُظهِر فئران sgcb$^{-/-}$ المعالجة انخفاض كبير في درجة حداب العمود الفقري مع زيادة في درجة مؤشر الحدابية إلى 5.39 ± 0.58 (n = 6) (P < 0.05) (الشكل 19ب). تشير هذه البيانات إلى أن التوصيل الوريدي لـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB مفيد للتكامل الشامل للعمود الفقري ويمكن أن يخفف من الحداب والتقلصات المشتركة الموجودة في هذا المرض. أوضحت هذه البيانات التخفيف

من الحداب وزيادة النشاط البدني في فئران $sgcb^{-/-}$ بعد تسليم التوصيل الجهازي التالي للناقل الفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني وفقًا للاختراع. تُعد هذه البيانات دليل إضافي على أن العلاج الجيني للاختراع يحسن نوعية الحياة لمرضى ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E.

المثال 14

تقييم اعتلال عضلة القلب Cardiomyopathy

تم الكشف أيضًا عن التدمير النسيجي histological destruction للعضلة وعضلة الحجاب الحاجز في عضلة القلب myocardium لفئران $sgcb^{-/-}$ ذات 7 أشهر خاصة مع وجود نخر عضلة القلب myocardial necrosis والتليف كما يتضح من هيماتوكسيلين ويوزين وصبغ بيكروسيريوس الأحمر (الشكل 20أ). تقديم وظيفة القلب الضعيف غالبًا في شكل اعتلال عضلة القلب المتوسعة مع انخفاض النتاج القلبي وانخفاض نسبة القذف fraction (Semplicini et al., Neurology 84: 1772-81, 2015, Fanin et al., Neuromuscul Disorder 13:303-9, 2003). تم استخدام التصوير بالرنين المغناطيسي للقلب لتقييم العديد من المتغيرات الوظيفية functional parameters للقلب من أجل إحداث عجز وظيفي في عضلة القلب لفئران $sgcb^{-/-}$ مقارنةً بفئران BL6 WT للاستخدام كقياس ناتج وظيفي functional outcome. أظهر تصوير فئران عينات المقارنة ذات السبعة أشهر انخفاضًا 29.4 ٪ من حجم السكتة الدماغية من 0.041 ± 0.0019 ملليلتر في قلوب $sgcb^{-/-}$ إلى 0.029 ± 0.0024 ملليلتر في قلوب BL6 WT ($p<0.01$)، وهو انخفاض ناتج القلب بنسبة 31.7٪ من 14.70 ± 0.74 ملليلتر/دقيقة في قلوب $sgcb^{-/-}$ إلى 12.72 ± 0.97 ملليلتر/دقيقة في قلوب BL6 WT، وفي النهاية انخفاض الطرد بنسبة 14.3٪، 66.21± 3.83٪ في قلوب $sgcb^{-/-}$ مقارنةً بـ 76.90± 1.67٪ في قلوب BL6 WT ($p<0.05$) (الشكل 20ب). يشير هذا إلى انخفاض متواضع في وظيفة القلب الكلية في هذا الوقت ويتجه نحو تطور اعتلال عضلة القلب. قام تجديد التعبير عن β-سركوجليكان البشري في قلوب الفئران KO من خلال التوصيل الجهازي جزئيًا بتصحيح هذا القصور، وتحسين حجم السكتة الدماغية إلى 0.032 ± 0.0027 ملليلتر، والناتج القلبي إلى 14.66 ± 0.75ملليلتر/دقيقة، وتجزئة الطرد إلى 68.16 ± 2.31٪ (الشكل 19 ب). بينما ترتبط بالتوزيع الوظيفي والنسيجي للنسيج القلبي الوارد تقرير عنه هنا، يتم تخفيض النشاف الغربي للتعبير عن تروبونين I القلبي، وهو منظم regulator مهم لوظيفة القلب ومؤشر (المؤشرات الحيوية biomarker)

حدوث تلف للقلب، في قلوب $sgcb^{-/-}$ المريضة إلى 60.38٪ للمستويات الملاحظة في الفئران BL6 WT (الشكل 20ج). يتم استعادة مستويات التروبونين القلبي I بعد العلاج إلى مستويات 35.80 ٪ من التعبير الملاحظ في قلوب WT (الشكل 20د).

المثال 15

استعادة وظيفية في عضلات الحجاب الحاجز مع زيادة في النشاط البدني

تفوّض المشاركة الهامة للاضطراب الوظيفي للحجاب الحاجز وفشل الجهاز التنفسي respiratory failure في ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E الفائدة الوظيفية إلى الحجاب الحاجز الضروري للتحقق من العلاج السريري الشامل clinical systemic therapy. مع استخدام بروتوكول تجريبي خارج جسم الكائن الحي على شرائط مأخوذة من عضلة الحجاب الحاجز، تم تقييم ما إذا كانت استعادة بيتا-سركوجليكان توفر فائدة وظيفية لهذه العضلة شديدة الاختراق. وفقًا للإصابة المرضية الكبيرة المصابة بها الفئران ذات عمر السبعة أشهر في الحجاب الحاجز، أظهرت الحجابات الحاجزة $sgcb^{-/-}$ diaphragms (n=4) عجزًا وظيفيًا مع انخفاض كبير (51٪) في ناتج قوة محدد بالمقارنة بفئران BL6 WT (n=5) (116.24 ± 10.49 مللي نيوتن/مم^2 مقابل 236.67 ± 15.87 مللي نيوتن/مم^2، على التوالي، $p < 0.001$)، بالإضافة إلى خسارة أكبر للقوة الناتجة عن ذلك بعد الانكماش الأول بعد بروتوكول التعب الشديد (خسارة 23 ± 1.0٪ في $sgcb^{-/-}$؛ 7.0±3.0٪ خسارة في BL6 WT، $p<0.05$) (الشكل 6 أ). بعد ستة أشهر من توصيل scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB عبر وريد ذيل تالي، لوحظ تحسن كبير في إنتاج قوة محددة. تم ملاحظة زيادة إنتاج القوة المعينة إلى 226.07 ± 27.12 مللي نيوتن/مم^2 (n= 5) ($p<0.05$ مقارنةً بـ $sgcb^{-/-}$) وحماية أفضل للعضلات من الإجهاد المتكرر مع فقدان قوة 12.0 ± 4.0٪ فقط ($p<0.05$ مقارنة بـ $sgcb^{-/-}$) (الشكل 21 أ). بصفة عامة، تدعم هذه البيانات النتائج التي توصلنا إليها مسبقًا في العضلات الظنبوب الأمامي وتبين أن استعادة بيتا-سركوجيليكان يوفر الانتعاش الوظيفي functional recovery في عضلة حجاب حاجز.

كثيرا ما يتم ورود تقارير عن أعراض زيادة التعب وانخفاض النشاط العام في العديد من الأمراض العصبية والعضلية، ويرجع ذلك جزئيا إلى حدوث حداب. ونتيجة لذلك، ومع الأخذ في الاعتبار النمط الظاهري لضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E، تم الافتراض بأن الفئران KO سيكون من الطبيعي أن تكون أقل نشاطًا مقارنةً بفئران WT الصحية، وعلاوة على ذلك، فإن التوصيل

الجهازي لـ rAAV.MHCK7.hSGCB إلى فئران $sgcb^{-/-}$ سيؤدي إلى فئران أكثر نشاطًا جسديًا. من أجل اختبار هذه الفرضية والفوائد الوظيفية الإضافية المحتملة لنقل الجينات، يتم إجراء مراقبة بالليزر لبروتوكول نشاط القفص في الحقول المفتوحة بشكل مماثل لما هو موصوف في Kobayashi et al., Nature 456: 511-5, 2008 و Beastrom et al., Am. J. Pathol. 179: 2464-74, 2011، الذي تم اجراءه على جميع مجموعات الفئران. توضح الرسوم البيانية في الشكل 21ب انخفاضا كبيرا (55.5٪) في الفئران KO بالمقارنة مع WT، في كل من التمشي الكلي (الحركة الأفقية في اللوحات x وy) والوقوف العمودي على الطرف الخلفي. إن متوسط عدد فواصل أشعة الليزر المتحركة ambulatory laser beam breaks الأفقية على مدى فترة ساعة واحدة في فئران WT هي 7355±400.8 (n=6) مقارنةً بـ 3271 ± 483.8 (n= 6) في فئران KO (p<0.0001). علاوةً على ذلك، كان متوسط عدد فترات تنشئة فواصل الشعاع الرأسية vertical rearing beam breaks المسجلة في فئران WT 626.7±53.76 بدلًا من 264.5 ± 63.36 في فئران KO (p<0.01) (الشكل 21 ب). وفقًا للفرضية الأولية، كانت الفئران المعالجة RAAV.MHCK7.hSGCB أكثر نشاطًا بشكل ملحوظ مقارنةً بفئران KO التي تم توضيحها في تقدير النشاط، حيث ازداد التجميع الكلي بنسبة 22٪ إلى 5143 ± 293.2 فواصل شعاع (p<0.05) ووقوف عمودي على الطرف الخلفي بشكل كبير بنسبة 77٪ إلى 615.3 ± 95.93 فواصل شعاع (p<0.05) في الفئران المعالجة (n = 6) (الشكل 21 ب).

المثال 16

الأمان والتوزيع الحيوي لـ rAAVrh.74.MHCK7.hSGCB

تم تقييم مخاوف السمية أو السلامة المحتملة للعلاج الجيني β-سركوجليكان البشري في فئران $sgcb^{-/-}$ التي عمرها 6 أشهر بعد التوصيل الجهازي لـ scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB عند الجرعة الإجمالية (5×10^{13} ميكرو جرام/كيلو جرام). تم تحليل التوزيع الحيوي للناقل والتعبير عن جين متحور وراثيًا خارج النطاق المستهدف على عينات الأنسجة tissue samples (الظنبوب الأمامي، العضلة ثلاثية الرؤوس، الحجاب الحاجز، القلب، الغدد التناسلية، الرئتين، الكلى، الكبد، الطحال) من حيوانات $sgcb^{-/-}$ التي تم اعطاءها جرعة من ناقل باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي وبقعة ويسترن، على التوالي. باستخدام مجموعات مسبار أولي محدد لناقل، تم الكشف عن جينومات ناقل MHCK7.hSGCB عند مستويات مختلفة في جميع الأنسجة التي تم جمعها. كما هو متوقع،

تم رؤية أعلى المستويات في الكبد وكذلك عضلات الهيكل العظمي والقلب، مما يدل على أن مادة الاختبار قد تم توصيلها بكفاءة بجميع عضلات الفئران التي تم إعطاءها جرعة بها ناقل (الشكل 22أ). علاوة على ذلك، أكدت بقعة ويسترن للكشف عن تعبير بروتين جين β-سركوجليكان البشري وظيفة محفز نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي محدد للعضلة والتعبير عن الجينات المحولة وراثيًا المقيدة بعضلة القلب والعضلة الهيكلية. تم ملاحظة التعبير عن بروتين β-سركوجليكان بكميات متفاوتة في جميع عينات العضلات الهيكلية وكذلك عينات من القلب، والأهم من ذلك أنه لم يتم اكتشافه في أي نسيج غير عضلي non-muscle tissue (الشكل 22 ب)، مدعومًا بحقيقة أن بيتاسركوجليكان معروف بأنه البروتين العضلي المحدد. وأخيرا، تم إجراء عملية صبغ باستخدام الهيماتوكسيلين واليوزين للمقطع البارد من الأنسجة العضلية وتم حصد جميع أعضاء الجسم التي لا تكون موجودة بمكانها من خمسة فئران $sgcb^{-/-}$ جنبًا إلى جنب مع خمسة فئران C57BL6 WT معالجة جهازيًا باستخدام الناقل الخاص بنا في الجرعة العلاجية المستخدمة في هذه الدراسة. تم بعد ذلك مراجعة هذه المقاطع بشكل أساسي كشفا عن التسمم من قبل أخصائي الأمراض البيطرية ولم يتم اكتشاف أي آثار ضارة في أي عينة من أي من الفئران. عند النظر إلى كل ذلك مجتمعين، تدل هذه البيانات على أن مادة الاختبار هذه كانت جيدة التحمل من قِبَل حيوانات الاختبار.

تم تحقيق حقيقة أن هذه المستويات العالية من التحوير الوراثي في جميع العضلات في جميع أنحاء الجسم قد تم إدراكها دون أي آثار سلبية ويؤدي استخدام جرعة منخفضة نسبيًا (إجمالي جرعة 1×10^{12} جينوم فيروسي؛ 5×10^{13} جينوم فيروسي/كيلوجرام) إلى تقديم بشرى كبيرة بالانتقال إلى مرضى ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E. من الناحية السريرية، تكون الجرعة المستخدمة في التجارب الموصوفة هنا أقل بكثير من الجرعة المستخدمة في التوصيل الجهازي لأس أم أن SMN1 1 الذي يعبر عن علاج الفيروس الغدي الموصَّل إلى الأطفال الرضع الذين يعانون من أس أم أيه SMA، وهو حاليا في التجارب السريرية (Mendell et al.، Mol. Ther 24: S190، 2016). إن استعادة الكفاءة بشكل عالي للتعبير عن β-سركوجليكان باستخدام معزز نسخة مهجنة من سلسلة ثقيلة للميوسين وكرياتين كيناز عضلي المصاحب للفوائد الوظيفية هو أمر مشجع جدًا في مستويات الجرعات التي يمكن تطبيقها سريريًا، ونظرا لارتفاع نسبة إصابة القلب في نقص β-سركوجليكان في مرضى ضمور عضلات حزام الأطراف من النوع 2E، يوفر التوصيل الجهازي فائدة

كبيرة لهؤلاء المرضى.

المراجع:

1 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. Nat Genet 1995; 11: 266–273.

2 Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65: 995–1003.

3 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E et al. Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. Hum Mol Genet 1999; 8: 1589–1598.

4 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL et al. Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. Mol Cell 2000; 5: 141–151.

5 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK et al. Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). Hum Mol Genet 1996; 5: 1953–1961.

6 Angelini C, Fanin M, Freda MP, Duggan DJ, Siciliano G, Hoffman EP. The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. Neurology 1999; 52: 176–179.

7 Sandona D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. Exp Rev Mol Med 2009; 11: e28.

8 Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C. LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. Neuromusc Disord 2003; 13: 303–309.

9 Sveen ML, Thune JJ, Kober L, Vissing J. Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. Arch Neurol 2008; 65: 1196–1201.

10 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Danieli GA et al. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. Muscle Nerve 1999; 22: 473–479.

11 Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. Neurology 2014; 83: 1453–1463.

12 Wong-Kisiel LC, Kuntz NL. Two siblings with limb-girdle muscular dystrophy type 2E responsive to deflazacort. Neuromusc Disord 2010; 20: 122–124.

13 Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoni R, Vitali A, Felisari G et al. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. J Med Genet 2000; 37: 102–107.

14 Gibertini S, Zanotti S, Savadori P, Curcio M, Saredi S, Salerno F et al. Fibrosis and inflammation are greater in muscles of beta-sarcoglycan-null mouse than mdx mouse.

Cell Tissue Res 2014; 356: 427–443.
15 McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene Ther 2003; 10: 2112–2118.
16 McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. Gene Ther 2001; 8: 1248–1254.
17 Chicoine LG, Rodino-Klapac LR, Shao G, Xu R, Bremer WG, Camboni M et al. Vascular delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin alpha2 surrogates. Mol Ther 2014; 22: 713–724.
18 Rodino-Klapac LR, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Malik V, Davis N et al. Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery. Mol Ther 2010; 18: 109–117.
19 Rodino-Klapac LR, Janssen PM, Montgomery CL, Coley BD, Chicoine LG, Clark KR et al. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. J Transl Med 2007; 5: 45.
20 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L et al. Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. Gene Ther 2008; 15: 1489–1499.
21 Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on micro-dystrophin gene expression following vascular delivery. Mol Ther 2014; 22: 338–347.
22 Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. J Biochem 1995; 118: 959–964.
23 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. J Cell Biol 1997; 139: 375–385.
24 Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. Mol Ther 2015; 23: 192–201.
25 Dressman D, Araishi K, Imamura M, Sasaoka T, Liu LA, Engvall E et al. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. Hum Gene Ther 2002; 13: 1631–1646.
26 Rodino-Klapac LR, Lee JS, Mulligan RC, Clark KR, Mendell JR. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. Neurology 2008; 71: 240–247.
27 Shield MA, Haugen HS, Clegg CH, Hauschka SD. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expres¬sion in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. Mol Cell Biol 1996; 16: 5058–5068.
28 Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV

serotypes enables transduction with broad specificity. J Virol 2002; 76: 791–801.
29 Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc 2006; 1: 1412–1428.
30 Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. Hum Gene Ther 1999; 10: 1031–1039.
31 Liu M, Yue Y, Harper SQ, Grange RW, Chamberlain JS, Duan D. Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. Mol Ther 2005; 11: 245–256.
32 Hakim CH, Grange RW, Duan D. The passive mechanical properties of the extensor digitorum longus muscle are compromised in 2- to 20-mo-old mdx mice. J Appl Physiol 2011; 110: 1656–1663.
33 Wein N, Vulin A, Falzarano MS, Szigyarto CA, Maiti B, Findlay A et al. Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. Nat Med 2014; 20: 992–1000.

قائمة التتابع

"أ" زوج قاعدة

"ب" ITRΔ

"ج" ITR

"د" GAPDH

"هـ" كيلو دالتون

"و" hSGCB

"ز" AAV.tMCK.hSGCB-12 wks

"ح" AAV.tMCK.hSGCB-6 wks

"ط" β-SG KO غير معالج

"ي" النوع غير المعالج

"ك" KO

"ل" AAV.tMCK7.hSGCB

"م" AAV.tMCK.hSGCB- صبغ ايفانز الازرق

"ن" الفا-سركوجليكان

"س" ديستروفين

"ع" C57BL/6WT

"ف" KOTA غير معالج

"ص" BLB WT TA

"ق" اقطار الالياف

"ر" التكرار النسبي٪

"ش" نوى مركزية٪

"ت" ٪ من الكولاجين

"ث" BL6 WT

"خ" BSG KO - 5wks

"ذ" القوة النوعية

"ض" القوة المطلقة

"أ1" ٪ الكولاجين

"ب1" القوة المطلقة (مللي نيتون)

"ج1" القوة النوعية (مللي نيوتن / مم2)

"د1" القوة (جزء من التقلص الاول)

"هـ1" التقلص اللامركزي (رقم الدورة)

"و1" β-SG KO 6 Month

"ز1" TA

"ح1" GAS

"ط1" GAPDH 48 كيلو دالتون

"ي1" hSGCB 43 كيلو دالتون

"ك1" الحاجب الحاجز

"ل1" β-SG KO

"م1" LTA

"ن1" LGAS

"س1" النسبة المئوية للقوة عقب الاصابة

"ع1" عضلة الساق

"ف1" نسخ / ميكرو جرام من الحمض النووي

"ص1" RTA

"ق1" الغدة التناسلية

"ر1" القلب

"ش1" الرئة

"ت1" الكلية

"ث1" الكبد

"خ1" الطحال

"ذ1" الحجاب الحاجز

"ض1" العضو/النسيج

"أ2" كيلو دالتون

"ب2" القوة النوعية

"ج2" BSG KO

"د2" نسبة الانقباض القلبي ٪

"هـ2" من النوع الغير معالج

"و2" KO

"ز2" نسبة الانقباض القلبي

"ح2" طقم

"ط2" توصيل scAAVrh.74.MHCK7.hSGCB عبر الوريد الذيلي لفئران -/- SGCB يؤدي الى تحوير وراثي بنسبة حوالي 100٪ لالياف الغضلات في كل عضلة

"ي2" QUAD

"ك2" PSOAS

"ل2" TRI

"م2" ايسر

"ن2" ايمن

"س2" BL6 WT TA

"ع2" BSG KO TA

"ف2" GLUT

"ص2" TRICEP

"ق2" التعبير عن hSGCB في عضلة القلب

"ر2" التعبير عن hSGCB في العضلة

"ش2" التعبير عن جزء SGCB القبلى

"ت2" التعبير النسبي

"ث2" BSG KO المعالجة

"خ2" β- SG KO غير معالجة

"ذ2" ٪ النوي المركزية

"ض2" DIA

"أ3" قطر الالياف (ميكرو متر)

"ب3" GAS معالجة

"ج3" KO GAS غير معالجة

"د3" BL6 WT GAS

"هـ3" PSOAS معالجة

"و3" KO PSOAS غير معالجة

"ز3" BL6 WT PSOAS

"ح3" TRI معالجة

"ط3" KO TRI غير معالجة

"ي3" BL6 WT TRI

"ك3" التكرار النسبي (النسب المئوية)

"ل3" Avg متوسط القطر (ميكرو متر)

"م3" الارهاق

"ن3" القوة النوعية

"س3" MHCK7.hSGCB بعد 6 اشهر من التعطاء في الوريد، e12vg1

"ع3" BSG KO غير معالجة

"ف3" CMV

"ص3" رقم تعريف المتوالية: 9: miR-29C في سلسلة miR-30 رئيسية

"ق3" Col1A

"ر3" Mir نستويات

"ش3" قيم متوسط قطر الالياف

"ت3" Fbn

"ث3" CoI3A

"خ3" التعبير النسبي Col1A/Gapdh

"ذ3" التعبير النسبي Fbn/Gapdh

"ض3" التعبير النسبي Col3A/Gapdh

"أ4" C57bl6

"ب4" BSG KO غير معالجة

"ج4" BSG محقون

"د4" BSG في الجانب المقابل

"هـ4" cmv.miR.29c

"و4" فئران -/- SGCB معالجة ب AAVrh.74.mir29c

"ز4" SGCB غير معالجة -/-

"ح4" جنف حدابي

"ط4" مؤشر حدابي (ab/CD)

"ي4" الهيموتوكسيلين واليوزين

"ك4" بيكروسيوس الاحمر

"ل4" نسبة الانقباض القلبي

"م4" خرج قلبي

"ن4" حجم النفضة

"س4" حجم النفضة (ملليلتر)

"ع4" خرج قلبي (ملليلتر/دقيقة)

"ف4" نسبة الانقباض القلبي ٪

"ص4" التعبير عن بروتين cTrpl

"ق4" التعبير عن cTrpl في العضلة القلبية

"ر4" الفينكولين 100 كيلو دالنون

"ش4" cTripl 25 كيلو دالتون

"ت4" فواصل شعاع

"ث4" عدد التركيزات

"خ4" النشاط العمودي

"ذ4" المشي

"ض4" ٪ من القوة المحتجزة

"أ5" توزيع حيوي qPCR ل AAV.MHCK7.hSGCB في الوريد

"ب5" توزيع hSGCB حيوي

"ج5" الفينكولين 125 كيلو دالنون

"د5" الفينكولين 25 كيلو دالنون

"هـ5" LTRI

"و5" محسن/معزز tMCK

"ز5" Syn pA

"ح5" scAAVrh.74.tMCK.hSGCB

"ط5" Pa

"أ6" Intron

"ب6" MHCK7

"ج6" h.SGCB cDNA

"د6" qd

عناصر الحماية

1. ناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus (AAV) ناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant يشتمل على متوالية البولي نوكليوتيد polynucleotide التي تشفر β-سركوجليكان β-sarcoglycan، حيث تشتمل متوالية البولي نوكليوتيد polynucleotide على متوالية نوكليوتيد nucleotide تتطابق بنسبة 95٪ على الأقل مع المتوالية بهوية رقم: 2.

2. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant مشتمل على متوالية بولي نوكليوتيد polynucleotide تشفر β-سركوجليكان β-sarcoglycan مطابقة بنسبة 95٪ مع المتوالية بهوية رقم: 1.

3. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث تشتمل متوالية البولي نوكليوتيد polynucleotide التي تشفر β-سركوجليكان β-sarcoglycan على متوالية النوكليوتيد nucleotide المذكورة في المتوالية بهوية رقم: 1.

4. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لعنصر الحماية 2، حيث تشفر متوالية البولي نوكليوتيد polynucleotide β-سركوجليكان β-sarcoglycan من المتوالية بهوية رقم: 2.

5. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي واحد من عناصر الحماية 1-4، حيث يكون الناقل vector من النمط المصلي الفيروس الغدي Adeno-associated virus 1 1، الفيروس الغدي AAV2 Adeno-associated virus 2 2، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 4 4، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 5 5، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 6 6، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 7 7، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 8 8، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 9 9، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 10 10، الفيروس الغدي Adeno-associated virus 11

11، الفيروس الغدي 12 Adeno-associated virus 12، الفيروس الغدي 13 Adeno-associated virus 13 أو AAV rh.74.

6. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4، حيث يتم ربط متوالية البولي نوكليوتيد polynucleotide التي ترمز β-ساركوجليكان β-sarcoglycan بفعالية بعنصر مقارنة خاص بعضلة معينة muscle-specific control element.

7. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لعنصر الحماية 6، حيث يكون عنصر المقارنة الخاص بالعضلة muscle-specific control element عبارة عن عنصر جين gene element أكتين هيكلي بشري human skeletal actin، عنصر جين أكتين قلبي cardiac actin gene element، عنصر محسن عامل ارتباط binding factor انتقائي للخلية العضلية mef myocyte-specific enhancer، معزز كرياتين كيناز عضلي muscle creatine kinase (MCK)، معزز كرياتين كيناز عضلي مقتضب truncated muscle creatine kinase (tMCK) (كرياتين كيناز عضلي مقتضب truncated muscle creatine kinase)، معزز سلسلة ثقيلة للميوسين myosin heavy chain (MHC)، معزز MHCK7 (نسخة مهجنة hybrid version من سلسلة ثقيلة للميوسين myosin heavy chain وكرياتين كيناز عضلي muscle creatine kinase)، C5- 12 (معزز تخليقي synthetic promoter)، عنصر محسن enhancer element كرياتين كيناز فأري murine creatine kinase، عنصر جين gene element تروبونين C هيكلي سريع التحويل skeletal fast-twitch troponin c، عنصر جين gene element تروبونين C قلبي بطيء التحويل slow-twitch cardiac troponin c، عنصر جين gene element تروبونين I بطيء التحويل slow-twitch troponin i، عنصر استجابة عامل نووي قابلة للحث بنقص التأكسج hypoxia-inducible nuclear response element، عنصر قابل للحث بالستيرويد steroid-inducible element أو عنصر ربط للجلوكوكورتيكويد glucocorticoid response element (gre).

8. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant

وفقًا لعنصر الحماية 7، حيث يكون عنصر المقارنة الخاص بعضلة معينة muscle-specific control element كرياتين كيناز عضلي مقتضب truncated muscle creatine kinase.

9. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لعنصر الحماية 7، حيث يكون عنصر المقارنة الخاص بعضلة معينة muscle-specific control element لنسخة مهجنة hybrid version من سلسلة ثقيلة للميوسين myosin heavy chain وكرياتين كيناز عضلي muscle creatine kinase.

10. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4 يشتمل على متوالية النوكليوتيد nucleotide المذكورة في المتوالية بهوية رقم: 3.

11. الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4 يشتمل متوالية النوكليوتيد nucleotide المذكورة في المتوالية بهوية رقم: 5.

12. تركيبة تشتمل على الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4.

13. تركيبة تشتمل على الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4 لتقليل التليف fibrosis في كائن ثديي في حاجة إلى ذلك.

14. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 13، حيث يعاني الخاضع الثديي للعلاج من ضمور العضلات muscular dystrophy.

15. تركيبة تشتمل على الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4 لعلاج اعتلال β-سركوجليكان β- sarcoglycanopathy في كائن ثديي في حاجة إلى ذلك.

16. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 15، حيث يعاني الخاضع للعلاج من ضمور العضلات muscular dystrophy.

17. تركيبة تشتمل على الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4 لزيادة القوة العضلية muscular force في كائن ثديي يعاني من ضمور العضلات muscular dystrophy.

18. تركيبة تشتمل على الناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant وفقًا لأي من عناصر الحماية 1-4.

19. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 18، حيث يكون ضمور العضلات muscular dystrophy عبارة عن ضمور عضلات حزام الأطراف limb-girdle muscular dystrophy.

20. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 17 حيث تشتمل أيضًا على ناقل الفيروس الغدي Adeno-associated virus ثان ناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant يتضمن متوالية النوكليوتيد miR-29 nucleotide miR-29.

21. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 20 حيث يشتمل الناقل الثاني للفيروس الغدي الناتج عن عودة الاتحاد الجيني recombinant Adeno-associated virus (rAAV) على متوالية النوكليوتيد nucleotide المذكورة في المتوالية بهوية رقم: 9 أو متوالية النوكليوتيد nucleotide المذكورة في المتوالية بهوية رقم: 8.

22. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 13 حيث يتم صياغتها للحقن في العضل intramuscular injection أو الحقن في الوريد intravenous injection.

23. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 22 التي يتم صياغتها للإعطاء الجهازي systemic administration.

24. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 23، حيث يكون الإعطاء الجهازي systemic administration عبارة عن إعطاء بطريق غير الجهاز الهضمي parenteral administration عن طريق الحقن أو التسريب أو الغرس.

25. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 16 التي تتم صياغتها للحقن داخل العضل أو الحقن داخل الوريد.

26. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 25 والتي تتم صياغتها للإعطاء الجهازي systemic administration.

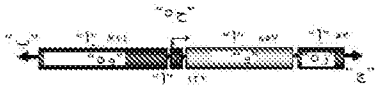
27. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 26، حيث يكون الإعطاء الجهازي systemic administration عبارة عن إعطاء بطريق غير الجهاز الهضمي parenteral administration عن طريق الحقن أو التسريب أو الغرس.

28. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 17 التي تتم صياغتها للحقن داخل العضل أو الحقن داخل الوريد.

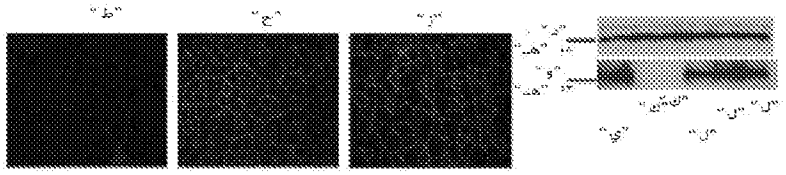
29. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 28 والتي تتم صياغتها للإعطاء الجهازي systemic administration.

30. التركيبة وفقًا لعنصر الحماية 29، حيث يكون الإعطاء الجهازي systemic administration عبارة عن إعطاء بطريق غير الجهاز الهضمي parenteral administration عن طريق الحقن أو

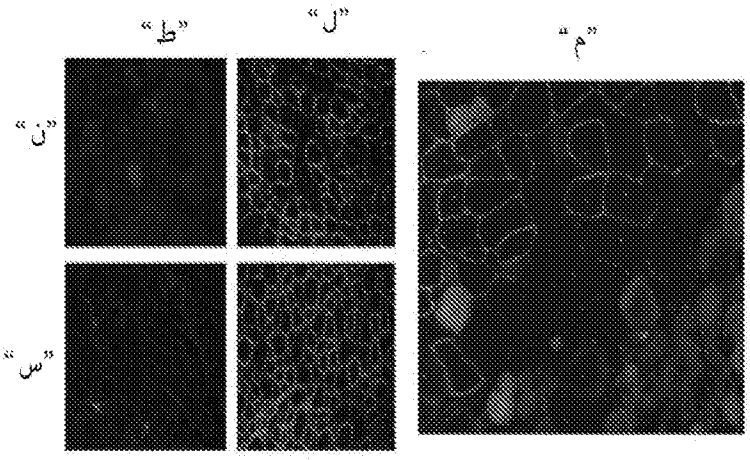
التسريب أو الغرس.



الشكل ١أ

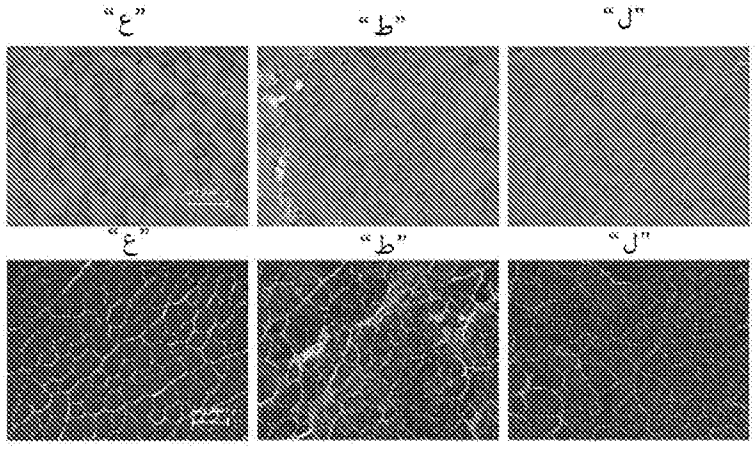


الشكل ١ب



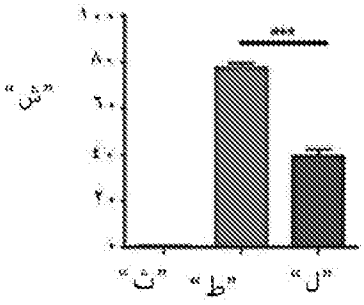
الشكل ١ ج

الشكل ١ د



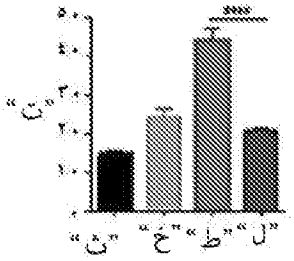
الشكل ٢أ

الشكل ٢ب

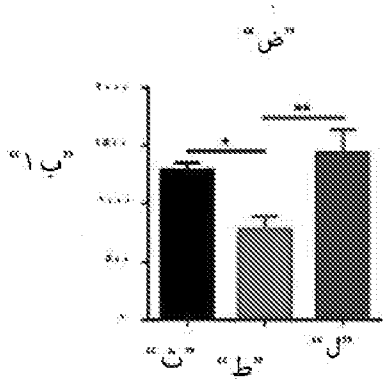


الشكل ٢ج

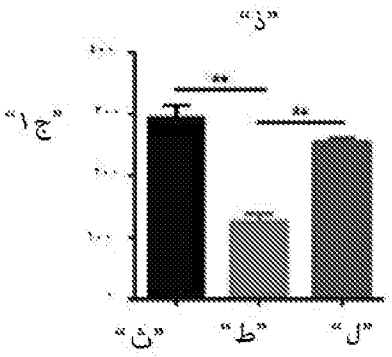
الشكل ٢د



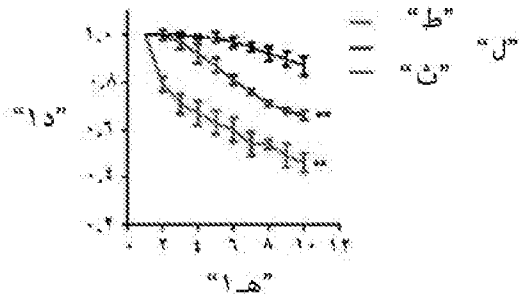
الشكل ٢هـ



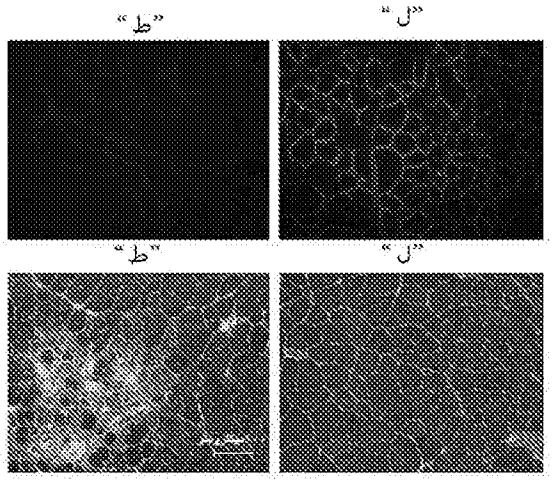
الشكل ٣ أ



الشكل ٣ ب

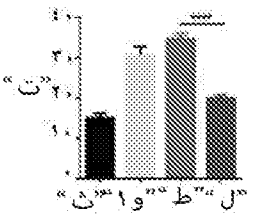


الشكل ٣ ج

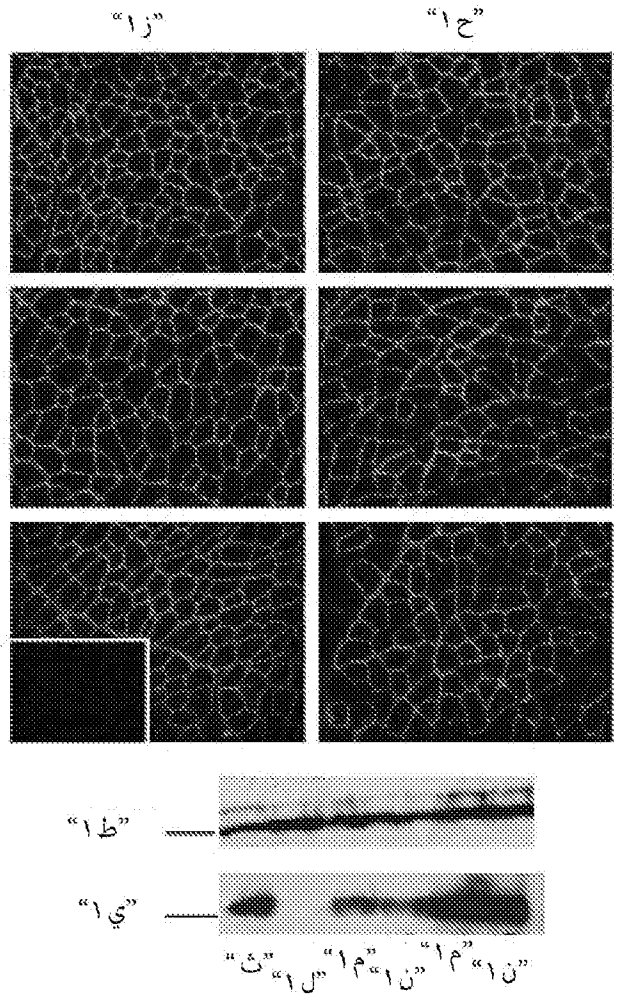


الشكل ٤أ

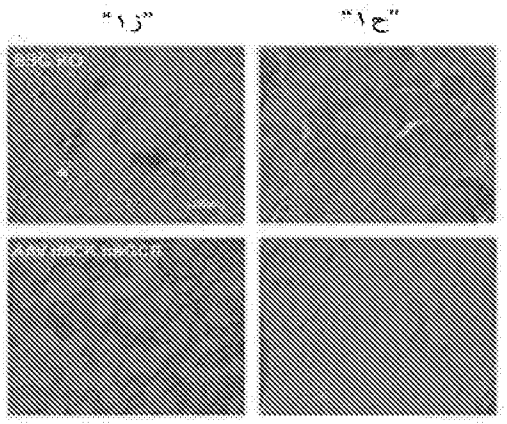
الشكل ٤ب



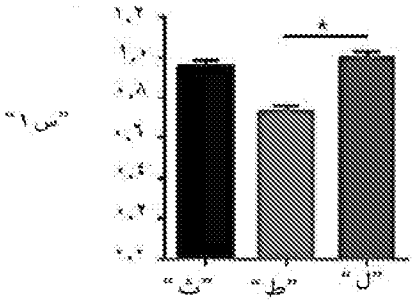
الشكل ٤ج



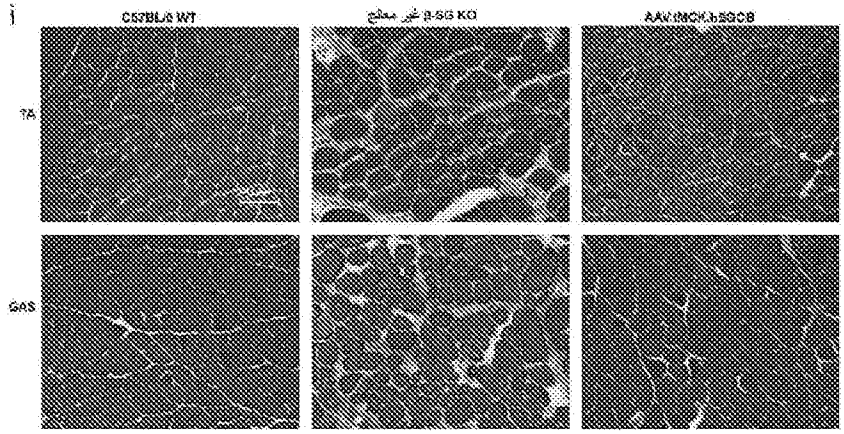
الشكل ٥أ



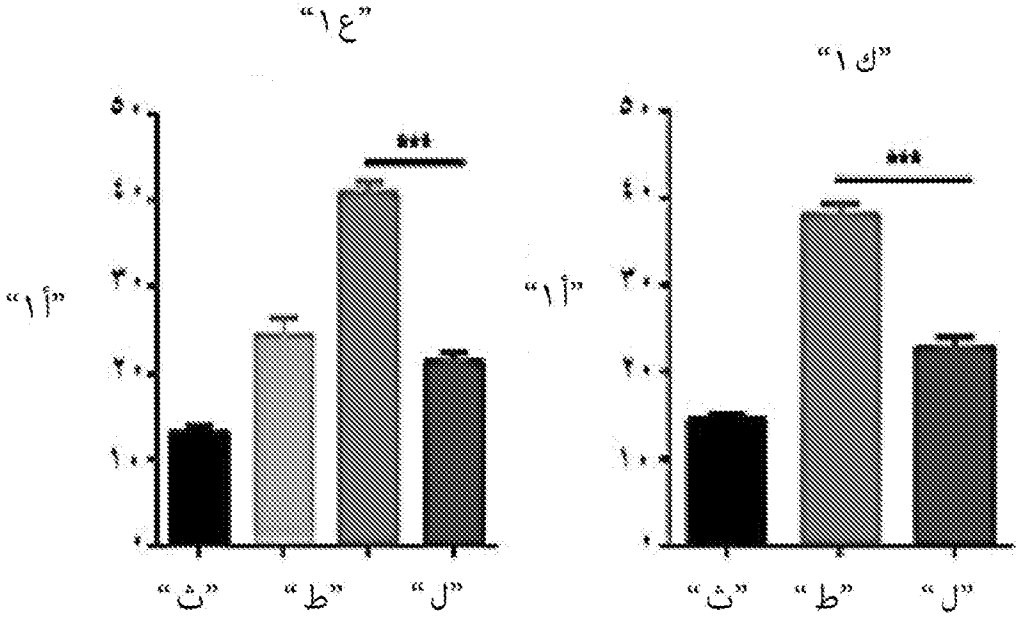
الشكل ٥ب



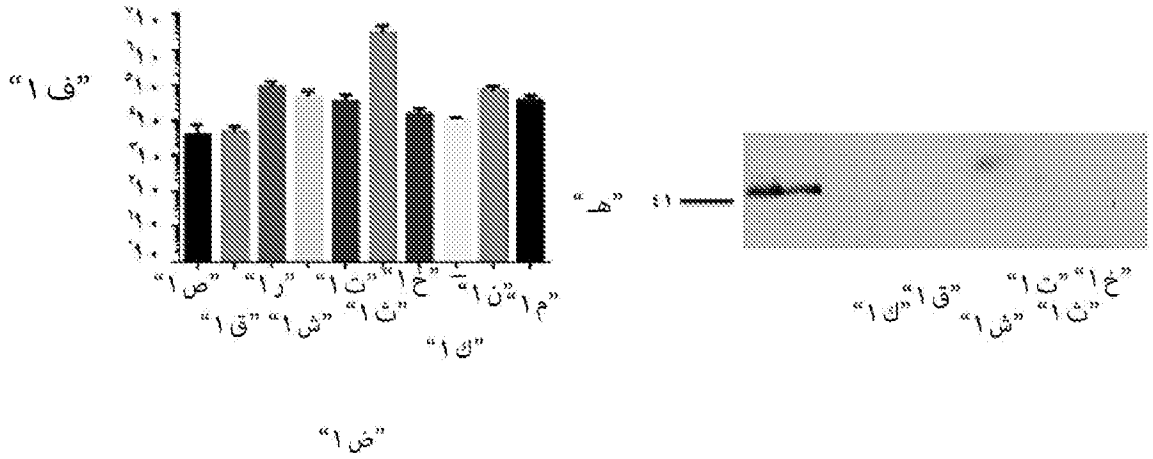
الشكل ٥ج



الشكل ١٦أ

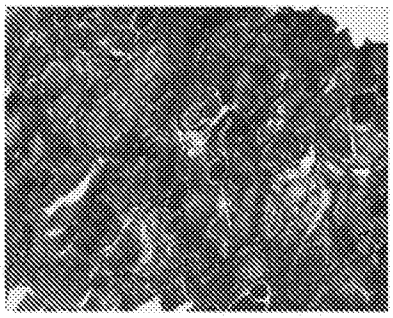


الشكل ٦ب

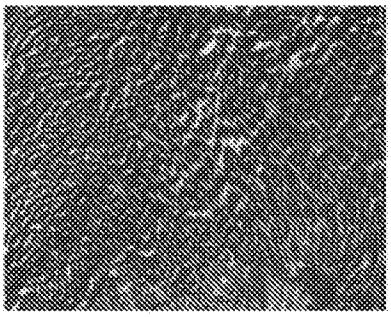


الشكل ٧ أ

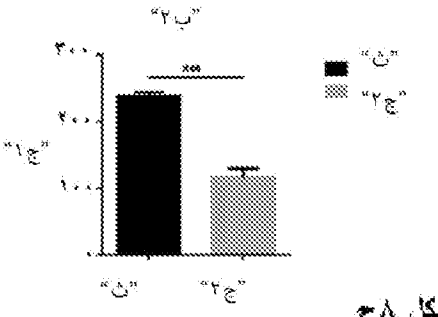
الشكل ٧ب



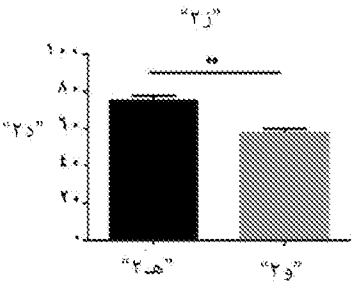
الشكل ٨أ



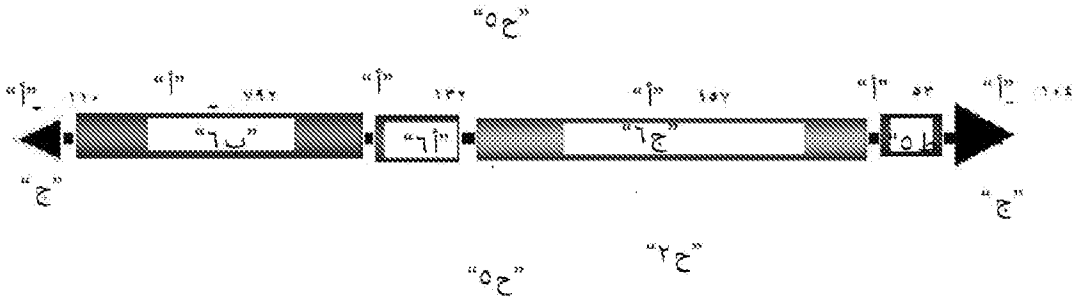
الشكل ٨ب



الشكل ٨ج

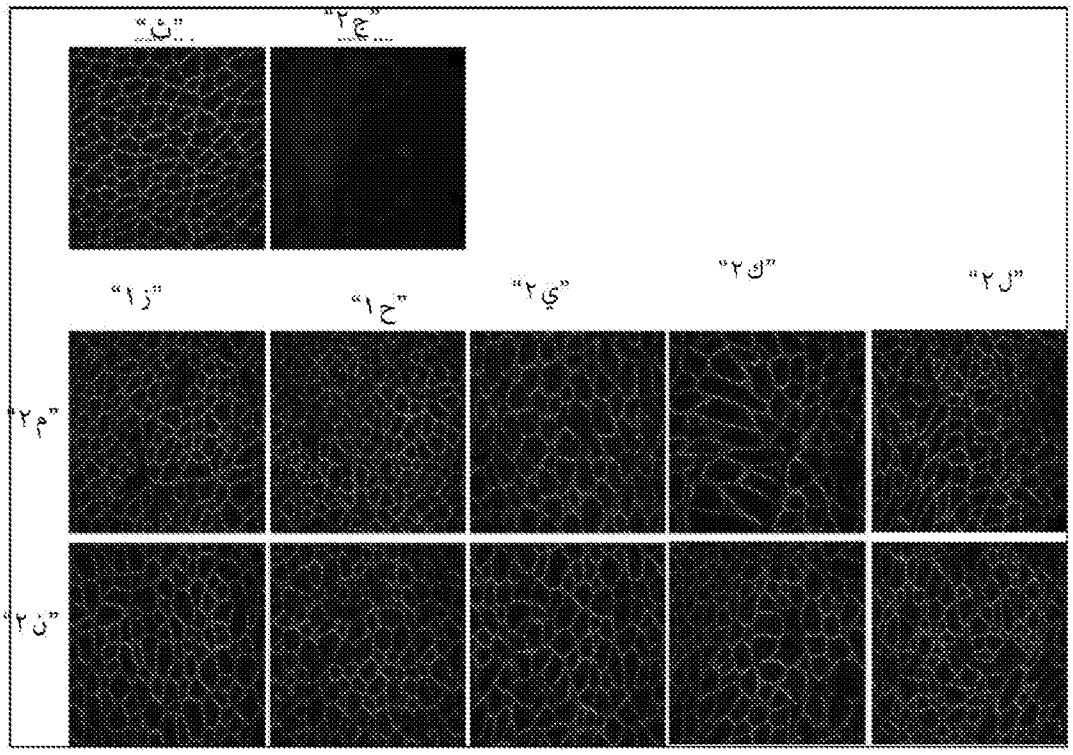


الشكل ٨د

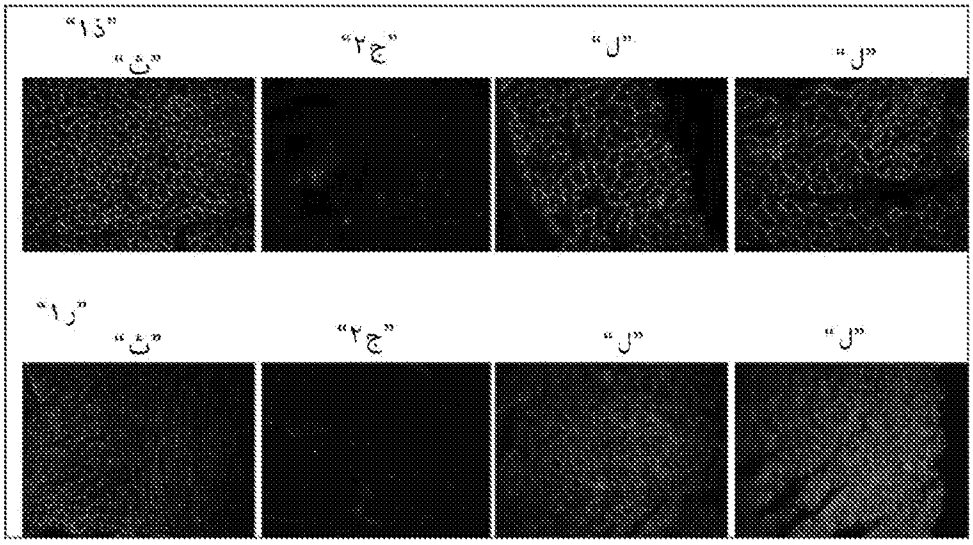


الشكل ٩

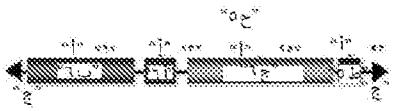
"ط٢"



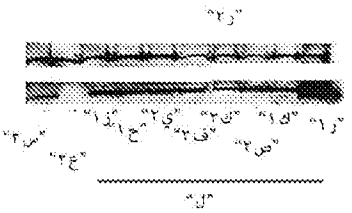
الشكل ١٠



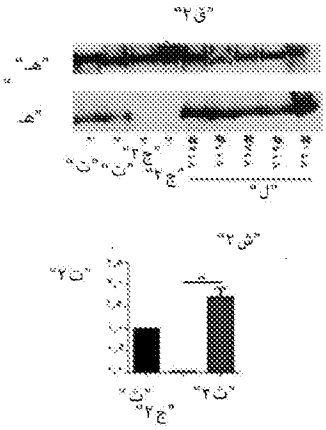
الشكل ١١



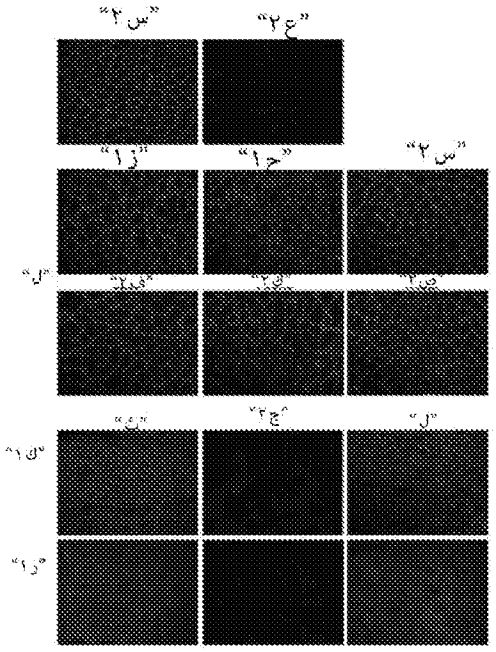
الشكل ١٢أ



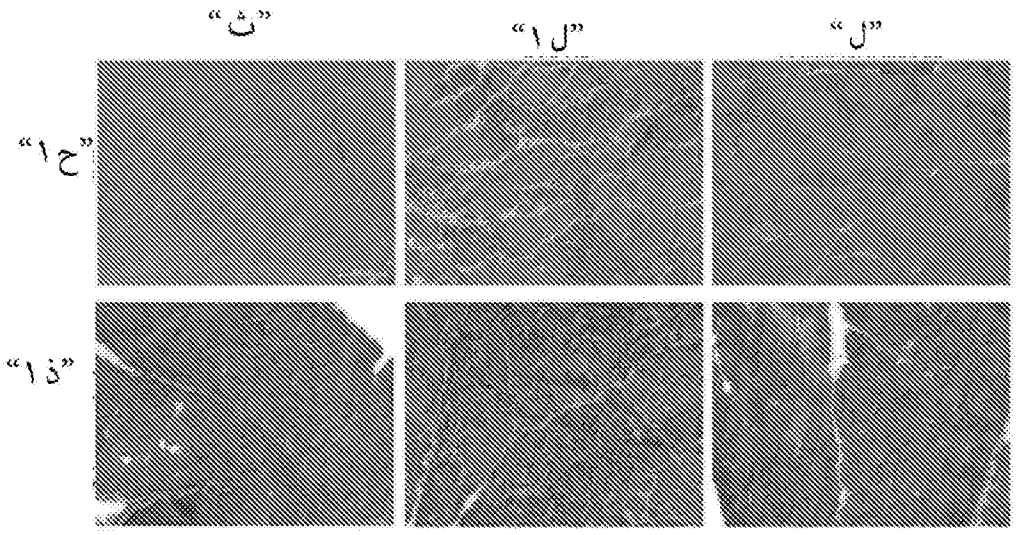
الشكل ١٢ج



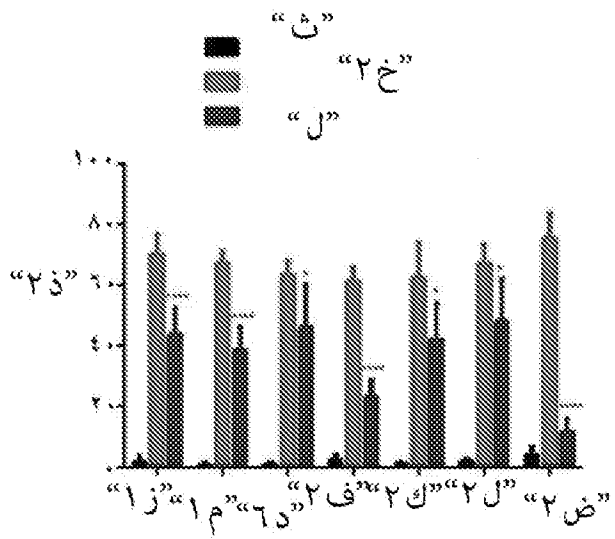
الشكل ١٢د



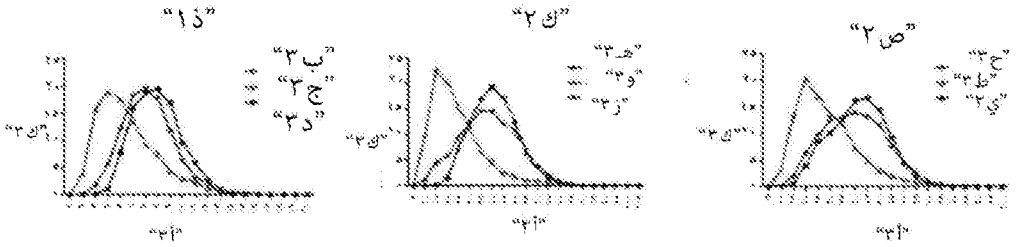
الشكل ١٢ب



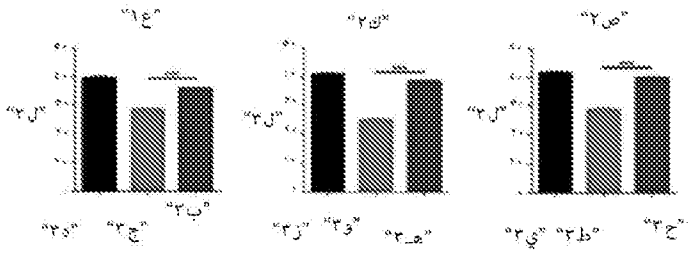
الشكل ١٣أ



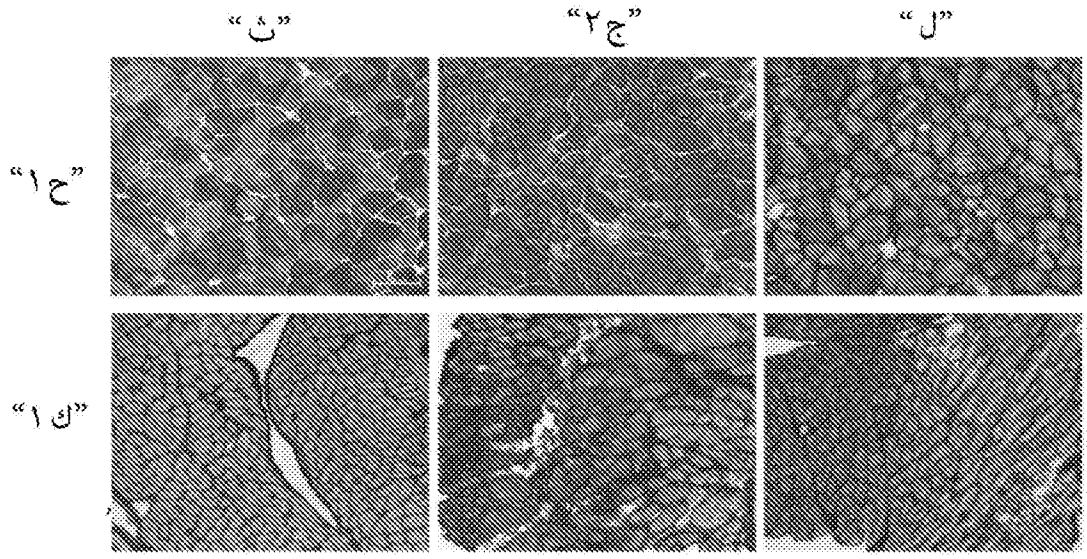
الشكل ١٣ب



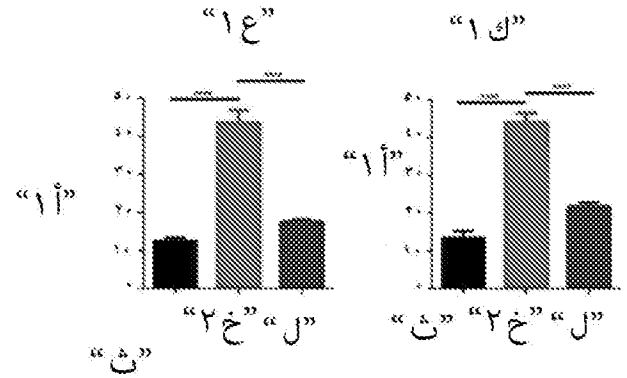
الشكل ١٣ج



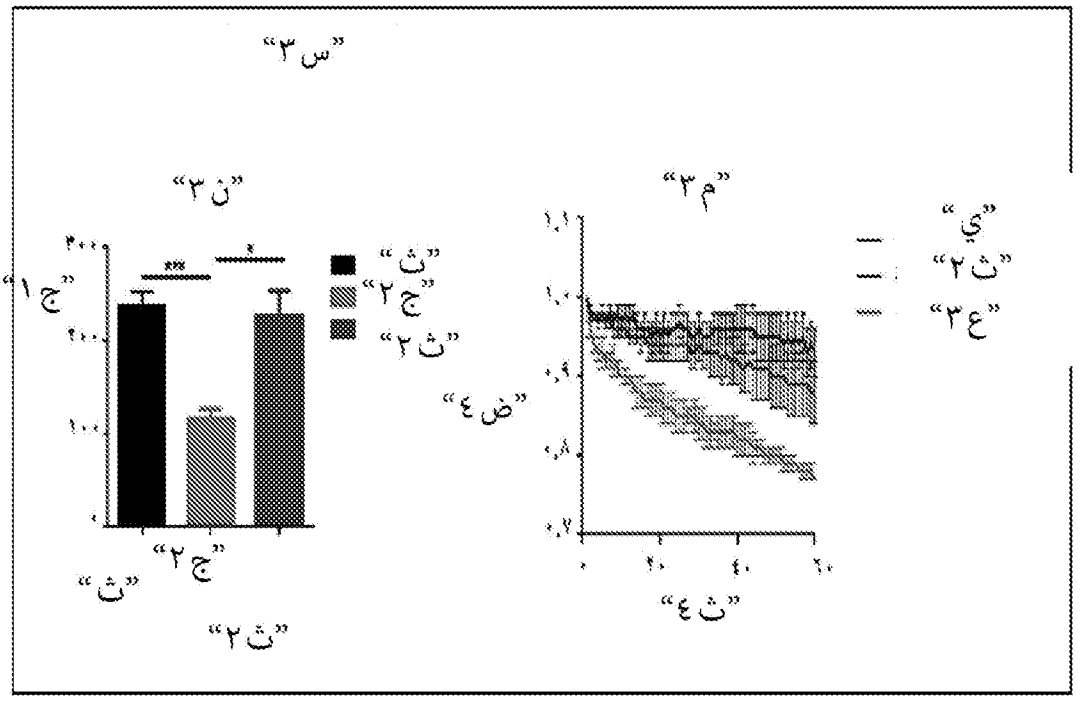
الشكل ١٣د



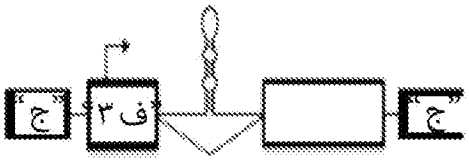
الشكل ١٤أ



الشكل ١٤ ب



الشكل ١٥

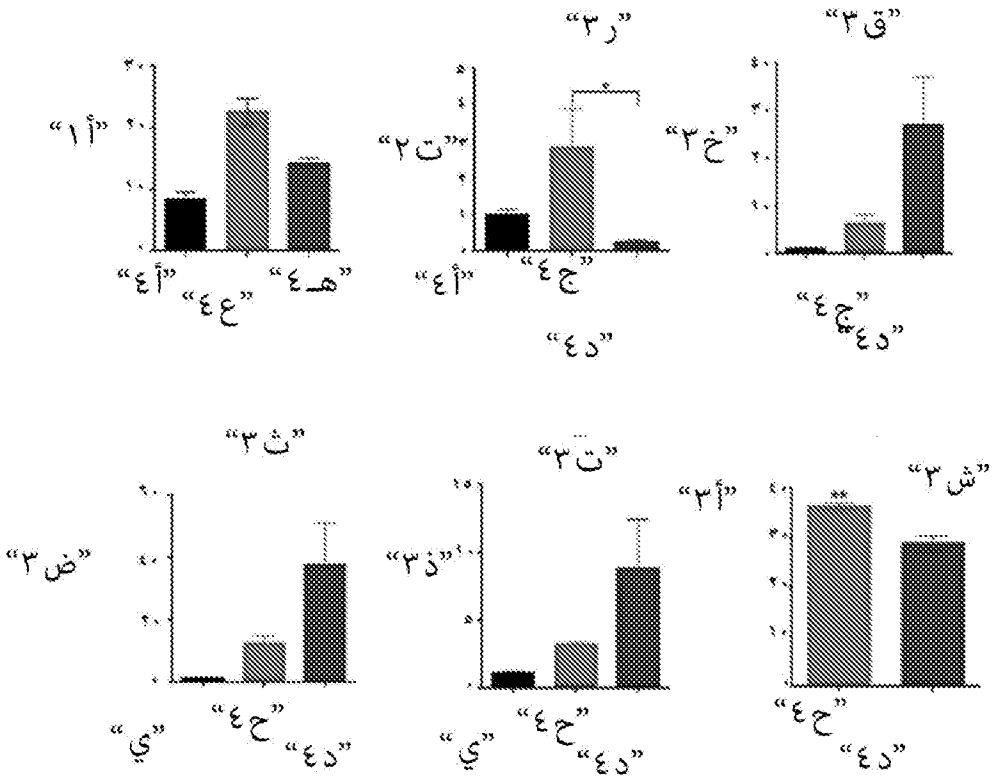


"ح٥"

"ص٣"

GGCCGGCCtgttgaatgaggcttcagtacttacagaatCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTAC
TTCTTCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAACC
GATTTCAAATGGTGCTAGAGTGAAGCCACAGATGTCTAGCACCATTTGAAATCGGTTATGCCTA
CTGCCTCGGAATTCAAGGGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTGTTTACTAAAACTGAATACCTT
GCTATCTCTTTGATACATTGGCCGGCC

الشكل ١٦

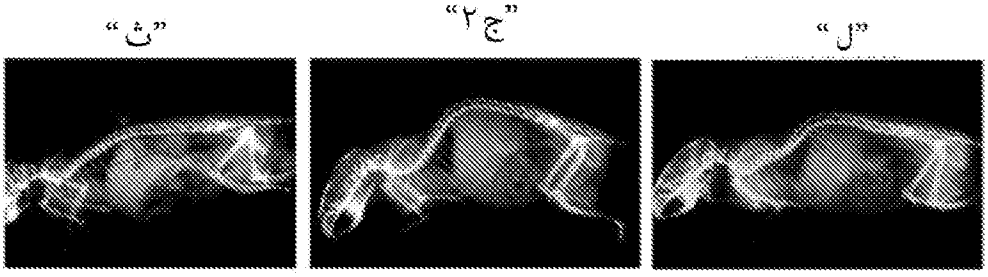

"ق٣"
"ر٣"
"أ١"
"ت٢"
"خ٣"
"هـ٤"
"ع٤"
"أ٤"
"ح٤"
"أ٤"
"د٤"
"د٤"
"ش٣"
"ت٣"
"ث٣"
"أ٣"
"ذ٣"
"ض٣"
"د٤"
"ح٤"
"ي"
"د٤"
"ح٤"
"ي"
"د٤"
"ح٤"

الشكل ١٧

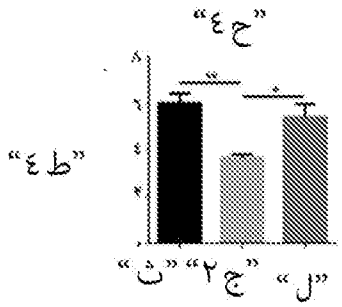
"ز٤"

"و٤"

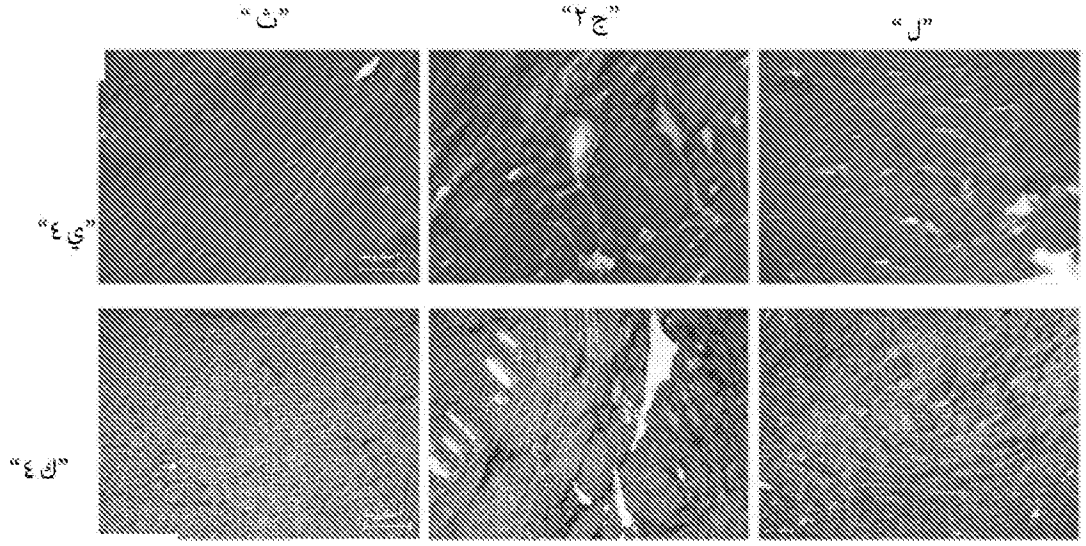
الشكل ١٨



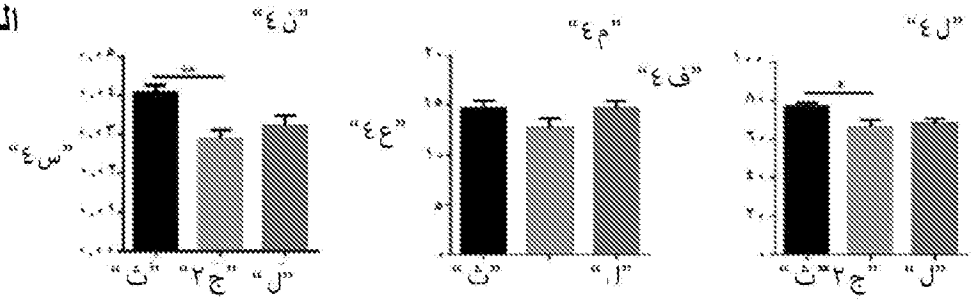
الشكل ١٩أ



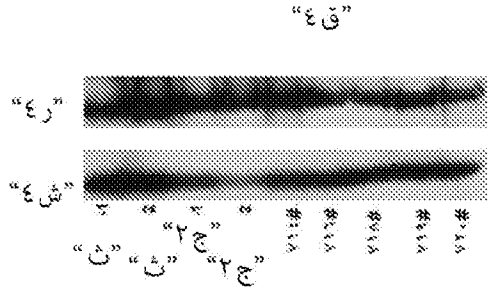
الشكل ١٩ب



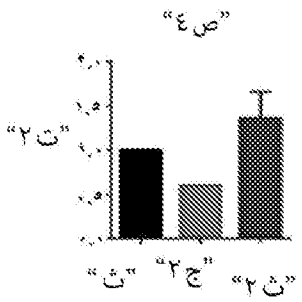
الشكل ٢٠أ



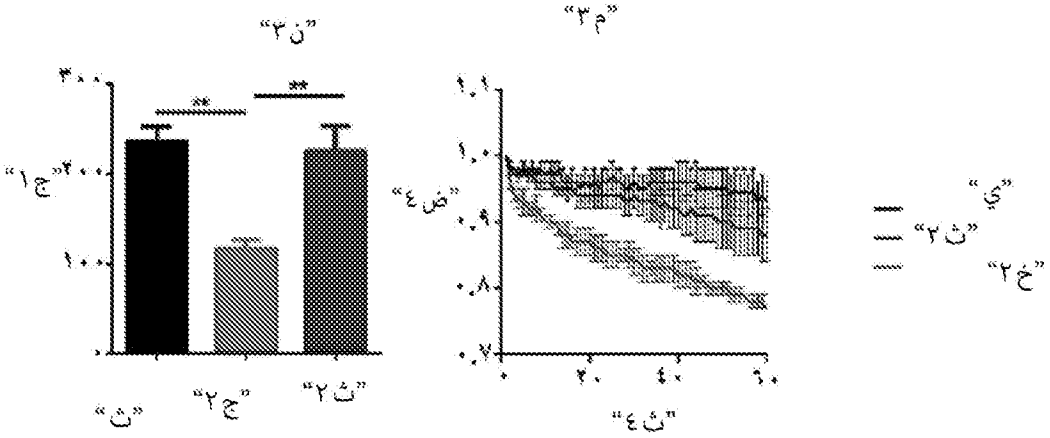
الشكل ٢٠ب



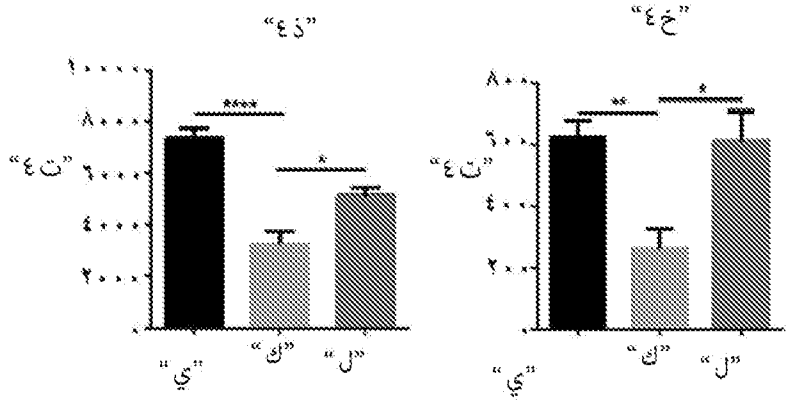
الشكل ٢٠ج



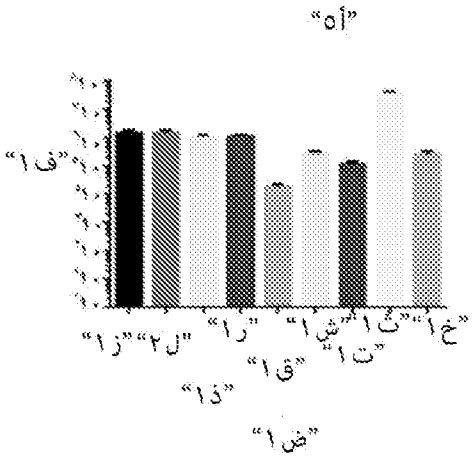
الشكل ٢٠د



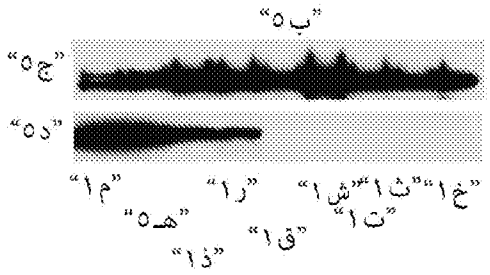
الشكل ٢١أ



الشكل ٢١ب



الشكل ٢٢أ



الشكل ب٢٢

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

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

صادرة عن

الهيئة السعودية للملكية الفكرية

ص ب ٦٥٣١ ، الرياض ١٣٣٢١ ، المملكة العربية السعودية

SAIP@SAIP.GOV.SA