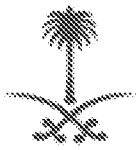
الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property



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 :

بيسيوكساس ثيرابيوتكس ليميتد
PSIOXUS THERAPEUTICS LIMITED

براءة اختراع رقم : SA 8897

بتاريخ : 1443/04/05 هـ
الموافق : 2021/11/10 م

عن الإختراع المسمى :

الفيروس الغدي الحال للورم المشفر لبروتين B7

ONCOLYTIC ADENOVIRUS ENCODING A B7 PROTEIN

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 8897 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1443/04/05 هـ
الموافق: 2021/11/10 م

[21] رقم الطلب: 517390260
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1439/02/10 هـ
الموافق: 2017/10/30 م
[30] بيانات الأسبقية:
GB 1507419.8 2015/04/30 م
GB 1516936.0 2015/09/24 م
GB 1522013.0 2015/12/14 م
[72] اسم المخترع: براين روبيرت شامبيون، أليس كلير نويل برواملي
[73] مالك البراءة: بيسيوكساس ثيرابيوتكس ليميتد
عنوانه: 4-10 ذي كوادرنت، بارتون لين، أبينجتون أكسفوردشاير أو أكس14 3واي أس، المملكة المتحدة
جنسيته: بريطانية
[74] الوكيل: مكتب المحامي/ محمد بن صالح العطيشان
[86] رقم الطلب الدولي: PCT/EP2016/059609
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2016/04/29 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2016/174200 A1
تاريخ النشر الدولي: 2016/11/03 م
[51] التصنيف الدولي(IPC®):
A61K 035/761,A61K 039/285
C07K 014/052,C07K 014/056
C07K 014/705,C07K 016/028
C12N 015/086,A61K 039/000
C12N 007/000
[56] المراجع:
US 2006292682, US 2008069836
CN 102816742, CN 101381742
US 2012283318
Concurrent delivery of GM-CSF and B7-1 using an oncolytic adenovirus elicits potent antitumor effect
Jin et al" Identification of novel insertion sites in the Ad5 genome That utilize the Ad splicing machinery for therapeutic gene expression"

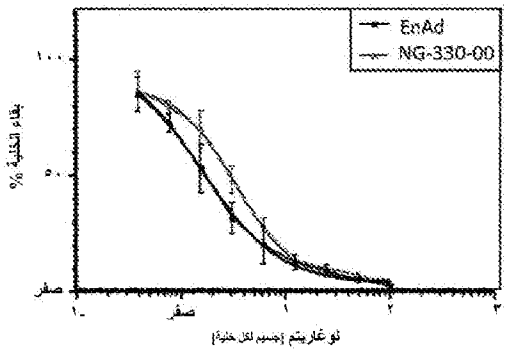
الفاحص: حصه بنت عمر البيز

[54] اسم الاختـــراع: الفيروس الغدي الحال للورم المشفر لبروتين B7

ONCOLYTIC ADENOVIRUS ENCODING A B7 PROTEIN

[57] الملخص: يوفر الكشف الحالي فيروس غدي حال للورم oncolytic adenovirus يقوم بالنســـخ بانتقائية تجاه خلايا الســـرطان، حيث يشـــتمل الفيروس الغدي على جين نـاقـل transgene تحت تحكم معزِّز promoter داخلي للفيروس، حيث يشـــتمل الجين النـاقـل على متوالية DNA تشـفِّر بروتين B7 أو شـظية نشـطة منه، وتركيبات تشتمل على ذلك، وطرق لإنتاج الفيروسات، واســتخدام الفيروســات والتركيبات في العلاج، وتحديدًا في علاج السرطان. الشكل (6)

عدد عناصر الحماية (21)، عدد الأشكال (53)



الفيروس الغدي الحال للورم المشفر لبروتين B7

ONCOLYTIC ADENOVIRUS ENCODING A B7 PROTEIN OR ACTIVE FRAGMENT

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الكشف الحالي بفيروس غدي حال للورم oncolytic adenovirus يشتمل على جين ناقل transgene يشفِّر بروتين B7 على الأقل مثل CD80 أو شظية نشطة منه، وتركيبات تشتمل على مثل ذلك واستخدام الفيروس والتركيبات في العلاج، وتحديدًا في علاج سرطان.

ما زال السرطان يمثل عبئًا اجتماعيًا على المجتمع من حيث الظروف الصعبة والمعاناة التي يتعرض لها المرضى وأحباؤهم، وأيضًا من حيث التكلفة المرتفعة للعلاج، ورعاية ودعم المرضى. يُعتقد الآن أن الجهاز المناعي للأفراد الأصحاء يقضي على الخلايا السرطانية بشكل روتيني. غير أنه في أولئك المرضى المصابين بالسرطان يتم التقليل من واحدة أو أكثر من آليات الدفاع التي تساهم في عملية القضاء على الخلايا المذكورة بشكل محكم أو إيقافها تمامًا.

من المعروف الآن أن الأورام تغير من بيئتها المجهرية لجعلها أكثر طواعية لنموها. يحدث ذلك من خلال إطلاق الورم لإشارات خارج الخلايا تعزز، على سبيل المثال، من تولد أوعية الورم و/أو تحث الكبت المناعي الموضعي أو التحمل المناعي.

يتضح من العديد من مختلفة الدراسات قبل الإكلينيكية والإكلينيكية أن البيئة المجهرية في الأورام يمكن أن تكبت تطور ونشاط الاستجابات المناعية المضادة للورم، مع توضيح احتمالية أن تلعب عدد كبير من الآليات على دورًا في ذلك. على وجه التحديد تمنع الآليات الكابتة للمناعة immuno-suppressive mechanisms في النهاية استجابات الخلية التائية من التسبب في قتل خلايا الورم. يمكن أن تتضمن الآليات الكابتة استبعاد الخلايا التائية من دخول أنسجة الورم، مما يثبط تنشيط الخلايا التائية التي تدخل بالفعل إلى الورم وتعديل بروتينات خلية الورم التي تخفض قدرة الخلايا التائية على التعرف على أو الاستجابة لها. تم تسليط الضوء على أهمية هذه

المسارات الكابتة للمناعة في دعم تقدم حالة الورم على وجه التحديد من خلال الفاعلية الإكلينيكية التي تظهرها الأجسام المضادة للمستقبلات في اثنين من هذه المسارات الكابتة، CTLA4 و-PD 1/PDL1، مما أدى إلى الموافقة على تسويقها لعلاج الورم الميلانيني melanoma وأنواع السرطان الأخرى.

B7 هو نوع من البروتينات الغشائية المحيطية peripheral membrane protein الموجودة على الخلايا التي تقدم مولد الضد المنشط antigen presenting cell (APC) الذي، عندما مزاوجته إما مع البروتين السطحي CD28 أو CD152 (CTLA-4) على الخلية التائية، يمكن أن ينتج إشارة منبهة بشكل مشترك أو إشارة مثبطة بشكل مشترك لتحسين أو خفض نشاط إشارة MHC-TCR بين الخلية التي تقدم مولد الضد (APC) والخلية التائية، على الترتيب. بجانب وجوده على APCs المنشطة، يمكن أن يوجد B7 أيضًا على الخلايا التائية نفسها.

توجد عدة خطوات لتنشيط الجهاز المناعي ضد مولد الضد. يجب أن يتفاعل مستقبل الخلية التائية أولًا مع معقد من مولد ضد الببتيد الخاص به (Ag) المرتبط ببروتين سطحي لمعقد توافق نسيجي مهم major histocompatibility complex (MHC). تتفاعل البروتينات CD4 أو CD8 على سطح الخلية التائية مع MHC للمساعدة في تثبيت تفاعل MHC/Ag مع معقد مستقبل الخلية التائية، الذي يشتمل على كل من دايمرات مولد الضد-السلسلة الرابطة (ألفا/بيتا أو جاما/دلتا) ومعقد إرسال الإشارات CD3 (يشتمل على سلاسل جاما، دلتا، إيبسيلون وزيتا). يشار إلى ذلك أيضًا باسم "الإشارة 1" وهدفها الرئيسي هو توفير إرسال إشارات أولي وضمان نوعية مولد الضد تجاه تنشيط الخلية التائية.

ومع ذلك، لا يكون ربط MHC كافيًا وحده لحث التمييز التام للخلايا التائية المؤثرة وتنشيطها. في الواقع، يمكن أن يجعل الافتقار إلى المزيد من الإشارات التحفيزية الخلية التائية واهنة. يمكن أن تأتي الإشارات المنبهة بشكل مشترك اللازمة لاستمرار الاستجابة المناعية من تفاعلات B7-CD28 و CD40L-CD40. وتوجد إشارات تنشيط أخرى تلعب دورًا في الاستجابات المناعية. على سبيل المثال، في مجموعة TNF من الجزيئات، يمكن أن يرتبط البروتين 4-1BB (CD137) على الخلية التائية بـ 4-1BBL على APC.

يوجد البروتين B7 (CD80/B7-1 و/أو CD86/B7-2) على سطح APC، ويتفاعل مع مستقبل CD28 على سطح الخلية التائية. وهذا هو أحد مصادر "الإشارة 2" (يمكن أن تسهم السيتوكينات أيضًا في تنشيط الخلية التائية، الذي يمكن الإشارة إليه باسم "الإشارة 3"). يسبب هذا التفاعل سلسلة من الإشارات البعدية التي تعزز بقاء الخلية التائية المستهدف، تنشيطها وتمييزها إلى خلية المؤثر التي يمكن أن تسبب جوانب الاستجابة المناعية، مثل قتل الخلايا المصابة بالفيروس أو خلايا الورم، وتعيين الخلايا الالتهابية.

ولبدء استجابة الخلية التائية عادة، يتم توفير إشارة منبهة وإشارة منبهة بشكل مشترك من خلال خلية التي تقدم مولد الضد لتحث كل من استجابات الخلية التائية لـ CD4 وCD8. لكن تتعرف الخلايا التائية لـ CD8 المؤثر على Ag الخاص بها المتصل بجزيئات MHC من الفئة I التي توجد على معظم الخلايا ذات النوى، التي تتضمن خلايا الورم. مع ذلك، لدى المخترعون الحاليون سبب للاعتقاد بأن الإشارات المستخدمة لتنشيط الخلايا التائية لا يلزم أن تأتي من نفس الخلية أو نوع الخلية. بالتالي يمكن أن يكون من المفيد توفير واحدة أو أكثر من هذه الإشارات (أي إشارة منبهة و/أو إشارة منبهة بشكل مشترك) إلى الجهاز المناعي، على سبيل المثال على سطح خلية سرطانية.

وينصب الاهتمام حاليًا على تثبيط نشاط PD-1 (بروتين موت الخلية المبرمج 1) و/أو مركبه الترابطي PDL1 (المعروف أيضًا باسم B7-H1) لأنه يعتقد أن هذا المسار يلعب دورًا هامًا في الخفض المحكم للاستجابات المناعية، على سبيل المثال في أنواع السرطان.

مع ذلك، يقترح ما تم القيام به سابقًا أن CD80 (B7-1) لا يعمل فقط كمحفز مشترك للخلية التائية من خلال الارتباط بـ CD28 على الخلية التائية، يمكن أن يرتبط أيضًا بـ PDL1، على سبيل المثال عند التعبير عنه في نفس غشاء الخلية، ويعيق نشاط تفاعلات إرسال الإشارات التثبيطية لـ PDL1-PD1. بالتالي، من خلال العمل بطريقتين مختلفتين، يمكن أن يكون CD80 جزيء قابل للحياة ويحتمل أن يكون أكثر فائدة في استعادة أو تحسين تنشيط الخلايا التائية البشرية. تبدو الصور القابلة للذوبان من CD80 أيضًا قادرة على عكس تثبيط الخلية التائية الذي يسببه PDL1-PD1، انظر على سبيل المثال Haile et al Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1-

Mediated Immune Suppression J Immunol 2013; 191:2829-2836. تم إنتاج بروتين دمج CD80-Fc واختباره للكشف عن سلامته وفاعليته، انظر Journal of Immunology, 2014, 193: 3835-3841.

يرى المخترعون الحاليون أن بروتينات B7 أو شظية نشطة منها والتي يتم توصيلها والتعبير عنها من خلال فيروس حال للورم، على سبيل المثال على سطح خلية سرطانية، يمكن أن تكون مفيدة في تنشيط الجهاز المناعي للمريض لمكافحة السرطان.

علاوة على ذلك، تتسم البروتينات B7، مثل CD80، إن تم ببساطة إعطاؤها جهازيًا بالقدرة على حث استجابات مناعية جهازيًا بطريقة غير مرغوب فيها. يرى المخترعون الحاليون أنه يلزم طريقة توصيل أكثر تطورًا لهذه البروتينات من أجل توفير مدخل علاجي مناسب حيث يتم تحقيق التأثيرات العلاجية المفيدة ويتم الحد من التأثيرات غير المرغوب فيها للحد الأدنى.

يتعلق Choi et al, Gene Therapy 13, 1010-1020 (2006) بالتوصيل المتزامن لـ GM-CSF و B7-1 باستخدام الفيروس الغدي الحال للورم لاستثارة تأثير فعال مضاد للورم.

تتعلق البراءة الصينية 102816742 بالفيروسات الغدية الخيمرية لاستخدامها في علاج السرطان.

تتعلق البراءة الصينية 101381742 بالمعزز المتأخر الذي يستهدف تنظيم ناقل الفيروس الغدي الحال للورم pCN305.

الوصف العام للاختراع

بالتالي يتم توفير فيروس غدي حال للورم بانتقائية تجاه الخلايا السرطانية، حيث يشتمل الفيروس الغدي على جين ناقل تحت تحكم معزز داخلي للفيروس، حيث يشتمل الجين الناقل على متوالية DNA تشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه. يكون ذلك مفيدًا لأن الفيروسات الحالة للورم وفقًا للكشف الحالي على نحو مفضل تصيب الخلايا السرطانية بالعدوى وبالتالي تخترق البيئة المجهرية التي يخلقها السرطان. بمجرد أن يمكن في الخلايا السرطانية التعبير عن البروتينات B7 المشفَّرة بمساعدة الفيروس، على سبيل المثال على سطح الخلية (أي سطح خلية سرطانية). يكون ذلك مفيدًا لأن البروتين B7 يكون عندئذٍ في مكان مرغوب فيه حيث يمكن أن يكون نشط حيويًا.

في أحد التجسيدات يشتمل البروتين B7 المشفَّر على متوالية قادرة على تثبيت البروتين على سطح إحدى الخلايا، على سبيل المثال متوالية نطاق عابر للأغشية، جزيء تثبيت GPI أو ما شابه.

بالتالي في أحد تجسيدات تتم إصابة الخلية السرطانية بالعدوى بمساعدة فيروس وفقًا للكشف الحالي يعبر عن بروتين B7 أو جزيء، على وجه التحديد على سطح خلية سرطانية، حيث يكون البروتين B7 مناسبًا لتوفير الإشارة المنبهة بشكل مشترك على الأقل أي الإشارة 2 لتنشيط خلية تائية، و/أو يمكن أن يرتبط بـ ويثبط نشاط PD-L1 الذي يتم التعبير عنه على سطح الخلية السرطانية أو خلايا أخرى في بيئة مجهرية موضعية.

في أحد التجسيدات تشتمل متوالية B7 على عنصر عابر للأغشية من البروتين B7، على سبيل المثال عنصر عابر للأغشية خاص ببروتين B7 أو نطاق عابر للأغشية معين من بروتين B7 "مختلف" خاص بتلك التي يتم التعبير عنها على وجه التحديد.

تكون البروتينات B7 عبارة عن بروتينات يتم التعبير عنها على سطح الخلية ويمكن استخدامها أيضًا لحمل بروتينات إضافية إلى سطح الخلية السرطانية، على سبيل المثال حيث يتم ربط النطاق العابر للأغشية على الأقل من البروتين B7 ببروتين إضافي.

بالتالي في أحد الجوانب يتم توفير فيروس غدي حال للورم يقوم بالنسخ بانتقائية تجاه الخلايا السرطانية، حيث يشتمل الفيروس الغدي على جين ناقل تحت تحكم معزز داخلي للفيروس، حيث يشتمل الجين الناقل على متوالية DNA تشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه.

يتم أيضًا توفير فيروس حال للورم يقوم بالنسخ وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يتم اختيار البروتين B7 أو شظية نشطة منه على حدة من مجموعة تشتمل على B7-1، B7-2، B7-DC، B7-H1، B7-H2، B7-H3، B7-H4، B7-H5 وB7-H6، على وجه التحديد حيث يكون البروتين B7 عبارة عن B7-1 (CD80) أو شظية نشطة منه.

في أحد التجسيدات يكون الفيروس الحال للورم الذي يقوم بالنسخ عبارة عن فيروس غدي من المجموعة "ب".

في أحد تجسيدات يكون الفيروس الحال للورم الذي يقوم بالنسخ عبارة عن فيروس خيمري.

في أحد التجسيدات يكون للفيروس الحال للورم الذي يقوم بالنسخ سلسلة رئيسية عبارة عن enadenotucirev (يشار إليه أيضًا باسم EnAd).

في أحد التجسيدات يكون للفيروس الحال للورم الذي يقوم بالنسخ صيغة (I):

ITR-B1-BA-B2-BX-BB-BY-B3-3'ITR'5

(I)

يشتمل B_1 على: E1A، E1B أو E1A-E1B؛

يكونB_A عبارة عن E2B-L1-L2-L3-E2A-L4؛

يكون B_2 عبارة عن رابطة أو يشتمل على E3 أو جين ناقل، على سبيل المثال في وجود معزز داخلي المنشأ أو خارجي المنشأ؛

يكون B_X عبارة عن رابطة أو متوالية DNA تشتمل على: موقع تقييد، واحد أو أكثر الجينات الناقلة أو كلاهما؛

يشتمل B_B على L5؛

يشتمل B_Y على جين ناقل يشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه؛ و

يكون B_3 عبارة عن رابطة أو يشتمل على E4.

في أحد التجسيدات الفيروس الحال للورم الذي يقوم بالنسخ وفقًا لأي من عناصر الحماية 1 إلى 7، حيث يشتمل البروتين B7 أو شظية نشطة منه على متوالية عابرة للأغشية، على سبيل المثال نطاق عابر للأغشية من مستقبل PDGF، أو جزيء تثبيت GPI مناسب لتثبيت البروتين أو الشظية في غشاء الخلية.

في أحد التجسيدات يشتمل الفيروس الحال للورم الذي يقوم بالنسخ كذلك على جين ناقل ثاني، على سبيل المثال يشفِّر بولي ببتيد مختار من مجموعة تشتمل على سيتوكين، كيموكين، جزيء جسم مضاد مناهض أو شظية منه، وجزيء جسم مضاد مساعد أو شظية منه.

في أحد التجسيدات يشفِّر الجين الناقل الثاني والثالث، على سبيل المثال بولي ببتيدين مختلفين مختارين من مجموعة تشتمل على سيتوكين، كيموكين، الجسم المضاد، مثل جزيء جسم مضاد مناهض أو شظية منه، أو جزيء جسم مضاد مساعد أو شظية منه.

في أحد التجسيدات يشفِّر الجين الناقل الثاني أو الثالث سيتوكين، مختار من مجموعة تشتمل على IL-2، IFN-ألفا، IFN-بيتا، IFN-جاما، المركب الترابطي Flt3، GM-CSF، IL-15، و-IL 12.

في أحد التجسيدات يشفِّر الجين الناقل الثاني أو الثالث كيموكين، مختار من مجموعة تشتمل على MIP1α، IL-8، CCL5، CCL17، CCL20، CCL22، CXCL9، CXCL10، CXCL11، CXCL13، CXCL12، CCL2، CCL19 و CCL21.

في أحد التجسيدات يتم تشفير توليفة سيتوكين وكيموكين بمساعدة الفيروس المختار من مجموعة تشتمل على المركب الترابطي MIP1α و Flt3، و MIP1α و IFNα.

في أحد التجسيدات يشفِّر الفيروس جزيء جسم مضاد أو شظية منه على سبيل المثال يشتمل على متوالية عابرة للأغشية أو جزيء تثبيت GPI بحيث يكون عبارة عن صورة مثبتة بغشاء الخلية أو نطاق عابر للأغشية، على سبيل المثال من مستقبل PDGF.

في أحد التجسيدات يشتمل جزيء الجسم المضاد أو شظية ربط منه على نطاق ربط مولد ضد جسم مضاد لـ CD3 البشري.

في أحد التجسيدات يكون جزيء الجسم المضاد عبارة عن مثبط، على سبيل المثال مختار من مجموعة تشتمل على مثبط لأحد عوامل توليد الأوعية، مثل جزيء جسم مضاد لـ VEGF، ومثبط لعوامل تعطيل نشاط الخلية التائية، مثل جزيء جسم مضاد لـ CTLA-4.

في أحد التجسيدات يكون جزيء الجسم المضاد عبارة عن جزيء مساعد، على سبيل المثال على واحد أو أكثر مختار من مجموعة تشتمل على CD40، GITR، OX40، CD27 و BB1-4.

في أحد التجسيدات يكون البروتين أو البروتينات خارجية المنشأ المشفَّرة بمساعدة الفيروس عبارة عن صورة مناسبة للتعبير عنها على سطح الخلية السرطانية.

شرح مختصر للرسومات

يوضح الشكل 1 بعض الجزيئات الأساسية المشتركة في تعرف الخلية التائية على الخلايا أو خلايا الورم التي تقدم مولد الضد، وكذلك بعض حالات إرسال الإشارات المستحثة في الخلية التائية المستجيبة. كما يتم توضيح بنية PDL1 والتفاعل مع نطاق IgV لـ PD1.

يوضح الشكل 2 بعض المركبات الترابطية للمجموعة B7 وشركاء الارتباط من مجموعة CD28 من المستقبلات

يوضح الشكل 3 رسوم تخطيطية لمجموعات الجين الناقل للفيروسات التي تعبر عن CD80 البشري (الشكل 3أ)، التي تعبر بشكل مشترك عن IFN البشري و CD80 البشري (الشكل 3ب)، التي تعبر بشكل مشترك عن OKT3 scFv و CD80 البشري (الشكل 3ج)، التي تعبر بشكل مشترك عن Flt3L البشري، MIP1 البشري و IFN البشري (الشكل 3د)، التي تعبر بشكل مشترك عن Flt3L البشري، MIP1 البشري و CD80 البشري (الشكل 3هـ)، التي تعبر بشكل مشترك عن IFNα البشري، MIP1 البشري و CD80 البشري (الشكل 3و)، ورسم تخطيطي لإطار قراءة مفتوح (ORF) أو OKT3 scFv (الشكل 3ز)

يوضح الشكل 4 استنساخ EnAd (ColoAd1) و CD80 البشري الذي يشفِّر الفيروس NG-330 في خلايا الورم HT-29 (الشكل 4أ) و A549 (الشكل 4ب)

يوضح الشكل 5 التعبير عن CD80 في غشاء خلايا الورم A549 (الشكل 5أ) أو HT-29 (الشكل 5ب) من خلال التلطيخ المناعي الفلوري عند أزمنة مختلفة بعد الإصابة بعدوى NG-330. لم يلحظ تعبير عن CD80 على غشاء الخلية مع EnAd أو خلايا الورم غير المصابة بالعدوى (UIC)

يوضح الشكل 6 قوى حل الورم القابلة للمقارنة لـ EnAd و NG-330 في الاختبار السام للخلايا HT-29. بالتالي يحتفظ NG-330 بالسمات الحالة للورم الخاصة به أثناء أيضًا حمل جين ناقل

يوضح الشكل 7 قوة حالة للورم قابلة للمقارنة لـ EnAd و IFN + CD80 التي تعبر عن الفيروس NG-343 (الشكل 7أ) وإفراز IFNα من خلال NG-343 المصاب بعدوى خلايا الورم HT-29 و A549 على مدار فترة تصل حتى 72 ساعة

يوضح الشكل 8 التعبير عن CD80 وقتل خلية الورم بعد 48 أو 72 ساعة من الإصابة بالعدوى من خلال تحليل FACS باستخدام التلطيخ المناعي بجسم مضاد لـ CD8 جنبًا إلى جنب مع لطخة للكشف عن قابلية حياة الخلية. يمكن الكشف عن CD80 عند سطح خلية كل من الخلايا الحية والميتة المعالجة بـ NG-343 لكن ليس خلايا الورم A549 بـ EnAd أو مجموعة المقارنة غير المصابة بالعدوى ((uninfected tumour cells (UIC)) (الشكل 8أ-د). تمت ملاحظة تعبير مشابه عن CD80 مع كل من خلايا الورم A549 و HT-29 (الشكل 8هـ).

يوضح الشكل 9 استنساخ الفيروس القابل للمقارنة مع كل من EnAd و NG-343 في الورم (HT-29) وغير خلايا الورم (MRC5، WI38 والخلايا الظهارية المتشعبة)، مع إظهار الأخيرة لمستويات أقل بكثير من الاستنساخ (الشكل 9أ)، إفراز IFNα (الشكل 9ب) والتعبير عن CD80 (الشكل 9ج) بعد الإصابة بعدوى NG-343 التي تم الكشف عنها فقط في خلايا الورم HT-29.

يوضح الشكل 10 أن خلايا الورم A549 المصابة بعدوى NG-343 يمكن أن تحث زيادة المستويات على السطح من كل من CD80 و PD-L1 على سطح DCs في المزارع المشتركة لـ PBMC عند مقارنتها بمزرعة خلايا الورم المصابة بعدوى أو غير المصابة بعدوى EnAd.

يوضح الشكل 11 التعبير عن IFN و CD80 من خلال خلايا الورم HT-29 (الشكل 11أ وج) و A549 (الشكل 11ب وج) المصابة بعدوى الفيروس NG-347

يوضح الشكل 12 التعبير عن MIP1α (الشكل 12أ)، IFNα (الشكل 12ب) و Flt3L (الشكل 12ج) من خلال خلايا الورم A549 المصابة بعدوى الفيروس NG-345

يوضح الشكل 13 قوة حل للورم قابلة للمقارنة (الأشكال 13أ وب) وقابلية الإصابة بعدوى (الشكل 13ج) الفيروسات EnAd، NG-347 و NG-348 في اختبار سمية الخلايا HT-29

يوضح الشكل 14 التعبير المرتفع عن CD80 من خلال البقاء 48 ساعة على سطح خلايا الورم A549 المصابة بعدوى إما الفيروسات NG-347 أو NG-348 لكن القليل أو لا تعبير عن CD80 بعد الإصابة بعدوى EnAd

يوضح الشكل 15 التعبير المرتفع عن CD80 من خلال البقاء 48 ساعة على سطح خلايا الورم DLD-1 المصابة بعدوى إما الفيروسات NG-347 أو NG-348 لكن القليل أو لا تعبير عن CD80 بعد الإصابة بعدوى EnAd

يوضح الشكل 16 التعبير عن CD80 على الخلايا A549 +EpCam المصابة بعدوى NG-348 والمزروعة بشكل مشترك مع الخلايا T +CD3 البشرية، لكن ليس عندما كانت العدوى بـ EnAd

يوضح الشكل 17 أنه تتم زيادة CD25 بشكل مقنن على الخلايا T +CD3 البشرية بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، لكن ليس عندما كانت العدوى بـ EnAd (الشكل 17أ)، مع زيادة النسبة المئوية لكل من الخلايا CD25+ (الشكل 17ب) ومستوى التعبير عن CD25 لكل الخلية (الشكل 17ج).

يوضح الشكل 18 أنه تتم زيادة CD25 بشكل مقنن على كل من المجموعات الفرعية من الخلايا CD4+ وCD4- (بشكل أساسي CD8) T +CD3 البشرية بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، لكن ليس عندما كانت العدوى بـ EnAd.

يوضح الشكل 19 المستوى المنخفض للتعبير عن HLA-DR على الخلايا T +CD3 البشرية بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348 أو EnAd

يوضح الشكل 20 حث التعبير عن CD107a على سطح الخلايا T +CD3 الحية بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، لكن ليس عندما كانت العدوى بـ EnAd.

يوضح الشكل 21 حث التعبير عن CD107a على سطح كل من المجموعات الفرعية من الخلايا CD4+ و CD3+ CD4- بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، لكن ليس عندما كانت العدوى بـ EnAd.

يوضح الشكل 22 حث إنتاج IL-2 (الشكل 22أ) و IFN (الشكل 22ب) من خلال الخلايا T +CD3 بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، لكن ليس IL-2 ومستويات منخفضة فقط من IFN عندما كانت العدوى بـ EnAd.

الشكل 23 يوضح حث IFN إنتاج من خلال كل من CD4+ و CD8+ (الشكل 22ب) الخلايا T +CD3 بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، لكن ليس IFN (الخلايا CD4+) أو IFN منخفض (الخلايا CD8+) عندما كانت العدوى بـ EnAd.

يوضح الشكل 24 أنه تتم زيادة CD69 بشكل مقنن على المزيد من الخلايا T +CD3 البشرية بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-347 مما عندما كانت العدوى بـ EnAd

يوضح الشكل 25 حث إنتاج IFN من خلال الخلايا T +CD3 البشرية بعد الزراعة المشتركة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-347، لكن ليس عندما كانت العدوى بـ EnAd

يوضح الشكل 26 رسوم تخطيطية لمجموعات الجينات الناقلة NG-348A، NG-420 و NG-420A

يوضح الشكل 27 استنساخ الجينوم والتعبير عن جين الهكسون (مستويات mRNA) لـ EnAd، NG-347، و NG-348 في خلايا الأرومة الليفية MRC-5 مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 28 التعبير عن mRNA لجين ناقل لـ CD80 وجسم مضاد لـ CD3-scFv وبروتين جين ناقل لـ CD80 (مقياس تدفق الخلايا) للفيروس NG-348 في خلايا الأرومة الليفية MRC-5 مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 29 mRNA لجين ناقل لـ CD80 وبروتين جين ناقل لـ CD80 للفيروس NG-347 في خلايا الأرومة الليفية MRC-5 مقارنة بخلايا الورم A549.

يوضح الشكل 30 مستويات mRNA ومستويات البروتين المفرزة من MIP1α وIFNα المنتج بمساعدة الفيروس NG-347 في خلايا الأرومة الليفية MRC-5 مقارنة بخلايا الورم A549.

يوضح الشكل 31 استنساخ الجينوم والتعبير عن جين الهكسون (مستويات mRNA) لـ EnAd، NG-347، وNG-348 في مزراع الخلايا التائية البشرية المنقاة.

يوضح الشكل 32 mRNA لجين ناقل لـ CD80 وجسم مضاد لـ CD3 scFv والتعبير عن البروتين (مقياس تدفق الخلايا) للفيروس NG-348 في الخلايا التائية البشرية مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 33 mRNA لجين ناقل لـ CD80 وبروتين جين ناقل لـ CD80 للفيروس NG-347 في الخلايا التائية البشرية المنقاة مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 34 mRNA لجين ناقل لـ IFNα وMIP1α المنتج بمساعدة الفيروس NG-347 في الخلايا التائية مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 35 استنساخ الجينوم NG-347 وNG-348 والتعبير عن جين الهكسون من خلال الخلايا PBMCs البشرية مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 36 mRNA لـ CD80 وجسم مضاد لـ CD3 scFv المنتج بمساعدة الفيروس NG-348 من خلال PBMCs مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 37 mRNA لـ CD80، IFNα وMIP1α المنتج بمساعدة الفيروس NG-347 من خلال PBMCs مقارنة بخلايا الورم A549

يوضح الشكل 38 تنشيط مشابه للخلايا المتغصنة البشرية بمساعدة جسيمات الفيروسات EnAd، NG-347 وNG-348، مثلما قيس من خلال الخفض المقنن للتعبير عن CD14 والزيادة المقننة لـ CD80 على سطح الخلية

يوضح الشكل 39 إفراز مشابه للبروتين MIP1α وIFNα بمساعدة جسيمات من PBMCs مزروعة مع NG-348 (أ) أو NG-347 (ب) مقارنة بـ EnAd.

يوضح الشكل 40 استنساخ الجينوم NG-347 أو NG-348 في مزارع مشتركة أو الخلايا التائية أو PBMCs مع خلايا الأرومة الليفية MRC-5 مقارنة بمزارع مشتركة مع خلايا الورم A549

يوضح الشكل 41 INF المفرز من خلال PBMCs أو الخلايا التائية المزروعة بشكل مشترك مع خلايا الأرومة الليفية MRC-5 مقارنة بخلايا الورم A549، والمعالج بالفيروس EnAd أو NG-348.

يوضح الشكل 42 MIP1α وIFNα المفرز من خلال الخلايا المتغصنة البشرية المعالجة بجسيمات الفيروسات EnAd، NG-347 أو NG-348

يوضح الشكل 43 تنشيط الجين المرشد NFκB وIFN في الخلايا التائية المرشدة JurkatDual المزروعة بشكل مشترك مع خلايا الورم A549 المصابة بعدوى EnAd، NG-347 أو NG-348

يوضح الشكل 44 نشاط الجين المرشد NF-B-لوسيفيراز المنتج من خلال الخلايا التائية المرشدة JurkatDual المزروعة بشكل مشترك مع EnAd، NG-347، NG-348 أو NG-420 treated A549 HCT-116، DLD وHT29 خلايا الورم

الشكل 45 يوضح نشاط الجين المرشد NF-B-لوسيفيراز المنتج من خلال الخلايا JurkatDual المزروعة بشكل مشترك مع إما خلايا الورم A549 أو HT29 المصابة بعدوى الفيروس NG-348 والفيروس NG-420 كدالة لجسيمات الفيروس المضافة

يوضح الشكل 46 الحركيات الدوائية للفيروس EnAd وNG-348 في الدم؛ مستويات السيتوكين بالدم بعد التعرض إلى الفيروس EnAd أو NG-348؛ التوزيع الحيوي النسيجي للفيروسات EnAd أو NG-348 بعد 6 أو 24 ساعة من الإعطاء داخل الوريد إلى الفئران CD1

يوضح الشكل 47 الحركيات الدوائية في الدم للفيروسات EnAd، NG-347 وNG-348 بعد الإعطاء داخل الوريد إلى الفئران CB17-SCID الحاملة لطعم خيفي من الورم HCT-116 تحت الجلد.

يوضح الشكل 48 التوزيع النسيجي للفيروسات EnAd، NG-347 وNG-348 بعد 6 ساعات من إعطاء جرعة داخل الوريد في الفئران CB17-SCID الحاملة للورم، وجينومات الفيروس في الطعوم الخيفية للورم HCT-116 عند اليوم 7 واليوم 14-21 بعد إعطاء جرعات داخل الوريد أو بعد إعطاء جرعات داخل الورم من EnAd، NG-347 وNG-348

يوضح الشكل 49 mRNA لهكسون فيروس المنتج في الطعوم الخيفية للورم HCT-116 بمساعدة الفيروسات EnAd، NG-347 أو NG-348 باليوم 7 أو 14-21 بعد إعطاء جرعات داخل الوريد أو بعد إعطاء جرعات داخل الورم

يوضح الشكل 50 مستويات mRNA لجين ناقل لهكسون وCD80 في الطعوم الخيفية للورم HCT-116 بعد 7 أو 21 يوم من إعطاء جرعة داخل الوريد من الفيروس NG-348

يوضح الشكل 51 مستويات mRNA لجينات ناقلة تشفِّر جسم مضاد لـ CD3 scFv وCD80 في الطعوم الخيفية للورم HCT-116 بعد 7 أو 14-21 يوم من إعطاء جرعة داخل الوريد من الفيروس NG-348

يوضح الشكل 52 مستويات mRNA للجينات الناقلة MIP1α وIFNα في الطعوم الخيفية للورم HCT-116 بعد 7 أو 14-21 يوم من إعطاء جرعة داخل الوريد من الفيروس NG-347

يوضح الشكل 53 CD80 التعبير عن البروتين في الطعوم الخيفية للورم HCT-116 بعد 7 و21 يوم من جرعة داخل الوريد من الفيروس NG-348؛ ويوضح التعبير عن البروتين MIP1α وCD80 في الأورام HCT-116 بعد جرعة داخل الوريد من الفيروس NG-347.

ملخص قائمة المتواليات

المتوالية رقم: 1 توضّح من خلال متوالية DNA التي تناظر وتتضمن زوج القاعدة 29345-29379 من جينوم EnAd.

المتوالية رقم: 2 نطاق PDGF TM

المتوالية رقم: 3 متوالية مستقبل الجدل

المتوالية رقم: 4 متوالية مستقبل الجدل

المتوالية رقم: 5 متوالية المعالجة ببولي أدينيل (متوالية بولي A الأخيرة SV40)

المتوالية رقم: 6 متوالية دخول الريبوزوم الداخلية (IRES)

المتوالية رقم: 7 متوالية ببتيد P2A ذاتي الانشطار عالي الفاعلية

المتوالية رقم: 8 متوالية ببتيد F2A ذاتي الانشطار عالي الفاعلية

المتوالية رقم: 9 متوالية ببتيد E2A ذاتي الانشطار عالي الفاعلية

المتوالية رقم: 10 متوالية ببتيد T2A ذاتي الانشطار عالي الفاعلية

المتوالية رقم: 11 متوالية الحمض الأميني لـ CD80 البشري

المتوالية رقم: 12 متوالية الحمض الأميني للإنترفيرون البشري

المتوالية رقم: 13 متوالية الحمض الأميني للمركب الترابطي Flt3 البشري القابل للذوبان

المتوالية رقم: 14 متوالية الحمض الأميني للبروتين a1 البشري الالتهابي البلعمي الكبير (الصورة المتشاكلة LD78b)

المتوالية رقم: 15 صورة مثبتة بالغشاء من Fv أحادي السلسلة المضاد لـ CD3 البشري

المتوالية رقم: 16 متوالية جينوم الفيروس NG-330 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر مولد ضد تنشيط الخلايا الليمفاوية T، CD80، المدرج في المنطقة BY. تحتوي مجموعة الجينات الناقلة على 5' SSA، متوالية cDNA لـ CD80 البشري و3' بولي(A)

المتوالية رقم: 17 متوالية جينوم الفيروس NG-343 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر IFNa، وCD80، المدرج في المنطقة BY. تحتوي مجموعة الجينات الناقلة على 5' SSA، متوالية cDNA لـ IFNα، ببتيد P2A، متوالية cDNA لـ CD80 و3' بولي (A)

المتوالية رقم: 18 متوالية جينوم الفيروس NG-345 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر المركب الترابطي Flt3، MIP1a وIFNα، المدرج في المنطقة BY. تحتوي

مجموعة الجينات الناقلة على 5' SSA، cDNA للمركب الترابطي Flt3، متوالية ببتيد P2A، متوالية cDNA لـ MIP1a

المتوالية رقم: 19 متوالية جينوم الفيروس NG-346 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر المركب الترابطي Flt3، MIP1a وCD80، المدرج في المنطقة BY. تحتوي مجموعة الجينات الناقلة على 5' SSA، متوالية cDNA للمركب الترابطي Flt3، متوالية ببتيد P2A، cDNA لـ MIP1a

المتوالية رقم: 20 متوالية جينوم الفيروس NG-347 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر IFNα، MIP1α وCD80، المدرج في المنطقة BY. تحتوي مجموعة الجينات الناقلة على 5' SSA، متوالية cDNA لـ IFNα، متوالية ببتيد P2A، متوالية cDNA لـ MIP1α، T2A

المتوالية رقم: 21 جينوم EnAd

المتوالية رقم: 22 منطقة E2B من جينوم EnAd (BP 10355-5068)

المتوالية رقم: 23 منطقة E3 من EnAd

المتوالية رقم: 24 متوالية غير مشفِّرة للإدراج في BX

المتوالية رقم: 25 متوالية غير مشفِّرة للإدراج في BY

المتواليات رقم: 26-34 المتواليات الرابطة المفصلية

المتوالية رقم: 35-74 المتوالية الرابطة المرنة

المتوالية رقم: 75 و76 المتوالية الرابطة الصلبة

المتوالية رقم: 77-90 المتوالية الرابطة

المتوالية رقم: 91 مستقبل PDGFR "أ"

المتوالية رقم: 92 مستقبل PDGFR "ب"

المتوالية رقم: 93 عامل النمو الشبيه بالإنسولين 1

المتوالية رقم: 94 IL6-R

المتوالية رقم: 95 CD28

المتوالية رقم: 96 متوالية جينوم الفيروس NG-348 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر صورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة ومولد ضد تنشيط الخلايا الليمفاوية T، CD80 المدرج في المنطقة BY.

المتوالية رقم: 97 حمض نووي يشفِّر OKT3-scFv مرتبط بالغشاء

المتوالية رقم: 98 متوالية مجموعة الجينات الناقلة لـ NG-348

المتوالية رقم: 99 صورة مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3 scFv البشري بها علامة V5 عند الطرف C

المتوالية رقم: 100 علامة V5 (9 صورة متغيرة للحمض الأميني)

المتوالية رقم: 101 متوالية جينوم الفيروس NG-348 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر صورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة بها علامة V5 عند الطرف C ومولد ضد تنشيط الخلايا الليمفاوية T، CD80 المدرج في المنطقة

المتوالية رقم: 102 متوالية جينوم الفيروس NG-420 تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر صورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة المدرج في المنطقة BY. تحتوي مجموعة الجينات الناقلة على 5' SSA

المتوالية رقم: 103 متوالية جينوم الفيروس NG-420A تشتمل على جينوم EnAd مع مجموعة جينات ناقلة تشفِّر صورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة وعلامة V5 عند الطرف C، المدرج في المنطقة BY. تحتوي مجموعة الجينات الناقلة على

المتوالية رقم: 104 جزيء رابط

المتوالية رقم: 105 متوالية تشتمل على رامزة بدء

المتوالية رقم: 106 علامة c-myc

المتوالية رقم: 107 علامة c-myc بها جزيء مباعد للحمض الأميني عند الطرف N و C

المتوالية رقم: 108 الجزيء المباعد - العلامة c-myc -نطاق PDGF TM المباعد

المتوالية رقم: 109 جينوم EnAd مخلق بالكامل به موقع استنساخ مدرج لإدخال مجموعة الجينات الناقلة كما في البلازميد pEnAd2.4

الوصف التفصيلي:

B7 عبارة عن مجموعة من البروتينات.

يمكن أن يكون بروتين B7 المشفَّر في الفيروسات الحالة للورم وفقًا للكشف الحالي مفيدًا لأن نطاق خارج الخلايا لعضو مجموعة البروتينات بصفة عامة يعدل وظيفة حيوية، على سبيل المثال يمكن استخدام النطاق خارج الخلايا B7-1 لبرمجة أو حث الخلايا التائية. تكون الوظيفة الحيوية الفعلية نوعية تجاه النطاق خارج الخلايا لكل بروتين B7 محدد (أي بصفة عامة يتسم أعضاء البروتينات المختلفة لمجموعة B7 بوظائف مختلفة). يمكن أن تتضمن وظائف أخرى للبروتينات B7، مثل B7-1 و/أو B7-2 القدرة على ربط CD28 و/أو CTLA-4، وعلى وجه التحديد لإرسال إشارة أو تنشيط مجموعة أو مجموعات إرسال إشارات ذات صلة.

بالإضافة إلى ذلك أو على نحو بديل يمكن استخدام النطاق العابر للأغشية للبروتينات B7 لتوجيه البروتينات المشفَّرة من خلال فيروس وفقًا للكشف الحالي إلى سطح خلية سرطانية، على سبيل المثال من خلال دمج النطاق العابر للأغشية بالطرف C للبروتين ذي الصلة.

يشير البروتين B7 مثلما هو مستخدم هنا، ما لم يحدد السياق خلاف ذلك، إلى متوالية تامة الطول لبروتين من المجموعة B7 أو متوالية مشابهة أو مطابقة له بنسبة 95% (مثل مشابهة أو مطابقة لها بنسبة 96%، 97%، 98%، 99% أو 100% بامتداد مجمل المتوالية ذات الصلة).

المجموعة B7 تتضمن B7-1، B7-2، B7-DC، B7-H1، B7-H2، B7-H3، B7-H4، B7-H5، B7-H6، B7-H7. عندما يتم استخدام بروتين تام الطول عندئذٍ سوف توجد وظيفة حيوية طبيعية واحدة على الأقل للبروتين بصفة عامة.

يشير البروتين تام الطول مثلما هو مستخدم نسبة إلى المجموعة B7، إلى نطاق خارج الخلايا على الأقل، ويتضمن البروتينات الخيمرية B7 حيث يكون لمتوالية النسيج الوراثي بنية ووظيفة بروتين B7 وحيث يتم اختيار المتواليات التي تشكِّل النسيج الوراثي من البروتينات في المجموعة B7. يمكن أن تكون العناصر في شظية أو بروتين تام الطول B7 بروتينات B7 متماثلة أو مختلفة. بالتالي في أحد التجسيدات تكون الشظية أو البروتين B7 خيمرية.

تشير البروتينات الخيمرية B7 مثلما هو مستخدم هنا إلى حيث إلى حدٍ كبير تكون جميع المتواليات التي تشكِّل النسيج الوراثي من البروتين B7، على سبيل المثال 98% على الأقل من متوالية النسيج الوراثي عبارة عن شظايا البروتينات B7 المدمجة معًا. بالتالي تشير شظية خيمرية مثلما هو مستخدم هنا إلى شظية تشتمل على متوالية من اثنين أو أكثر من بروتينات B7 مختلفة.

في أحد التجسيدات يشتمل البروتين تام الطول B7 على نطاق خارج الخلايا، على سبيل المثال من بروتين B7 مفرد، مثل B7-1 و/أو B7-2.

في أحد التجسيدات يشتمل البروتين تام الطول B7 على نطاق خارج الخلايا ونطاق عابر للأغشية، على سبيل المثال من نفس البروتين B7 أو على نحو بديل نطاق خارج الخلايا من بروتين B7 (مثل B7-1 و/أو B7-2) ونطاق عابر للأغشية أو مكافئه، مثل جزيء تثبيت غشاء شحمي، من بروتين مختلف تمامًا.

في أحد التجسيدات يمكن أن يشتمل بروتين B7 خيمري تام الطول على نطاق خارج الخلايا لبروتين B7 واحد (مثل B7-1 و/أو B7-2) ونطاق عابر للأغشية من بروتين B7 مختلف.

في أحد التجسيدات يشتمل البروتين تام الطول B7 على نطاق خارج الخلايا، نطاق العابر للأغشية ونطاق داخل الخلايا، على سبيل المثال جميعها من نفس البروتين B7 أو من اثنين أو أكثر من بروتينات B7 مختلفة.

تشير شظية نشطة من بروتين B7 مثلما هو مستخدم هنا إلى شظية لها وظيفة واحدة على الأقل ببروتين B7، على سبيل المثال لتسهيل التعبير على سطح الخلية السرطانية أو وظيفة حيوية أخرى لبروتين B7.

في أحد التجسيدات تتسم الشظية بنسبة 50% على الأقل من نشاط البروتين تام الطول، مثل 60، 65، 70، 75، 80، 85، 90، 95 أو 100% من نشاط البروتين تام الطول.

في أحد التجسيدات تشتمل شظية نشطة على أو تتكون من نطاق خارج الخلايا لـ B7 أو متوالية مشابهة أو مطابقة له بنسبة 95%، مثل مشابهة أو مطابقة بنسبة 96، 97، 98، 99 أو 100%.

في أحد التجسيدات تشتمل شظية B7 على أو تتكون من نطاق عابر للأغشية من بروتين B7 على وجه التحديد ذاك الموصوف هنا، مثل B7-1. يُرى أن استخدام الأخير يسهم في التعبير على سطح الخلية.

في أحد التجسيدات يمكن أن تكون شظية B7 نشطة جزءًا من نطاق خارج الخلايا.

يمكن استخدام الشظية النشطة، على سبيل المثال شظية عابرة للأغشية أو شظية أكبر تشتمل على المزيد من نطاقات B7 في بروتين دمج مع بروتين إضافي، على سبيل المثال لتسهيل التعبير عن البروتين الإضافي على سطح الخلية السرطانية.

لا تشير شظية أكبر مثلما هو مستخدم هنا إلى حجم أو وزن بعينه لكن إلى تقرير أكبر عن معلومات المتوالية (أي شظية تشتمل على متواليات من اثنين من نطاقات B7 على الأقل) التي بدورها يمكن أن توفر وظيفية أعلى.

في أحد التجسيدات تشتمل الشظية الأكبر على بعض النشاط الحيوي للبروتين B7 ذي الصلة. في أحد التجسيدات تكون شظية B7 النشطة عبارة عن شظية تحتفظ بالنشاط الحيوي الأساسي للبروتين تام الطول، على سبيل المثال القدرة على برمجة أو تنشيط الخلايا التائية.

يمكن تحليل نشاط شظية بروتين معينة في اختبار في المعمل ذي صلة، على سبيل المثال باستخدام البروتين تام الطول كمجموعة مقارنة، على سبيل المثال باستخدام الاختبار الموصوف

في الأمثلة هنا. حيث تكون الشظية النشطة عبارة عن نطاق عابر للأغشية يمكن تقييم النشاط من خلال تحليل التعبير على السطح بخلايا البروتين ذي الصلة الذي عليه يتم ربط النطاق العابر للأغشية، على سبيل المثال باستخدام الاختبار الموصوف في الأمثلة هنا.

عندما يكون البروتين B7 تام الطول عبارة عن جزء من بروتين دمج فعندئذٍ يمكن ربط الجزء B7 ببروتين إضافي من خلال رابطة أميد بين طرف إحدى المتواليات وبداية متوالية البروتين التالي أو توصيله من خلال جزيء رابط. يتم توضيح الأمثلة على الجزيئات الرابطة أدناه.

يمكن استخدام بروتين B7 تام الطول يشتمل على نطاق عابر للأغشية لتقديم النطاق خارج الخلايا للبروتين B7 والبروتين أو الشظية المدمجة أو المتصلة به على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى. بصفة عامة في هذا التجسيد سوف يتم ربط البروتين B7 بسطح الخلية السرطانية وسوف يكون بروتين "آخر" عند الطرف N وعلى الجانب خارج الخلايا من سطح الخلية السرطانية.

وعلى ذلك يمكن وضع البروتينات مثلما هو محبذ، على سبيل المثال بحيث يكون النطاق خارج الخلايا لـ B7 عند الطرف N، مدمج أو متصل عند طرفه C بالبروتين أو الشظية التالية، التي بدورها تكون مدمجة أو متصلة عند الطرف C بنطاق العابر للأغشية، على سبيل المثال النطاق عابر للأغشية من بروتين B7.

بصفة عامة عندما يتم استخدام بروتين B7 تام الطول في بروتين دمج فعندئذٍ سوف يكون لكل من البروتين B7 والبروتين الإضافي وظيفة حيوية.

يشير بروتين الدمج Fusion protein مثلما هو مستخدم هنا إلى اثنين من البروتينات أو الشظايا على الأقل أو توليفة من بروتين واحد على الأقل وشظية واحدة على الأقل مدمجة مباشرة أو يتم توصيلها ببعضها البعض، على سبيل المثال من خلال جزيء رابط.

يشير مصطلح مدمج مثلما هو مستخدم هنا بصفة عامة إلى رابطة أميد بين طرف أحد البولي ببتيدات (أو بروتين/ شظية) وبداية البولي ببتيد التالي (أو بروتين/ شظية).

يشير مصطلح متصل، ما لم يحدد السياق خلاف ذلك، إلى حيث يتم ربط اثنين من الكيانات، مثل اثنتين من متواليات البولي ببتيد عن طريق جزيء رابط. يكون جزيء رابط عبارة عن متوالية لا

توجد بصورة طبيعية سواء في بولي ببتيد أو متوالية، لا توجد في هذا الموضع تحديدًا نسبة إلى كل من البولي ببتيدات.

في أحد التجسيدات يشتمل بروتين الدمج على بروتين B7 أو شظية نشطة منه. تشتمل بروتينات الدمج على شظايا أو بروتين B7 ولا تتم الإشارة إلى البروتينات الإضافية باسم بروتينات خيمرية هنا. بصفة عامة يشير بروتين الدمج مثلما هو مستخدم هنا إلى توليفة من بروتين B7 أو شظية منه وبروتين/ شظية أخرى غير B7.

تتم الإشارة هنا فقط إلى البروتينات المحتوية على شظايا من بروتينات B7 مختلفة باسم خيمرية، مثلما هو موصوف أعلاه.

في أحد التجسيدات لا تشتمل بروتينات الدمج وفقًا للكشف الحالي على بروتين B7 أو شظية نشطة منه ويتم تشفيرها من خلال فيروس وفقًا للكشف الحالي بالإضافة إلى البروتين B7 أو شظية منه.

بالتالي يمكن أن تشفِّر الفيروسات وفقًا للكشف الحالي كيانات بالإضافة إلى البروتين B7 أو شظية نشطة منه، تتضمن هذه الكيانات المزيد من البروتينات.

المجموعة B7

في أحد التجسيدات يتم اختيار B7 على حدة من B7-1، B7-2، B7-DC، B7-H1، B7-H2، B7-H3، B7-H4، B7-H5، B7-H6، B7-H7، شظايا نشطة منها، وتوليفات مما سبق. في أحد التجسيدات يكون البروتين B7 عبارة عن B7-1 (CD80)، B7-2 (CD86) أو شظية نشطة من أي منها وتوليفات مما سبق، على وجه التحديد B7-1 أو شظية نشطة منه.

البروتينات B7 تتضمن B7-1 (المعروف أيضًا باسم CD80 برقم uniprot هو P33681)، B7-2 (المعروف أيضًا باسم CD86 برقم uniprot هو P42081). تربط هذه البروتينات CD28 وCTLA-4.

في أحد التجسيدات يكون لـ CD80 المتوالية التالية:

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSC
GHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSI
VILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIP
TSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLD
FNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNLLPSWAITLISVN
GIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV المتوالية رقم: 11

بروتينات B7 أخرى تتضمن B7-DC (المعروف أيضًا باسم PDCD1LG2 وPD-L2 برقم uniprot هو Q9BQ51)، B7-H1 (المعروف أيضًا باسم PD-L1 وCD274: برقم uniprot هو Q9NZQ7). تربط كل من هذه البروتينات PD-1.

يكون المركب الترابطي للموت المبرمج Programmed death-ligand 1 (PD-L1) عبارة عن بروتين عابر للأغشية من النوع 1 بكتلة ذرية تبلغ 40 كيلو دالتون تم التكهن بأنه يلعب دورًا رئيسيًا في كبت الجهاز المناعي. يبدو أن الزيادة المقننة لـ PD-L1 يمكن أن تسمح لأنواع السرطان باجتياح الجهاز المناعي للعائل. كشف تحليل 196 من عينات الورم من المرضى المصابين بسرطانة الخلايا الكلوية عن أن تعبير الورم المرتفع عن PD-L1 كان متصلًا بزيادة توغل الورم وزيادة خطر الموت بمعدل 4.5 ضعف. صعب بدرجة كبيرة التكهن بعاقبة المرض في المرضى بسرطان المبيض ممن لديهم مستويات أعلى من التعبير عن PD-L1 عن أولئك ممن لديهم مستويات تعبير أقل. ارتبط التعبير عن PD-L1 بشكل عكسي مع عدد الخلايا الليمفاوية T لـ +CD8 داخل الخلايا الظهارية، مما يقترح أن PD-L1 على خلايا الورم يمكن أن يكبت الخلايا التائية لـ +CD8 المضاد للورم. يمكن أن يكون التأثير معتمد على نوع الورم؛ أوضحت دراسة على مرضى مصابين بسرطان الرئة بغير الخلايا الصغيرة أن مستويات تعبير أعلى عن البروتين PD-L1 وmRNA تتصل بزيادة ناتج ارتشاح الخلايا الليمفاوية الموضعية ومدة البقاء الأطول لها. تم توضيح أن عدد من الأجسام المضادة لـ PDL1 تكون محل اهتمام لعلاج العديد من أنواع السرطان في التجارب الأكلينيكية.

في أحد التجسيدات لا يحث البروتين B7-DC و/أو B7-H1 أو شظية منه المستخدمة في الفيروس وفقًا للكشف الحالي الكبت المناعي، على سبيل المثال يتم تحويره لإزالة الوظيفة الكابتة للمناعة.

على نحو بديل، يمكن استخدام فيروس يشفِّر النطاق خارج الخلايا B7-H1 في الصورة غير المتحورة لعلاج أنواع سرطان ملائمة، حيث تتصل الزيادة المقننة لـ PD-L1 بتكهن جيد/محسن بعاقبة المرض، مثل سرطان الرئة.

في أحد التجسيدات يتم حذف نطاق سيتوبلازمي على الأقل (نطاق داخل الخلايا) من B7-DC و/أو B7-H1 أو لا يعمل. دون الرغبة بالتقيد بنظرية معينة يوجد دليل يقترح أن إزالة النطاق داخل الخلايا تخفض مقاومة الخلايا السرطانية للتحلل Blood 2008, April 1; 111(7) :3635-3643.

في أحد التجسيدات يتم فقط استخدام شظية النطاق العابر للأغشية لـ B7-DC و/أو B7-H1.
في أحد التجسيدات لا يتم توفير البروتينات التالية كبروتينات تامة الطول B7-DC و B7-H1 بنشاط حيوي ذي صلة.

بروتينات B7 أخرى تتضمن B7-H2 (المعروف أيضًا باسم ICOSLG، B7RP1، CD275: برقم uniprot هو O75144) يربط ICOS، B7-H3 (المعروف أيضًا باسم CD276: برقم uniprot هو Q5ZPR3)، B7-H4 (المعروف أيضًا باسم VTCN1: برقم uniprot هو Q727D3)، B7-H5 (المعروف أيضًا باسم VISTA، مستقبل Platelet وهو Gi24، SISP1)، B7-H6 (المعروف أيضًا باسم NCR3LG1، NR3L1) الذي يربط NKp30، B7-H7 (المعروف أيضًا باسم HHLA2) الذي يربط CD28H.

في أحد التجسيدات تشتمل الشظية فقط على النطاق العابر للأغشية لأي واحد من B7-H2، B7-H3، B7-H4، B7-H5، B7-H6 و B7-H7.

البروتينات الفردية تتضمن بروتينات أحادية، أي بروتينات أو شظايا نشطة مما سبق لا تشكل جزءًا من بروتين الدمج (وتتضمن البروتينات الخيمرية)، وأيضًا بروتينات الدمج. في أحد التجسيدات البروتينات الفردية هي بروتينات أحادية (وتتضمن شظايا نشطة مما سبق).

في أحد التجسيدات يكون النطاق السيتوبلازمي للبروتين B7 موجودًا. في أحد التجسيدات يكون النطاق السيتوبلازمي غير موجود. يمكن أن يخفض غياب النطاق السيتوبلازمي أو يقضي على إرسال الإشارات داخل الخلايا إلى الخلية السرطانية، ذات الصلة بواحد أو أكثر من التجسيدات المناقشة أدناه.

"النطاقات العابرة للأغشية"

في أحد التجسيدات يتم استخدام نطاق عابر للأغشية غير المشتق من بروتين B7 للتعبير عن بروتين (يتضمن بروتين دمج) مشفَّر من خلال فيروس وفقًا للكشف الحالي على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى، على سبيل المثال يمكن استخدام النطاق العابر للأغشية لتقديم شظية بروتين B7 نشطة أو بروتين آخر محل اهتمام على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى. على نحو بديل يمكن استخدامه لتقديم بروتين دمج، على سبيل المثال يشتمل على بروتين B7 أو شظية نشطة منه على السطح المذكور. في أحد التجسيدات يتم استخدام النطاق العابر للأغشية من مستقبل PDGF أو شظية منه للتعبير عن B7 و/أو بروتين آخر على سطح الخلية السرطانية.

في أحد التجسيدات تشتمل متوالية ربط أو تثبيت عابرة للأغشية مستخدمة في الكشف الحالي على نطاق PDGFR TM (على سبيل المثال ala513–arg561)، مثل AVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKPR (المتوالية رقم: 2).

في أحد التجسيدات تشتمل متوالية ربط أو تثبيت مستخدمة في الكشف الحالي على علامة مرتبطة، على سبيل المثال بمستقبل PDGF أو شظية منه، مثل النطاق PDGFR TM، على وجه التحديد المتوالية رقم: 2.

تتضمن العلامات المناسبة العلامات His، العلامات Flag، العلامة c–myc وما شابه. على نحو أكثر تحديدًا يمكن أن تشتمل متوالية الربط أو التثبيت على علامة c–myc على سبيل المثال ذات المتوالية رقم: 106 EQKLISEEDL يتبع ذلك استخدام النطاق PDGFR TM، (على سبيل المثال ala513–arg561)، مثل الموضح في المتوالية رقم: 2 AVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR.

في أحد التجسيدات تشتمل العلامة c-myc على جزيء مباعد أو أحماض أمينية مباعدة عند الطرف 3' و/أو 5'، على سبيل المثال gsEQKLISEEDLn (المتوالية رقم: 107 حيث تمثل الأحرف الصغيرة الأحماض الأمينية التي تتم إضافتها إلى العلامة كأجزاء مباعدة).

في أحد التجسيدات متوالية الربط أو التثبيت المتوالية المستخدمة هي gsEQKLISEEDLnAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIML WQKKPR (المتوالية رقم: 108) حيث تمثل الأحرف الصغيرة الأجزاء المباعدة للأحماض الأمينية).

بصفة عامة لا يشتمل البروتين/ البولي ببتيد الذي عليه يتم ربط متوالية الربط أو التثبيت على رامزة إنهاء.

سوف يشتمل بروتين أو بروتينات خارجية المنشأ مشفَّرة بمساعدة الفيروس وفقًا للكشف الحالي بصفة عامة على متوالية رائدة (يشار إليها أيضًا باسم إشارة ببتيد). تكون المتوالية الرائدة، على سبيل المثال متوالية بطول من نحو 5 إلى 30 حمض أميني توجد عند الطرف N للبروتين أو البولي ببتيد.

في أحد التجسيدات تكون المتوالية الرائدة للبروتين المراد التعبير عنه على سطح الخلية السرطانية لبشر، على سبيل المثال HuVHSS.

في أحد التجسيدات تكون بنية مجموعة ORF كما يلي:

LS-POLY-TAG-TM_D

حيث

تكون LS عبارة عن متوالية رائدة، على سبيل المثال متوالية رائدة بشرية؛

يكون POLY (بولي)عبارة عن بولي نيوكليوتيد يشفِّر بولي ببتيد أو بروتينات محل اهتمام، على وجه التحديد ذاك الذي تم الكشف عنه هنا؛

تكون TAG عبارة عن علامة على سبيل المثال تلك التي تم الكشف عنها هنا، مثل c-myc، على وجه التحديد المتوالية رقم: 100 أو 106؛

يكون TM_D عبارة عن نطاق TM على سبيل المثال النطاق PDGFR TM، على سبيل المثال المتوالية رقم: 2.

عندما يكون البولي ببتيد عبارة عن scFv فعندئذٍ يمكن أن يكون ORF كما يلي:

LS-VAR1-LINK-VAR_2-TAG-TM_D

حيث

تكون LS عبارة عن متوالية رائدة، على سبيل المثال متوالية رائدة بشرية؛

يكون VAR_1 عبارة عن بولي نيوكليوتيد يشفِّر منطقة متغيرة مثل منطقة VH؛

يكون LINK عبارة عن جزيء رابط، على سبيل المثال مثلما تم الكشف عنه هنا، مثل جزيء رابط بناءً على وحدات G4S، على وجه التحديد المتوالية رقم: 104 GGGGSGGGGSGGGGS؛

تكون VAR_2 عبارة عن بولي نيوكليوتيد يشفِّر منطقة متغيرة، مثل منطقة VL؛

تكون TAG عبارة عن علامة، على سبيل المثال تلك التي تم الكشف عنها هنا، مثل c-myc، على وجه التحديد المتوالية رقم: 100 أو 106؛

يكون TM_D عبارة عن نطاق TM على سبيل المثال نطاق PDGFR TM، على سبيل المثال المتوالية رقم: 2.

يمتد الكشف أيضًا إلى تجسيدات، على وجه التحديد تلك الموصوفة على وجه الخصوص هنا، تشتمل على علامة عند الأطراف N أو C من سلاسل البولي ببتيد، بحيث تبقى داخل أو خارج الغشاء. بالتالي تكون العلامة عند الأطراف C التي توجد داخل الغشاء مفيدة لأنه ليس من المحتمل أن تتداخل مع ربط أو وظيفة بولي ببتيد.

على ذلك يمكن أن يكون التعبير عن العلامة على الطرف N من بروتين يتم التعبير عنه على السطح مفيدًا في بعض الحالات لأنه يمكن أن يسهل عزل، تحديد وتنقية الخلايا التي تعبر عن البروتين.

في أحد التجسيدات يتم استخدام توليفة من نطاق عابر للأغشية ومتوالية إشارة مفرزة للتعبير عن بروتين مشفَّر بمساعدة الفيروس (على سبيل المثال مثلما هو موصوف هنا) على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى. أوضح المخترعون الحاليون أن البروتينات المشفَّرة يتم التعبير عنها فقط على الخلايا التي تسمح بالإصابة بعدوى الفيروس الحال للورم، أي الخلايا السرطانية.

في أحد التجسيدات يتم اختيار الشظية المستخدمة للتعبير عن البروتين على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى (مثل الشظية العابرة للأغشية) من نحو 20 إلى 25 حمض أميني غير آلف للماء تشكل حلزون ألفا عابر للأغشية، على سبيل المثال من البروتينات التي تتضمن مستقبل PDGF، مستقبل عامل النمو الشبيه بالإنسولين، مستقبل IL-6، CD28، جليكوفورين، مستقبل LDL، بروتين HA للإنفلونزا، مستقبل الإنسولين، مستقبل الجليكوبروتين اللاسيالي، مستقبل ترانسفيرين.

في أحد التجسيدات يتم اختيار الشظية المستخدمة للتعبير عن البروتين على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى (مثل الشظية العابرة للأغشية) من مجموعة تشتمل على متواليات النطاق TM (الحد الأدنى من الأجزاء) المحددة في المتوالية رقم: 91، 92، 93، 94 أو 95:

المتوالية رقم:	الاسم	المتوالية
91	مستقبل PDGFR "أ"	Avlvllviviislivlvviw
92	مستقبل PDGFR "ب"	vvisailalvvltiisliili
93	عامل النمو الشبيه بالإنسولين 1	iiigpplifvflfsvvigsiylfl

SSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVL	IL6-R	94
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28	95

في أحد التجسيدات يتم اشتقاق النطاق العابر للأغشية المستخدم من مستقبل مقترن بالبروتين G أو مولد الضد S من فيروس التهاب الكبد الوبائي "ب".

في أحد التجسيدات يتم وضع بروتين دمج يشتمل على نطاق خارج الخلايا تام الطول لبروتين أو شظية B7 وأيضًا نطاق عابر للأغشية مشتق من بروتين غير B7 بحيث يوجد البروتين B7 عند النهاية الطرفية من بروتين الدمج البعيدة عن سطح الخلية السرطانية، أي خارج الخلية السرطانية مقابلًا للحيز خارج الخلايا.

الفيروسات

يكون تشفير متوالية DNA لبروتين B7 أو شظية نشطة تحت تحكم معزز داخلي المنشأ مفيدًا أيضًا لأنه يتم التعبير عن البروتين وفقًا لدورة حياة الفيروس مقارنة بالتعبير عنه بشكل بنائي. في الموقف الحالي يمكن أن ينتج التعبير المستمر في وجود المعزز خارجي المنشأ، على سبيل المثال معزز قوي مثل المعزز CMV، المزيد من البروتين B7 مما هو ضروري لتأثير علاجي ويمكن أن يسبب تأثيرات غير محبذة.

تتضمن بدائل للنطاقات العابرة للأغشية للتعبير عن البروتينات على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى طرقًا تستخدم جزيء تثبيت شحم فسفوري سكري (يشار إليه أيضًا باسم جزيء تثبيت GPI) يرتبط بالحمض الأميني عند الطرف C من البروتين أو الشظية خارج الخلايا (Low et al 1986, Cross 1987, Low and Saltiel 1988, Ferguson and William 1988). تتضمن جزيئات تثبيت الشحوم الفسفورية السكرية المناسبة، للاستخدام في الكشف الحالي تلك من Thy-1، CAM-N و DAF.

في أحد التجسيدات يكون الفيروس الحال للورم وفقًا للكشف الحالي عبارة عن فيروس غدي، على سبيل المثال فيروس غدي من المجموعة "ب". في أحد التجسيدات يكون الفيروس وفقًا للكشف

الحالي عبارة عن فيروس خيمري، على سبيل المثال EnAd. في أحد التجسيدات يقوم الفيروس الغدي بالنسخ.

في أحد التجسيدات يكون الفيروس قاصر الاستنساخ ويتم توفيره كناقل فيروسي.

في أحد التجسيدات توجد المتوالية التي تشفِّر البروتين B7 أو شظية نشطة منه بين رامزة الإنهاء وموقع التعرف على بولي A من الجين الفيروسي الغدي L5 ورامزة الإنهاء وموقع التعرف على بولي A من الجين E4.

في أحد التجسيدات توجد المتوالية التي تشفِّر البروتين B7 أو شظية نشطة منه بين نحو زوج القاعدة 29356 ونحو زوج القاعدة 29357 من جينوم EnAd، على سبيل المثال مثلما هو موضح في المتوالية رقم: 21، أو موضع مكافئ لذلك. سوف يفهم الشخص صاحب المهارة أن القيمة العددية المطلقة للمكان يمكن أن تتغير بناءً على كيفية تخصيص الترقيم. زمع ذلك، يبقى الموضع النسبي للجين المدرج كما هو بغض النظر عن القيم العددية المطلقة المستخدمة.

في أحد التجسيدات يكون للفيروس الغدي الحال للورم وفقًا للكشف الحالي صيغة (I):

(I) 5'ITR– B_1–B_A– B_2– B_X – B_B – B_Y – B_3–3'ITR

حيث:

يكون B_1 عبارة عن رابطة أو يشتمل على: E1A، E1B أو E1A–E1B (على وجه التحديد E1A، E1B أو E1A–E1B)؛

يكونB_A عبارة عن E2B–L1–L2–L3–E2A–L4؛

يكون B_2 عبارة عن رابطة أو يشتمل على E3 أو جين ناقل، على سبيل المثال في وجود معزز داخلي المنشأ أو خارجي المنشأ؛

يكون B_X عبارة عن رابطة أو متوالية DNA تشتمل على: موقع تقييد، واحد أو أكثر الجينات الناقلة أو كلاهما؛

يشتمل B_B على L5؛

يشتمل B_Y على جين ناقل يشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه؛ و

يكون B_3 عبارة عن رابطة أو يشتمل على E4.

في أحد التجسيدات يكون للفيروس الحال للورم صيغة (Ia):

(Ia) $5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_B-B_Y-B_3-3'ITR$

حيث:

يكون B_1 عبارة عن رابطة أو يشتمل على: E1A، E1B أو E1A-E1B (على وجه التحديد E1A، E1B أو E1A-E1B)؛

يكونB_A عبارة عن E2B-L1-L2-L3-E2A-L4؛

يكون B2 عبارة عن رابطة أو يشتمل على E3؛

يشتمل B_B على L5؛

يشتمل B_Y على جين ناقل يشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه؛ و

يكون B_3 عبارة عن رابطة أو يشتمل على E4.

في أحد التجسيدات يكون جينوم الفيروس في البنيات ذات الصيغة (I) و/أو (Ia) من Ad11 أو EnAd، على وجه التحديد EnAd.

في أحد التجسيدات يكون الجين الناقل الذي يشفِّر البروتين B7 أو شظية نشطة منه، تحت تحكم معزز داخلي المنشأ، على سبيل المثال المعزز المتأخر الرئيسي.

العناصر المنظمة

في أحد التجسيدات يشتمل BY على مجموعة جينات ناقلة، تشتمل المجموعة المذكورة على جين ناقل يشفِّر بروتين B7 أو شظية منه وعنصر منظم، مثل توليفة من العناصر المنظمة.

في أحد التجسيدات يكون العنصر المنظم عبارة عن متوالية مستقبل الجدل.

في أحد التجسيدات يكون العنصر المنظم عبارة عن متوالية Kozak.

في أحد التجسيدات، على سبيل المثال حيث يشفِّر الجين الناقل جزيء RNA متعدد المقارين، يكون العنصر المنظم عبارة عن متوالية IRES.

في أحد التجسيدات تكون المتوالية المنظمة عبارة عن متوالية ببتيد عالي الفاعلية ذاتي الانشطار مثل P2A، T2A، F2A، E2A.

في أحد التجسيدات تكون المتوالية المنظمة عبارة عن ذيل بولي A.

في أحد التجسيدات يوجد اثنتين من المتواليات المنظمة على الأقل، على سبيل المثال متوالية مستقبل الجدل ومتوالية Kozak أو متوالية مستقبل الجدل وذيل بولي A، أو متوالية مستقبل الجدل ومتوالية IRES، أو متوالية مستقبل الجدل ومتوالية P2A.

في أحد التجسيدات يوجد ثلاث متواليات منظمة على الأقل، على سبيل المثال متوالية مستقبل الجدل، متوالية Kozak وذيل بولي A، أو متوالية مستقبل الجدل IRES أو متوالية 2A وذيل بولي A؛ أو متوالية مستقبل الجدل، متوالية Kozak وIRES أو متوالية 2A.

في أحد التجسيدات يوجد أربع متواليات منظمة على الأقل، على سبيل المثال متوالية مستقبل الجدل، متوالية Kozak، IRES أو متوالية 2A وذيل بولي A، على وجه التحديد توجد بين L5 وE4 بالترتيب متوالية مستقبل الجدل، متوالية Kozak، IRES أو متوالية 2A وذيل بولي A.

في أحد التجسيدات يشفِّر الجين الناقل جزيء RNA متعدد المقارين يشتمل على كل من متوالية IRES ومتوالية 2A المنظمة.

البروتينات المشفَّرة بمساعدة الفيروس

في أحد التجسيدات يشفِّر الفيروس وفقًا للكشف الحالي العديد من البروتينات للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى حيث يكون بروتين واحد على الأقل عبارة عن بروتين B7 أو شظية نشطة منه، على سبيل المثال اثنين، ثلاثة، أربعة أو أكثر من البروتينات المختلفة التي يتم تشفيرها، على وجه التحديد اثنين أو ثلاثة من البروتينات التي يتم تشفيرها بمساعدة الفيروس

للتعبير على سطح الخلية السرطانية أو الإفراز في الحيز خارج الخلايا. يتضمن البروتين في هذا السياق بروتين دمج. في أحد التجسيدات يشفِّر الفيروس وفقًا للكشف الحالي اثنين من بروتينات B7 مختلفة، شظايا نشطة منه أو توليفات مما سبق، على سبيل المثال كل منها للتعبير على سطح الخلية السرطانية.

في أحد التجسيدات يشفِّر الفيروس وفقًا للكشف الحالي واحد أو اثنين من البروتينات المستخدمة للتعبير على سطح الخلية وينوى أن يتعامل واحد أو اثنين من البروتينات التي لا يمكن تثبيتها على سطح الخلية، على سبيل المثال مع الخلية السرطانية أو تكون للإفراز/الإطلاق من الخلايا.

في أحد التجسيدات يتم تشفير بروتين B7 أو شظية نشطة بمساعدة الفيروس وفقًا للكشف الحالي للتعبير على سطح الخلية السرطانية ويتم تشفير الصورة القابلة للذوبان، التي يتم إطلاقها أو إفرازها من الخلية، من نفس البروتين B7 أو بروتين B7 مختلف (وتتضمن شظايا نشطة) أيضًا بمساعدة الفيروس.

في أحد التجسيدات يتم تشفير اثنين على الأقل من بروتينات B7 مختلفة أو شظايا نشطة بمساعدة فيروس وفقًا للكشف الحالي.

في أحد التجسيدات يكون بروتين واحد على الأقل يتم التعبير عنه على سطح الخلية عبارة عن بروتين B7 ويكون واحد على الأقل من البروتينات غير المثبتة بالخلية (على سبيل المثال المفرزة) بروتين غير البروتين B7.

في أحد التجسيدات يمكن تشفير العديد من البروتينات ليتم التعبير عنها كبروتينات منفصلة تتم معالجتها على حدة والتعبير عنها في غشاء الخلية السرطانية. يمكن أن تسهم استقلالية البروتينات على سطح الخلية السرطانية بشكل إيجابي في تنشيط المناعة. مع عدم الرغبة في التقيد بنظرية معينة، يمكن أن يؤثر الحشو بالشحوم على مائعية (أي لزوجة) الطبقة الثنائية الشحمية في غشاء خلية سرطانية. يمكن أن تؤثر لزوجة الغشاء على دوران واتجاه البروتينات والجزيئات الحيوية الأخرى في الغشاء، مما يؤثر على وظائف هذه الجزيئات. بالتالي عندما توجد البروتينات المشفَّرة بالفيروس كبروتينات فردية وبروتينات منفصلة في غشاء الخلية السرطانية المصابة بعدوى، تسمح

مائعية الطبقة الثنائية الشحمية بحركة مستقلة للجزيئات التي يمكن أن تكون عبارة عن نسق مناسب على وجه التحديد، على سبيل المثال بشكل مشابه لنسق طبيعي يؤدي إلى الوظيفة الحيوية.

في أحد التجسيدات توجد البروتينات التي تمت معالجتها والتعبير عنها على حدة (مثبتة) في أماكن مختلفة، مثل أماكن منفصلة فيزيائيًا، في غشاء الخلية السرطانية.

في أحد التجسيدات لا يكون واحد أو أكثر البروتينات (على سبيل المثال جميع البروتينات) المشفَّرة بالفيروس والتي يتم التعبير عنها على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى عبارة عن بروتينات دمج.

مثلما هو موصوف أعلاه في أحد التجسيدات يتم التعبير عن البروتينات كبروتين دمج.

في أحد التجسيدات يوفر الفيروس وفقًا للكشف الحالي واحد أو أكثر البروتينات المستقلة المنفصلة للتعبير على سطح الخلية وواحد أو أكثر بروتينات الدمج للتعبير على سطح الخلية.

بالتالي في أحد التجسيدات يشتمل الفيروس وفقًا للكشف الحالي على متواليات DNA تشفِّر البروتينات العديدة المذكورة المتعلقة بالتعبير، على سبيل المثال على السطح أو الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد التجسيدات يشتمل الفيروس وفقًا للكشف الحالي على اثنين أو أكثر من الجينات الناقلة، في نفس الأماكن أو أماكن مختلفة في جينوم الفيروس. عندما توجد عند نفس الموضع في جينوم الفيروس سوف يستمر التعبير عن العديد من البروتينات على حدة عند سطح الخلية السرطانية.

في أحد التجسيدات يتم تشفير العديد من البروتينات (التي تتضمن بروتينات الدمج) في أماكن مختلفة في جينوم الفيروس، على سبيل المثال في E3، BX و/أو BY ويتم التعبير عنها بشكل منفصل على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

في أحد التجسيدات يتم تشفير العديد من البروتينات (التي تتضمن بروتينات الدمج) في نفس المكان في جينوم الفيروس ويتم التعبير عنها معًا على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى،

على سبيل المثال حيث يتم توفير البروتينات المشفَّرة كبروتين دمج، على وجه التحديد حيث يشتمل بروتين الدمج على بروتين B7 أو شظية نشطة منه.

في أحد التجسيدات يكون البروتين B7 في بروتين الدمج عبارة عن بروتين تام الطول، على وجه التحديد بروتين موصوف هنا، مثل B7-1 و/أو B7-2، مدمج أو مرتبط ببروتين آخر محل اهتمام أو شظية نشطة منه. في أحد التجسيدات، يشتمل بروتين الدمج على غشاء ناقل من البروتين B7. في أحد التجسيدات يكون B7 عبارة عن شظية نشطة ما عدا النطاق العابر للأغشية. في تجسيد لاحق يمكن استخدام غشاء ناقل غير المشتق من البروتين B7 لضمان تقديم بروتين الدمج على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

في أحد التجسيدات يتم تشفير العديد من البروتينات في نفس المكان في الفيروس ويتم التعبير عنها كواحد أو أكثر بروتينات الدمج معًا على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

عندما يكون مكان الجين (الجينات) الذي يشفِّر بروتين أو البروتين (البروتينات) محل اهتمام في الفيروس متماثلًا فعندئذٍ يمكن ربط الجينات، على سبيل المثال من خلال المتوالية IRES أو ببتيد 2A.

في أحد التجسيدات يشتمل الفيروس وفقًا للكشف الحالي على جين ناقل "ثاني" واختياريًا جين ناقل ثالث (أي واحد أو أكثر من البروتينات العديدة المذكورة، على سبيل المثال التي تشفِّر بولي ببتيد مختار من مجموعة تشتمل على سيتوكين، كيموكين، مركب ترابطي، وجزيء جسم مضاد، مثل جزيء جسم مضاد مناهض، وجزيء جسم مضاد مساعد.

في أحد التجسيدات يتم اختيار بروتين أو بروتينات إضافية على حدة من مجموعة تشتمل على جسم مضاد، شظية جسم مضاد أو مركب ترابطي للبروتين يربط CD3، CD28، CD80، CD86، 4-1BB، GITR، OX40، CD27، CD40 وتوليفات، على سبيل المثال في صور مناسبة للتعبير على سطح الخلية السرطانية.

في أحد التجسيدات يكون البروتين الإضافي عبارة عن جسم مضاد لـ CD3، على سبيل المثال مختار على حدة من Muromonab-CD3 (المعروف أيضًا باسم OKT3)، أتيليكسيزوماب

(المعروف أيضًا باسم TRX4)، تيبليزوماب (المعروف أيضًا باسم hOKT3γ1(Ala-Ala))، أو فيزيليزوماب.

في أحد التجسيدات يكون الجسم المضاد لـ CD3 في صورة شظية جسم مضاد، على سبيل المثال scFv الذي يكون جزءًا من بروتين دمج به منطقة عابرة للأغشية من بروتين آخر، على سبيل المثال النطاق العابر للأغشية من مستقبل PDGF أو من صورة سطح الخلية لـ IgG

في أحد تجسيدات يكون جزيء الجسم المضاد عبارة عن مثبط (جسم مضاد مناهض) يتم اختياره على حدة من مجموعة تشتمل على مثبط لأحد عوامل توليد الأوعية، مثل جزيء جسم مضاد لـ VEGF، ومثبط لعوامل تعطيل نشاط الخلية التائية، مثل جزيء جسم مضاد لـ CTLA-4، جسم مضاد لـ PD1 أو جسم مضاد لـ PDL1. في أحد تجسيدات يكون جزيء الجسم المضاد عبارة عن جزيء مساعد مختار على حدة من مجموعة تشتمل على أجسام مضادة لـ CD40، GITR، OX40، CD27 و4-1BB.

في أحد التجسيدات يمكن أن يكون جين ناقل إضافي يشفِّر سيتوكين، أو صورة متغيرة قابلة للذوبان مما سبق مختارة من مجموعة تشتمل على IL-2، IFNα، IFNβ، IFN، GM-CSF، IL-15، IL-12 ومركب ترابطي لتيروسين كيناز 3 متعلق بـ fms (FLT3L). على نحو مفيد، واحد أو أكثر من هذه المجموعة من البروتينات التي يتم التعبير عنها من خلال الفيروس، على وجه التحديد كبروتين حر مفرز من خلية سرطانية، مناسبًا على وجه التحديد لحث الاستجابة المناعية في جسم الكائن الحي للخلية السرطانية.

في أحد تجسيدات يمكن أن يكون جين ناقل إضافي يشفِّر كيموكين، مختار من مجموعة تشتمل على MIP1-ألفا، IL-8، CCL5، CCL17، CCL20، CCL22، CXCL9، CXCL10، CXCL11، CXCL13، CXCL12، CCL2، CCL19 و CCL21. على نحو مفيد، يتم التعبير عن واحد أو أكثر من هذه المجموعة من البروتينات من خلال الفيروس كبروتين حر يمكن يفرز من الخلية السرطانية مناسبًا على وجه التحديد لجذب خلايا المناعة وحث الاستجابة المناعية للخلية السرطانية في جسم الكائن الحي.

في أحد التجسيدات بالإضافة إلى البروتين B7 على الأقل أو شظية نشطة منه يتم التعبير عنها على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى، يتم التعبير عن واحد أو أكثر من الجزيئات أيضًا على السطح و/أو إفرازه.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وجسم مضاد لـ CD3 (جزيء مساعد) أو شظية ربط جسم مضاد (مثل scFv) أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية، على وجه التحديد حيث يتم التعبير عن البروتينات كبروتينات فردية على سطح الخلية.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وجسم مضاد لـ VEGF (جزيء مضاد) أو شظية ربط منه أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية أو للإطلاق من الخلية السرطانية، على سبيل المثال من خلال الإفراز أو بعد تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وجسم مضاد، شظية جسم مضاد أو مركب ترابطي للبروتين يربط CD3، CD28، CD80، CD86، 4-1BB، GITR، OX40، CD27، CD40 أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية أو للإطلاق من الخلية السرطانية، على سبيل المثال من خلال الإفراز أو الإطلاق بعد تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وسيتوكين مختار من IL-2، IFN-ألفا، IFN-بيتا، IFN-جاما، GM-CSF، IL-15، IL-12، وFLT3L، على سبيل

المثال للإطلاق من الخلية السرطانية، على وجه التحديد من خلال الإفراز أو الإطلاق بعد الخلية تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وكيموكين مختار من MIP1-ألفا، IL-8، CCL5، CCL17، CCL20، CCL22، CXCL9، CXCL10، CXCL11، CXCL13، CXCL12، CCL2، CCL19، CCL21، على سبيل المثال للإطلاق من الخلية السرطانية، على وجه التحديد من خلال الإفراز أو الإطلاق بعد الخلية تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وجسم مضاد لـ CD3 (جزيء مساعد) أو شظية ربط جسم مضاد (مثل scFv) أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية (على وجه التحديد حيث يتم التعبير عن البروتينات كبروتينات فردية على سطح الخلية) ويشفِّر كذلك سيتوكين أو كيموكين مختار من IL-2، IFN-ألفا، IFN-جاما، GM-CSF، IL-15، IL-12، FLT3L، MIP1-ألفا، IL-8، CCL5، CCL17، CCL20، CCL22، CXCL9، CXCL10، CXCL11، CXCL13، CXCL12، CCL2، CCL19، CCL21 على سبيل المثال للإطلاق من الخلية السرطانية، على وجه التحديد من خلال الإفراز أو بعد الخلية تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وجسم مضاد لـ CD3 (جزيء مساعد) أو شظية جسم مضاد (مثل scFv) أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية (على وجه التحديد حيث يتم التعبير عن البروتينات كبروتينات فردية على سطح الخلية) ويشفِّر كذلك الجسم المضاد، شظية جسم مضاد أو مركب ترابطي للبروتين يربط CD28، CD80، CD86، 4-1BB، GITR، OX40، CD27، CD40 أو جسم مضاد لـ VEGF (جزيء مضاد) أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية أو للإطلاق من الخلية السرطانية، على سبيل المثال من خلال الإفراز أو الإطلاق بعد تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى واثنين من السيتوكينات أو الكيموكينات المختلفة المختارة من IL-2، IFNα، IFNβ، IFN□، GM-CSF، IL-15، وIL-12، FLT3L، MIP1α، IL-8، CCL5، CCL17، CCL20، CCL22، CXCL9، CXCL10، CXCL11، CXCL13، CXCL12، CCL2، CCL19، CCL21، على سبيل المثال للإطلاق من الخلية السرطانية، على وجه التحديد من خلال الإفراز بعد الخلية تحلل/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

بالتالي في أحد تجسيدات يشفِّر الفيروس B7-1، B7-2 أو شظية نشطة من أي مما سبق أو توليفة مما سبق للتعبير على سطح الخلية السرطانية المصابة بعدوى وجسم مضاد لـ CD3 (جزيء مساعد) أو شظية ربط جسم مضاد (مثل scFv) أيضًا للتعبير على سطح الخلية السرطانية (على وجه التحديد حيث يتم التعبير عن البروتينات كبروتينات فردية على سطح الخلية) ويشفِّر كذلك سيتوكين مختار على حدة من IL-2، IFNα، IFN□، GM-CSF، IL-15، وIL-12، و/أو كيموكين مختار من RANTES (CCL5)، MIP1α (الصور المتشاكلة LD78α (CCL3) أو LD78β (CCL3L1))، MIP1β الذي يمكن إطلاقه من الخلية السرطانية، على وجه التحديد من خلال الإفراز قبل والإطلاق بعد تحلل الخلية/ موت الخلية السرطانية المصابة بعدوى.

في أحد التجسيدات التي يمكن دمجها على وجه التحديد مع أي من التجسيدات أعلاه يشفِّر الفيروس كذلك جسم مضاد لـ PD-1 (جزيء مضاد).

في أحد التجسيدات يمكن أن يشتمل البروتين أو البروتينات المشفَّرة في مجموعة الجينات الناقلة للتعبير على غشاء الخلية أيضًا على جزيء رابط للببتيد أو جزيء مباعد بين النطاق العابر للأغشية ونطاق ربط المركب الترابطي خارج الخلايا. يمكن أن تضفي هذه الجزيئات الرابطة أو الجزيئات المباعدة مرونة على البروتين الذي يتم التعبير عنه على سطح الخلية مما يحسن قدرة البروتين على التفاعل مع الجزيء المستهدف الخاص به، على سبيل المثال على خلية مجاورة. يمكن تصميم هذه الجزيئات الرابطة أو الجزيئات المباعدة أيضًا أو اختيارها لتعزيز ديمرة أو تلمرة البروتينات عند سطح الخلية، عن طريق تكوين رابطة داي سلفيد أو تفاعلات البروتين-البروتين.

على سبيل المثال يمكن استخدام المناطق المفصلية من جزيئات الجلوبولين المناعي أو CD8 لتحسين كل من المرونة والديمرة

في أحد التجسيدات يمكن أن يشتمل البروتين أو البروتينات المشفَّرة في مجموعة الجينات الناقلة أيضًا على علامة ببتيد. يمكن أن تتضمن علامة الببتيد c-myc، بولي هستيدين، العلامات V5 أو FLAG ويمكن أن توجد على الطرف N أو الطرف C من البولي ببتيد، إما داخل الخلايا أو خارج الخلايا، أو يمكن تشفيرها في البروتين على سبيل المثال في حلقة خارج الخلايا أو بين النطاق العابر للأغشية والنطاق خارج الخلايا. يمكن استخدام علامات الببتيد كجزيئات مباعدة أو جزيئات رابطة بين نطاقات بروتين مختلفة، على سبيل المثال النطاق العابر للأغشية والنطاق خارج الخلايا، ويمكن استخدامها للكشف عن أو تنقية أو الكشف عن البروتين، أو الخلايا التي تعبر عن البروتين.

في أحد التجسيدات يكون واحد أو أكثر من الجينات الناقلة الإضافية (غير الجين الذي يشفِّر البروتين B7 أو شظية مما سبق) تحت تحكم معزز خارجي المنشأ أو داخلي المنشأ، على سبيل المثال معزز داخلي المنشأ. في أحد التجسيدات يكون جين ناقل في منطقة E3 (B2) تحت تحكم معزز خارجي المنشأ.

في أحد التجسيدات يكون واحد أو أكثر من جينات الجينات الناقلة الإضافية بين منطقة E3 وL5 الليفية في جينوم الفيروس الغدي، على سبيل المثال عند موضع BX في بنية الصيغة (I)، على وجه التحديد تحت تحكم معزز خارجي المنشأ. بالتالي في أحد التجسيدات يكون جين ناقل في BX تحت تحكم معزز خارجي المنشأ.

في أحد التجسيدات يكون واحد أو أكثر من جينات الجينات الناقلة الإضافية بين المنطقة E4 وL5 الليفية في جينوم الفيروس الغدي، على سبيل المثال عند موضع BY في بنية الصيغة (I) أو (Ia)، على وجه التحديد تحت تحكم معزز داخلي المنشأ، مثل المعزز المتأخر الرئيسي. يمكن أن يكون ذلك بالإضافة إلى البروتين B7 أو شظية نشطة منه مشفَّرة في المنطقة BY.

في أحد التجسيدات يتم توفير تركيبة تشتمل على فيروس غدي حال للورم وفقًا للكشف الحالي، على سبيل المثال تركيبة صيدلية، تشتمل على وجه التحديد على سواغ مقبول صيدليًا، مثل عامل مخفف أو عامل حامل.

في أحد التجسيدات يتم توفير فيروس غدي حال للورم وفقًا للكشف الحالي أو تركيبة تشتمل عليه، للاستخدام في علاج، على وجه التحديد للاستخدام في علاج سرطان.

في أحد التجسيدات يتم توفير طريقة لعلاج مريض في حاجة لذلك تشتمل على إعطاء كمية فعالة علاجيًا من فيروس حال للورم وفقًا للكشف الحالي أو تركيبة، مثل تركيبة صيدلية تشتمل عليه.

في أحد التجسيدات يتم توفير استخدام فيروس غدي حال للورم وفقًا للكشف الحالي أو تركيبة تشتمل عليه لتصنيع دواء لعلاج سرطان، على وجه التحديد أنواع سرطانة، على سبيل المثال سرطان القولون والمستقيم، سرطان الرئة، سرطان المثانة، سرطان الكلى، سرطان البنكرياس، سرطان الكبد، سرطان الرأس والعنق، سرطان الثدي أو سرطان المبيض.

في أحد التجسيدات يتم توفير بولي نيوكليوتيد يشتمل على متوالية جينومية من 50% على الأقل من فيروس وفقًا للكشف الحالي (على سبيل المثال 55، 60، 65، 70، 75، 80، 85، 90، 91، 92، 93، 94، 95، 96، 97، 98، 99 أو 100%) ويشتمل على متوالية تشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه، على سبيل المثال بروتين B7 الذي تم الكشف عنه هنا، مثل B7-1 أو شظية نشطة منه. في أحد التجسيدات تكون متوالية البولي نيوكليوتيد في صورة بلازميد.

في أحد التجسيدات يتم توفير خلية عائلة، على سبيل المثال خلية ثديية، مثل خلية HEK293 أو مشتق مما سبق، تشتمل على فيروس حال للورم وفقًا للكشف الحالي أو متوالية بولي نيوكليوتيد وفقًا للكشف الحالي.

في أحد التجسيدات يتم توفير عملية لتحضير فيروس غدي حال للورم وفقًا للكشف الحالي تشتمل على خطوة إدخال بولي نيوكليوتيد يشفِّر البروتين B7 أو شظية نشطة منه في فيروس غدي حال للورم.

في أحد التجسيدات يتم توفير عملية لاستنساخ فيروس وفقًا للكشف الحالي تشتمل على خطوة زراعة الخلايا العائلة في وجود الفيروس في ظروف مناسبة للاستنساخ. بصفة عامة سوف تشتمل الطريقة على خطوة أخرى تتمثل في حصاد الفيروس، على سبيل المثال من المادة الطافية من المزرعة أو بعد تحلل الخلايا العائلة.

التعريفات

يشير الفيروس الحال للورم الذي يتسم بانتقائية تجاه الخلايا السرطانية مثلما هو مستخدم هنا إلى فيروس يقتل على نحو مفضل الخلايا السرطانية، على سبيل المثال لأنه على نحو مفضل يصيب الخلايا السرطانية بالعدوى و/أو تعتمد دورة حياة الفيروس على جين، مثل p53 يتم إضعافه فسيولوجيًا، على سبيل المثال بتعبير فائق عنه في الخلايا السرطانية. في أحد التجسيدات يصيب الفيروس الحال للورم على نحو مفضل الخلايا السرطانية بالعدوى ويستمر في استنساخ جينومه وإنتتج البروتينات الغلافية لإنتاج جسيمات فيروس جديدة، على سبيل المثال حسب EnAd.

يمكن اختبار انتقائية الخلايا السرطانية (المؤشر العلاجي) مثلما هو موصوف في الطلب الدولي رقم 2005/118825 المدرج هنا كمرجع.

يشير الجين الناقل مثلما هو مستخدم هنا إلى جين تم إدخاله في متوالية الجينوم للفيروس الغدي، حيث لا يكون الجين فطريًا بالنسبة إلى الفيروس (خارجي المنشأ) أو لا يوجد عادة في هذا المكان المحدد في الفيروس. يتم توضيح الأمثلة على الجينات الناقلة هنا. يتضمن الجين الناقل مثلما هو مستخدم هنا أيضًا شظية وظيفية للجين التي تكون جزءًا من الجين الذي عند إدخاله يكون مناسبًا لإجراء وظيفة أو معظم وظيفة الجين تام الطول، على سبيل المثال 50% من الوظيفة أو أكثر.

يتم استخدام الجين الناقل ومتوالية التشفير على نحو تبادلي هنا في سياق الإدخالات في الجينوم الفيروسي، ما لم يحدد السياق خلاف ذلك. تعني متوالية التشفير مثلما هو مستخدم هنا، على سبيل المثال متوالية DNA تشفِّر RNA، ببتيد، بولي ببتيد أو بروتين وظيفي. نمطيًا تكون متوالية التشفير عبارة عن cDNA للجين الناقل تشفِّر RNA، ببتيد، بولي ببتيد أو بروتين وظيفي محل اهتمام. يتم وصف RNA، الببتيدات، البولي ببتيدات والبروتينات الوظيفية محل اهتمام أدناه.

في أحد التجسيدات يشير الجين الناقل مثلما هو مستخدم هنا إلى مقطع من DNA يحتوي على جين أو متوالية cDNA تم عزلها من أحد الكائنات الحية ويتم إدخالها في كائن حي مختلف أي الفيروس وفقًا للكشف الحالي. في أحد التجسيدات سوف يحتفظ هذا المقطع غير الفطري من DNA بصفة عامة بالقدرة على إنتاج RNA، ببتيد، بولي ببتيد أو بروتين وظيفي. يمكن أن تشفِّر الجينات الناقلة المستخدمة على سبيل المثال بروتينات فردية أو شظية نشطة مما سبق، بروتين خيمري أو بروتين دمج.

من الواضح أن جينوم الفيروس يحتوي على متواليات تشفير DNA. لا تعتبر الجينات داخلية المنشأ (جينات طبيعية) في المتوالية الجينومية للفيروس جينات ناقلة، في سياق المواصفة الحالية ما لم يتم تعديلها من خلال تقنيات ناتجة عن عودة الارتباط الجيني مثل وجودها في مكان غير طبيعي أو في بيئة غير طبيعية.

بالتالي في أحد التجسيدات يشفِّر الجين الناقل الذي يتم إدخاله بروتين، بولي ببتيد أو ببتيد بشري أو متوافق مع البشر.

في أحد التجسيدات يشتمل الجين الناقل على متوالية DNA تشفِّر بروتين B7 أو شظية نشطة منه. يوفر الكشف الحالي إمكانية توفير البروتين B7 أو شظية نشطة منه في واحد أو أكثر من الأنساق المختارة على حدة من بروتين دمج، بروتين B7 بسيط أو شظية نشطة منه.

يشير البروتين B7 البسيط أو شظية نشطة منه مثلما هو مستخدم هنا إلى بروتينات تكون بشكل أساسي عبارة عن بروتينات من النوع غير المعالج، على سبيل المثال التي لا تكون جزءًا من بروتين دمج والتي لها متوالية مطابقة أو مشابهة للبروتين المعروف ذي الصلة، على وجه التحديد البروتين البشري المعروف. يتضمن الجين البسيط أيضًا حيث يتم استبدال 10% من الأحماض الأمينية أو حذفها على مجمل طول البروتين ذي الصلة.

يشير جزيء تثبيت GPI مثلما هو مستخدم هنا إلى شحم سكري يمكن ربطه بالطرف C من بروتين أثناء تعديل الوراثية. ويتكون من مجموعة فوسفاتيديلينوزيتول مرتبطة عبر عامل ربط محتوي على كربوهيدرات (جلوكوزمين ومانوز مرتبط عن طريق جليكوزيد بوحدة بنائية من أينوزيتول) وعن طريق قنطرة من إيثانول أمين فوسفات (EtNP) إلى الحمض الأميني عند الطرف

C بروتين ناضج. اثنين من الأحماض الدهنية في مجموعة فوسفاتيديل-أينوزيتول غير آلفة للماء تثبت للبروتين بغشاء الخلية.

تحتوي البروتينات المعالجة بجليكوفوسفاتيديلينوزيتول (مرتبطة بـ GPI) بصفة عامة على إشارة ببتيد، بالتالي يتم توجيهها إلى الشبكة البلازمية الداخلية (ER). يتكون الطرف C من أحماض أمينية غير آلفة للماء تظل داخل الغشاء ER. يتم عندئذٍ شطر الطرف غير الآلف للماء واستبدالها بجزيء مثبت لـ GPI. بينما يستمر تقدم البروتين عبر المسار الإفرازي، يتم نقله عن طريق الحويصلات إلى الجهاز Golgi وأخيرًا إلى الحيز خارج الخلايا حيث يبقى مرتبطًا بوريقة خارجية من غشاء الخلية. حيث أن المعالجة بجليكوفوسفاتيديلينوزيتول هي الطريقة الوحيدة لربط هذه البروتينات بالغشاء، سوف ينتج عن انشطار المجموعة من خلال إنزيمات فسفوليباز إطلاق مقنن للبروتين من الغشاء. يتم استخدام الآلية الأخيرة في المعمل؛ أي، البروتينات الغشائية التي يتم إطلاقها من الأغشية في الاختبار الإنزيمي هي بروتين معالج بجليكوفوسفاتيديلينوزيتول.

فسفوليباز C (PLC) هو إنزيم يعرف بأنه يشطر رابطة فسفو-جليسرول موجودة في بروتينات مثبتة بـ GPI. سوف تسبب المعالجة بـ PLC إطلاق بروتينات مرتبطة بـ GPI من الغشاء الخارجي للخلية. المرقم Thy-1للخلية التائية وأسيتيل كاولينستيراز، بالإضافة إلى ذلك من المعروف أن كل من إنزيمات فوسفتاز المعوية والمشيمية القلوية، ترتبط بـ GPI ويتم إطلاقها من خلال المعالجة بـ PLC. يعتقد أن البروتينات مرتبطة بـ GPI موجودة على نحو مفضل في النطاقات الشحمية المجهرية، مما يقترح مستوى عالي من التنظيم في النطاقات المجهرية للغشاء البلازمي.

يتوفر استعراض لجزيئات تثبيت GPIs كتبه Ferguson، Kinoshita و Hart في الفصل 11 من Essentials of Glycobiology 2nd Edition.

الفيروسات

يشير يقوم بالنسخ في سياق المواصفة الحالية إلى فيروس يتسم بجميع الآليات الضرورية للاستنساخ في الخلايا وفي المعمل وفي جسم الكائن الحي، أي دون مساعدة سلالة خلايا للتغليف.

لا يكون ناقل فيروسي، على سبيل المثال تم حذفه في المنطقة E1A على الأقل، قادر على الانتساخ في سلالة خلايا تغليفية تكميلية فيروس يقوم بالنسخ في السياق الحالي.

يكون ناقل فيروسي عبارة عن فيروس عاجز عن الاستنساخ، يتطلب سلالة خلايا للتغليف (تشتمل على جين ناقل) للاستنساخ.

يشير فيروس قادر على الاستنساخ مثلما هو مستخدم هنا إلى فيروس يقوم بالنسخ أو فيروس يعتمد استنساخه على عامل في الخلايا السرطانية، على سبيل المثال عامل تمت زيادته بشكل مقنن، مثل p53 أو ما شابه.

في أحد التجسيدات يكون الفيروس الغدي عبارة عن فيروس غدي بشري. يشير "الفيروس الغدي"، "النوع المصلي" أو النوع المصلي الفيروسي الغدي" مثلما هو مستخدم هنا إلى أي فيروس غدي يمكن تخصيصه لأي مما يزيد عن 50 من الأنواع المصلية الفيروسية الغدية المعروفة حاليًا، التي يتم تصنيفها إلى مجموعات فرعية أ–و، ويمتج كذلك إلى أي، أنواع مصلية فيروسية غدية غير محددة أو غير مصنفة حتى الأن. انظر، على سبيل المثال، Strauss، " Adenovirus infections in humans "، في The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451–596 (1984) and Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," in Fields Virology, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265–2267 (2001)، مثلما هو موضح في الجدول 1.

المجموعة الفرعية	النوع المصلي الفيروسي الغدي
أ	12، 18، 31
ب	3، 7، 11، 14، 16، 21، 34، 35،51
ج	1، 2، 5، 6

د	8-10، 13، 15، 17، 19، 20، 22-30، 32، 33،36-39،42-49، 50
هـ	4
و	40،41

يتم تجميع الفيروسات الغدية في مجموعات بناءً على الغلاف الفيروسي الخاص بها.

في أحد التجسيدات يكون الفيروس الغدي عبارة عن مجموعة فرعية "ب"، على سبيل المثال مختارة على حدة من مجموعة تشتمل على أو تتكون من: Ad3، Ad7، Ad11، Ad14، Ad16، Ad21، Ad34 و Ad51، مثل Ad11، على وجه التحديد Ad11p (السلالة Slobitski). في أحد التجسيدات يكون للفيروس الغدي للاختراع غلاف فيروسي، مثل هكسون و/أو ألياف فيروس غدي فرعي من المجموعة "ب"، مثل Ad11، على وجه التحديد Ad11p. في أحد التجسيدات الفيروس الغدي هو Ad11 أو له ألياف و/أو هكسون و/أو بنتون من Ad11، مثل Ad11p.

في أحد التجسيدات لا يكون الفيروس وفقًا للكشف الحالي عبارة عن فيروس من المجموعة "أ".

في أحد التجسيدات لا يشتمل الفيروس وفقًا للكشف الحالي على بروتين موت غدي (ADP).

في أحد التجسيدات لا يكون الفيروس وفقًا للكشف الحالي عبارة عن فيروس من المجموعة "ج".

في أحد التجسيدات لا يشتمل الفيروس وفقًا للكشف الحالي على المزيد وشظية من جزء من الفيروس Ad5.

يكون Enadenotucirev (EnAd) عبارة عن فيروس غدي خيمري حال للورم، عرف سابقًا باسم ColoAd1 (الطلب الدولي رقم 2005/118825)، بألياف، بنتون وهكسون من Ad11p، بالتالي يكون عبارة عن فيروس من المجموعة الفرعية "ب". ويكون به منطقة E2B خيمرية، تشتمل على DNA من Ad11p و Ad3. تقريبًا يتم حذف جميع المناطق E3 وجزء من المنطقة E4 في EnAd. بالتالي، يكون به حيز كبير في الجينوم لاستيعاب مادة وراثية إضافية أثناء البقاء قابلًا للحياة. علاوة على ذلك، لأن EnAd عبارة عن فيروس غدي فرعي من المجموعة "ب"، تكون

المناعة الموجودة سابقًا في البشر أقل شيوعًا من، على سبيل المثال، Ad5. الأمثلة الأخرى على الفيروسات الخيمرية الحالة للورم التي بها ألياف، بنتون وهكسون Ad11 تتضمن OvAd1 وOvAd2 (انظر الطلب الدولي رقم 2006/060314).

يبدو أن EnAd على نحو مفضل يصيب خلايا الورم بالعدوى، ينتسخ سريعًا في هذه الخلايا ويسبب تحلل الخلية. وهذا، بدوره، يمكن أن ينتج استجابات مناعية التهابية مما يحث الجسم على محاربة السرطان أيضًا. يفترض أن جزء من نجاح EnAd يتعلق بالاستنساخ السريع للفيروس في جسم الكائن الحي.

على نحو هام، تم توضيح أكلينيكيًا أنه يمكن إعطاء EnAd في أجهزة الجسم (على سبيل المثال من خلال الحقن أو التسريب داخل الوريد أو داخل الصفاق) ثم بعد ذلك انتقائيًا تصيب بالعدوى وتعبر عن البروتينات في خلايا الورم. تجعل هذه السمة لـ EnAd، التي يمكن مشاركتها من خلال Ad11p وفيروسات غدية أخرى من المجموعة "ب" على وجه التحديد تلك التي تعبر عن البروتينات الغلافية لـ Ad11p (مثل تلك الموصوفة هنا)، من الممكن التعبير عن البروتينات على سطح الخلايا السرطانية دون الحاجة إلى الحقن المباشر للجينات الناقلة في الورم، الذي يكون غير ممكن للعديد من أنواع السرطان.

أثناء حل EnAd انتقائيًا لخلايا الورم، من الممكن إدخال المزيد من السمات المفيدة، على سبيل المثال زيادة النشاط العلاجي للفيروس أو تقليل الآثار الجانبية للفيروس من خلال حراسته بالجينات الناقلة، مثل جين ناقل يشفِّر بروتين لإرسال إشارات الخلايا أو جسم مضاد، أو جين ناقل يشفِّر كيان يحث بروتين (بروتينات) لإرسال إشارات الخلايا.

على نحو مفيد يمكن أن تمكن حراسة فيروس، بـ DNA يشفِّر بروتينات معينة يمكن التعبير عنها داخل الخلية السرطانية، من استخدام دفاعات الجسم لدمج خلايا الورم بشكل أكثر فاعلية، على سبيل المثال من خلال جعل الخلايا مرئية بصورة أكبر للجهاز المناعي أو من خلال توصيل لجين/بروتين علاجي على نحو مفضل إلى خلايا الورم المستهدفة.

في أحد التجسيدات يحث الفيروس الغدي الحال للورم وفقًا للكشف الحالي الجهاز المناعي للمريض ليقاوم الورم، على سبيل المثال من خلال تقليل قدرة أنواع السرطان على كبت الاستجابات المناعية.

في أحد التجسيدات يكون بالفيروس الحال للورم بروتينات ألياف، هكسون وبنتون من نفس النوع المصلي، على سبيل المثال Ad11، على وجه التحديد Ad11p، على سبيل المثال توجد عند المواضع 30812-31789، 18254-21100 و13682-15367 من المتوالية الجينومية للأخير حيث تكون مواضع النيوكليوتيد نسبة إلى هوية Genbank رقم 217307399 (رقم الوصول: GC689208).

في أحد التجسيدات يكون الفيروس الغدي هو enadenotucirev (المعروف أيضًا باسم EnAd وسابقًا باسم ColoAd1). يشير Enadenotucirev مثلما هو مستخدم هنا إلى فيروس خيمري غدي له المتوالية رقم: 21. ويكون فيروس خيمري غدي حال للورم يقوم بالنسخ يتسم بسمات علاجية محسنة مقارنة بالفيروسات الغدية من النوع غير المعالج (انظر الطلب الدولي رقم 2005/118825). يكونEnAd منطقة E2B خيمرية، تحدد سمات DNA من Ad11p و Ad3، والحذوفات في E4/E3. ينتج عن التغيرات البنائية في enadenotucirev جينوم يكون أصغر بتقريبًا 3.5 كيلو قاعدة من Ad11p مما يوفر "حيز" إضافي لإدخال الجينات الناقلة.

يمكن أن تشتمل جزيئات الجسم المضاد مثلما هو مستخدم على جزيء جسم مضاد تام به سلاسل ثقيلة وخفيفة تامة الطول، نسق جسم مضاد ثنائي النوعية يشتمل على أجسام مضادة تامة الطول أو شظية من أي مما سبق تتضمن، لكن لا تقتصر على Fab، Fab معدلة، Fab'، Fab' معدلة، F(ab')2، Fv، أجسام مضادة أحادية النطاق (على سبيل المثال VH أو VL أو VHH)، scFv، أجسام مضادة ثنائية، ثلاثية أو رباعية التكافؤ، بيس-scFv، أجسام ثنائية، أجسام ثلاثية، أجسام رباعية وشظايا ربط قمة لاصقة من أي مما ذكر أعلاه (انظر على سبيل المثال Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). تكون طرق تشكيل وتصنيع شظايا الجسم المضاد هذه معروفة جيدًا في المجال (انظر على سبيل المثال Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). تتضمن

شظايا جسم مضاد أخرى للاستخدام في الاختراع الحالي شظايا Fab و Fab' الموصوفة في طلبات براءات الاختراع الدولية أرقام 2005/003169 ، 2005/003170 و 2005/003171. يمكن أن تشتمل الأجسام المضادة متعددة التكافؤ على العديد من درجات النوعية على سبيل المثال ثنائية النوعية أو يمكن أن تكون أحادية النوعية (انظر على سبيل المثال الطلب الدولي رقم 92/22853 ، الطلب الدولي رقم 05/113605 ، الطلب الدولي رقم 2009/040562 والطلب الدولي 2010/035012).

يشير الجسم المضاد مثلما هو مستخدم هنا، ما لم يحدد السياق خلاف ذلك إلى جسم مضاد تام الطول.

تشير شظايا ربط الجسم المضاد إلى شظية تشتمل على نطاقات ربط، مثل VH و/أو VL الذي يحتفظ بنوعية تجاه مولد الضد المستهدف التي ترتبط به وعلى سبيل المثال Fab، Fab معدلة، Fab'، Fab' معدلة، F(ab')2، Fv، أجسام مضادة أحادية النطاق (على سبيل المثال VH أو VL أو VHH)، scFv، أجسام مضادة ثنائية، ثلاثية أو رباعية التكافؤ، بيس-scFv، أجسام ثنائية، أجسام ثلاثية، أجسام رباعية وشظايا ربط قمة لاصقة من أي منها.

الجزيئات الرابطة

تتضمن الجزيئات الرابطة المناسبة للاستخدام في بروتينات الدمج وفقًا للكشف الحالي:

الجدول 2. المتواليات الرابطة المفصلية

المتوالية رقم:	المتوالية
26	DKTHTCAA
27	DKTHTCPPCPA
28	DKTHTCPPCPATCPPCPA
29	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA

30	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
31	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
32	DKTHTCCVECPPCPA
33	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
34	DKTHTCPSCPA

الجدول 3. المتواليات الرابطة المرنة

المتوالية رقم:	المتوالية
35	SGGGGSE
36	DKTHTS
37	(S)GGGGS
38	(S)GGGGSGGGGS
39	(S)GGGGSGGGGSGGGGS
40	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
41	(S)GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
42	AAAGSG-GASAS
43	AAAGSG-XGGGS-GASAS
44	AAAGSG-XGGGSXGGGS –GASAS
45	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS –GASAS

AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS	46
AAAGSG-XS-GASAS	47
PGGNRGTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY	48
ATTTGSSPGPT	49
ATTTGS	50
GS	-
EPSGPISTINSPPSKESHKSP	51
GTVAAPSVFIFPPSD	52
GGGGIAPSMVGGGGS	53
GGGGKVEGAGGGGGS	54
GGGGSMKSHDGGGGS	55
GGGGNLITIVGGGGS	56
GGGGVVPSLPGGGGS	57
GGEKSIPGGGGS	58
RPLSYRPPFPFGFPSVRP	59
YPRSIYIRRRHPSPSLTT	60
TPSHLSHILPSFGLPTFN	61
RPVSPFTFPRLSNSWLPA	62

63	SPAAHFPRSIPRPGPIRT
64	APGPSAPSHRSLPSRAFG
65	PRNSIHFLHPLLVAPLGA
66	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
67	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
68	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
69	LPWRTSLLPSLPLRRRP
70	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
71	VPPAPVVSLRSAHARPPY
72	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
73	PNVAHVLPLLTVPWDNLR
74	CNPLLPLCARSPAVRTFP

(S) يكون اختياري في المتواليات 37 إلى 41،

تتضمن الأمثلة على الجزيئات الرابطة الصلبة متواليات الببتيد GAPAPAAPAPA (المتوالية رقم: 75)، PPPP (المتوالية رقم: 76) وPPP.

يتم توضيح جزيئات رابطة أخرى في الجدول 4:

المتوالية رقم:	المتوالية
77	DLCLRDWGCLW
78	DICLPRWGCLW

79	MEDICLPRWGCLWGD
80	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
81	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
82	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
83	EDICLPRWGCLWEDD
84	RLMEDICLPRWGCLWEDD
85	MEDICLPRWGCLWEDD
86	MEDICLPRWGCLWED
87	RLMEDICLARWGCLWEDD
88	EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
89	RAPESFVCYWETICFERSEQ
90	EMCYFPGICWM

التعريفات ذات الصلة بالصيغة (I) و(Ia)

يشير رابطة إلى رابطة ثنائية التكافؤ تربط متوالية DNA واحدة بمتوالية DNA أخرى، على سبيل المثال تربط قسم واحد من جينوم الفيروس بآخر. بالتالي عندما تمثل صورة متغيرة في الصيغة (I) و(Ia) هنا رابطة يكون السمة أو العنصر الممثل من خلال الرابطة غائبًا أي يتم حذفه.

حيث أن بنية الفيروسات الغدية متشابهة، بصفة عامة، تتم مناقشة العناصر أدناه من حيث العناصر البنائية والتسمية المستخدمة عادة للإشارة إليها، والتي تكون معروفة لصاحب المهارة في المجال. عندما تتم الإشارة إلى العنصر هنا ثم نشير إلى متوالية DNA التي تشفِّر العنصر أو متوالية DNA التي تشفِّر نفس البروتين البنائي للعنصر في الفيروس الغدي. يتصل الأخير بسبب

تكرار كود DNA. يمكن أخذ تفضيل الفيروسات لاستخدام النسخة في الاعتبار للحصول على نتائج محسنة.

يمكن أن يشتمل أي عنصر بنائي من الفيروس الغدي المستخدم في الفيروسات وفقًا للكشف الحالي على أو يتكون من متوالية طبيعية أو يمكن أن به تشابه عبر طول محدد يبلغ 95% على الأقل، مثل 96%، 97%، 98%، 99% أو 100%. يمكن تعديل المتوالية الأصلية لحذف 10%، 9%، 8%، 7%، 6%، 5%، 4%، 3%، 2% أو 1% من المادة الوراثية. يدرك صاحب المهارة في الفن أنه عند إجراء تغييرات لا يجب مقاطعة إطارات القراءة للفيروس بحيث تتم مقاطعة التعبير عن البروتينات البنائية.

في أحد التجسيدات يكون العنصر المحدد عبارة عن متوالية تامة الطول أي جين تام الطول. يشير الجين تام الطول مثلما هو مستخدم هنا إلى على الأقل مجمل متوالية تشفير الجين، لكن يمكن أن يتضمن أي مناطق غير مشفِّرة ذات صلة، على وجه الخصوص إن كانت ذات صلة بوظيفة الجين.

في أحد التجسيدات يكون العنصر المحدد أقل من الطول التام ويحتفظ بنفس الوظيفة أو وظيفة مناظرة كمتوالية تامة الطول.

في أحد التجسيدات يكون العنصر المحدد اختياريًا في البنيات وفقًا للكشف الحالي، يمكن أن تكون متوالية DNA أقل من الطول التام ولا يتسم بأي وظيفية، على سبيل المثال يمكن حذف المنطقة E3 كليًا أو جزئيًا. ومع ذلك، يمكن أن يكون من المفيد حذف بشكل أساسي كل المنطقة E3 حيث أن ذلك يحسن من الحيز المتاح لإدخال الجينات الناقلة.

ترتبط الجينات البنائية التي تشفِّر البروتينات البنائية أو الوظيفية للفيروس الغدي بصفة عامة من خلال المناطق غير المُشفِّرة من DNA. بالتالي يوجد بعض المرونة حول مكان "قطع" المتوالية الجينومية للعنصر البنائي محل الاهتمام (على وجه الخصوص المناطق غير المُشفِّرة مما سبق) بغرض إدخال جين ناقل في الفيروسات وفقًا للكشف الحالي. بالتالي لأغراض المواصفة الحالية، سوف يعتبر العنصر عنصرًا بنائيًا مرجعيًا إلى الحد حيث يوائم للغرض ولا يشفر مادة خارجية.

بالتالي، إن كان ملائمًا سوف يتصل الجين بالمناطق غير المُشفِّرة المناسبة، على سبيل المثال مثلما يوجد في البنية الطبيعية للفيروس.

بالتالي في أحد التجسيدات يتم إدخال وليجة، مثل DNA يشفِّر موقع تقييد و/أو جين ناقل، في منطقة غير مشفِّرة من DNA الفيروس الجينومي، مثل متوالية إنترون أو بين الجينات. وعلى ذلك يمكن أن يكون لبعض المناطق غير المُشفِّرة للفيروس الغدي وظيفة، على سبيل المثال في تكوين جدل بديل، تنظيم النسخ أو تنظيم الترجمة الوراثية، ويمكن أن يلزم وضع ذلك في الاعتبار.

تكون المواقع المحددة هنا، المتصلة بالمنطقة L5، مناسبة لاستيعاب مجموعة متنوعة من متواليات DNA التي تشفِّر كيانات معقدة مثل RNAi، السيتوكينات، البروتينات أحادية السلسلة أو متعددة الصيغة البنائية، مثل الأجسام المضادة.

يشير الجين مثلما هو مستخدم هنا إلى متواليات تشفير وأي متواليات غير مشفِّرة مرتبطة به، على سبيل المثال إنترونات وإكسونات ذات صلة. في أحد التجسيدات يشتمل الجين على أو يتكون فقط من مكونات بنائية أساسية، على سبيل المثال منطقة تشفير.

فيما يلي مناقشة تتعلق بعناصر بنائية خاصة بالفيروسات الغدية.

تكون متواليات التكرار معكوسة الطرف (ITR) شائعة بالنسبة إلى جميع الفيروسات الغدية المعروفة (المسماة هكذا بسبب تجانسها) وهي أصول كروموسومية فيروسية للاستنساخ. تتمثل سمة أخرى لهذه المتواليات في قدرتها على تشكيل بنية على شكل دبوس شعر.

يشير 5'ITR مثلما هو مستخدم هنا إلى جزء أو كل ITR من الطرف 5' من الفيروس الغدي، الذي يحتفظ بوظيفة ITR عند إدراجه في الفيروس الغدي في مكان ملائم. في أحد التجسيدات يشتمل 5'ITR على أو يتكون من متوالية من نحو 1 زوج قاعدة إلى 138 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21 أو متوالية مطابقة بنسبة 90، 95، 96، 97، 98 أو 99% لها بامتداد مجمل طول، على وجه التحديد المتوالية التي تتكون من نحو 1 زوج قاعدة إلى 138 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

يشير 3'ITR مثلما هو مستخدم هنا إلى جزء أو كل ITR من الطرف 3' من الفيروس الغدي الذي يحتفظ بوظيفة ITR عند إدراجه في الفيروس الغدي في مكان ملائم. في أحد التجسيدات يشتمل 3'ITR على أو يتكون من متوالية من نحو 32189 زوج قاعدة إلى 32326 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21 أو متوالية مطابقة بنسبة 90، 95، 96، 97، 98 أو 99% لها بامتداد مجمل طول، على وجه التحديد المتوالية التي تتكون من نحو 32189 زوج قاعدة إلى 32326 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

يشير B1 مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر: جزء أو كل E1A من الفيروس الغدي، جزء أو كل المنطقة E1B من الفيروس الغدي، وعلى حدة جزء أو كل E1A والمنطقة E1B من الفيروس الغدي.

عندما يكون B1 عبارة عن رابطة فعندئذٍ سوف يتم حذف المتواليات E1A وE1B من الفيروس. في أحد التجسيدات يكون B1 عبارة عن رابطة وبالتالي يكون الفيروس عبارة عن ناقل.

في أحد التجسيدات يشتمل B1 كذلك على جين ناقل. من المعروف في المجال أن المنطقة E1 يمكن أن تستوعب جين ناقل يمكن إدخاله بطريقة مضطربة في المنطقة E1 (أي في "وسط" المتوالية) أو يمكن حذف جزء أو كل المنطقة E1 لتوفير حيز أكبر لاستيعاب المادة الوراثية.

يشير E1A مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر جزء أو كل المنطقة E1A للفيروس الغدي. يشير الأخير هنا إلى البولي ببتيد/البروتين E1A. ويمكن تحويرها بحيث يكون بالبروتين المشفَّر بالجين E1 تغييرات محافظة أو غير محافظة بالحمض الأميني (على سبيل المثال 1، 2، 3، 4 أو 5 تغييرات بالحمض الأميني، إضافات و/أو حذوفات على مجمل طوله) بحيث يكون له: نفس وظيفة النوع غير المعالج (أي البروتين غير المحوَّر المناظر)؛ وظيفة زائدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج؛ وظيفة مخفضة، مثل لا وظيفة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج؛ أو يكون له وظيفة جديدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج أو توليفة مما سبق مثلما هو ملائم.

يشير E1B مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر جزء أو كل المنطقة E1B للفيروس الغدي (أي بولي ببتيد أو بروتين)، ويمكن تحويرها بحيث يكون بالبروتين المشفَّر من خلال الجين/المنطقة E1B تغييرات محافظة أو غير محافظة بالحمض الأميني (على سبيل المثال 1،

2، 3، 4 أو 5 تغييرات بالحمض الأميني، إضافات و/أو حذوفات على مجمل طوله) بحيث يكون له: نفس وظيفة النوع غير المعالج (أي البروتين غير المحوَّر المناظر)؛ وظيفة زائدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج؛ وظيفة مخفضة، مثل لا وظيفة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج؛ أو يكون له وظيفة جديدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج أو توليفة مما سبق مثلما هو ملائم.

بالتالي يمكن أن يكون B1 معدلًا أو غير معدل نسبة إلى منطقة E1 من النوع غير المعالج، مثل E1A و/أو E1B من النوع غير المعالج. يمكن أن يحدد صاحب المهارة في الفن بسهولة إذا ما كانت E1A و/أو E1B موجودة أو (جزء) تم حذفها أو تحويرها.

يشير النوع غير المعالج مثلما هو مستخدم هنا إلى فيروس غدي معروف أو متوالية من فيروس غدي معروف. يكون الفيروس الغدي المعروف عبارة عن فيروس تم تحديده وتسميته، بغض النظر عما إذا كانت معلومات المتوالية متاحة أم لا.

في أحد التجسيدات يكون لـ B1 متوالية من 139 زوج قاعدة إلى 3932 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

يشير B_A مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر المناطق E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 التي تتضمن أي متواليات غير مشفِّرة، مثلما هو ملائم (على وجه التحديد تناظر متوالية طبيعية للفيروس الغدي). بصفة عامة لن تشتمل هذه المتوالية على جين ناقل. في أحد التجسيدات تكون المتوالية مشابهة إلى حدٍ كبير أو مطابقة لمتوالية متماسة لفيروس غدي معروف، على سبيل المثال نوع مصلي موضح في الجدول 1، على وجه التحديد فيروس من المجموعة "ب"، على سبيل المثال Ad3، Ad7، Ad11، Ad14، Ad16، Ad21، Ad34، Ad35، Ad51 أو توليفة مما سبق، مثل Ad3، Ad11 أو توليفة مما سبق. في أحد التجسيدات يشير E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 إلى الاشتمال على هذه العناصر وعناصر بنائية أخرى متصلة بالمنطقة، على سبيل المثال سوف يتضمن BA بصفة عامة متوالية تشفِّر البروتين IV2A، على سبيل المثال كما يلي: IV2A IV2A-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

في أحد التجسيدات تكون المنطقة E2B خيمرية. أي، تشتمل على متواليات DNA من اثنين أو أكثر من الأنواع المصلية الفيروسية الغدية المختلفة، على سبيل المثال من Ad3 و Ad11، مثل Ad11p. في أحد التجسيدات يكون للمنطقة E2B متوالية من 5068 زوج قاعدة إلى 10355 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21 أو متوالية مطابقة بنسبة 95%، 96%، 97%، 98% أو 99% لها على مجمل طوله.

في أحد التجسيدات تشتمل E2B في المكون B_A على المتواليات الموضحة في المتوالية رقم: 22 (المناظرة للمتوالية رقم: 3 التي تم الكشف عنها في الطلب الدولي رقم 2005/118825).

في أحد التجسيدات يكون لـ B_A متوالية من 3933 زوج قاعدة إلى 27184 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

يشير E3 مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر جزء أو كل المنطقة E3 للفيروس الغدي (أي بروتين/بولي ببتيد)، ويمكن تحويرها بحيث يكون بالبروتين المشفَّر من خلال E3 الجين تغييرات محافظة أو غير محافظة بالحمض الأميني (على سبيل المثال 1، 2، 3، 4 أو 5 تغييرات بالحمض الأميني، إضافات و/أو حذوفات على مجمل طوله)، بحيث يكون له نفس وظيفة النوع غير المعالج (البروتين غير المحوَّر المناظر)؛ وظيفة زائدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج؛ وظيفة مخفضة، مثل لا وظيفة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج أو يكون له وظيفة جديدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج أو توليفة مما سبق، مثلما هو ملائم.

في أحد التجسيدات تكون المنطقة E3 من نوع مصلي للفيروس الغدي محدد في الجدول 1 أو توليفة مما سبق، على وجه التحديد نوع مصلي من المجموعة "ب"، على سبيل المثال Ad3، Ad7، Ad11 (على وجه التحديد Ad11p)، Ad14، Ad16، Ad21، Ad34، Ad35، Ad51 أو توليفة مما سبق، مثل Ad3، Ad11 (على وجه التحديد Ad11p) أو توليفة مما سبق. في أحد التجسيدات يكون للمنطقة E3 المتوالية الموضحة في المتوالية رقم: 23.

في أحد التجسيدات يتم حذف المنطقة E3 جزئيًا، على سبيل المثال يتم حذفها بنسبة 95%، 90%، 85%، 80%، 75%، 70%، 65%، 60%، 55%، 50%، 45%، 40%، 35%، 30%، 25%، 20%، 15%، 10%، 5%.

في أحد التجسيدات يكون B_2 عبارة عن رابطة، حيث يكون DNA الذي يشفِّر المنطقة E3 غائبًا.

في أحد التجسيدات يمكن استبدال DNA الذي يشفِّر المنطقة E3 أو مقاطعته بجين ناقل. مثلما هو مستخدم هنا تتضمن "المنطقة E3 المستبدلة بجين ناقل مثلما هو مستخدم هنا جزء أو كل المنطقة E3 المستبدلة بجين ناقل.

في أحد التجسيدات تشتمل المنطقة B_2 على متوالية من 27185 زوج قاعدة إلى 28165 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 24.

في أحد التجسيدات تتكون B_2 من متوالية من 27185 زوج قاعدة إلى 28165 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 24.

يشير B_X مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA بجوار الطرف 5' من الجين L5 في BB.

يشير مصطلح بجوار أو قرب الطرف 5' من الجين L5 مثلما هو مستخدم هنا إلى: مجاور (متماس) للطرف 5' من الجين L5 أو منطقة غير مشفِّرة ذات صلة وثيقة به أي متاخمة أو متماسة مع الطرف الأولي 5' من الجين L5 أو منطقة غير مشفِّرة ذات صلة وثيقة به. على نحو بديل، يمكن أن يشير مصطلح بجوار أو قرب إلى القرب من الجين L5، بحيث لا يوجد متواليات تشفير بين المنطقة BX والطرف 5' من الجين L5.

بالتالي في أحد التجسيدات يتم ربط B_X مباشرة بمجموعة قاعدية من L5 تمثل، على سبيل المثال بداية متوالية تشفير للجين L5.

بالتالي في أحد التجسيدات يتم ربط B_X مباشرة بمجموعة قاعدية من L5 تمثل، على سبيل المثال بداية متوالية غير مشفِّرة، أو ربطه مباشرة بمنطقة غير مشفِّرة متصلة بشكل طبيعي بـ L5. تشير منطقة غير مشفِّرة ذات صلة بشكل طبيعي بـ L5 مثلما هو مستخدم هنا إلى جزء من كل المناطق غير المُشفِّرة التي تكون جزءًا من الجين L5 أو متماسة معه لكن ليست جزءًا من جين آخر.

في أحد التجسيدات يشتمل B_X على متوالية ذات المتوالية رقم: 24. تكون هذه المتوالية عبارة عن متوالية غير مشفِّرة اصطناعية حيث تشتمل متوالية DNA، على سبيل المثال على جين ناقل (أو

مجموعة جينات ناقلة)، موقع تقييد أو توليفة مما سبق يمكن إدخالها بها. تكون هذه المتوالية مفيدة لأنها تعمل كحاجز من حيث أنها تسمح ببعض المرونة على مكان الجين الناقل تحديدًا مع الحد من التأثيرات الخطيرة على ثبات الفيروس وقابليته للحياة.

يمكن أن يتم إدخال وليجة (ولائج) في أي موضع في المتوالية رقم: 24 من الطرف 5'، الطرف 3' أو عند أي نقطة بين زوج القاعدة 1 إلى 201، على سبيل المثال بين أزواج القاعدة 2/1، 3/2، 4/3، 5/4، 6/5، 7/6، 8/7، 9/8، 10/9، 11/10، 12/11، 13/12، 14/13، 15/14، 16/15، 17/16، 18/17، 19/18، 20/19، 21/20، 22/21، 23/22، 24/23، 25/24، 26/25، 27/26، 28/27، 29/28، 30/29، 31/30، 32/31، 33/32، 34/33، 35/34، 36/35، 37/36، 38/37، 39/38، 40/39، 41/40، 42/41، 43/42، 44/43، 45/44، 46/45، 47/46، 48/47، 49/48، 50/49، 51/50، 52/51، 53/52، 54/53، 55/54، 56/55، 57/56، 58/57، 59/58، 60/59، 61/60، 62/61، 63/62، 64/63، 65/64، 66/65، 67/66، 68/67، 69/68، 70/69، 71/70، 72/71، 73/72، 74/73، 75/74، 76/75، 77/76، 78/77، 79/78، 80/79، 81/80، 82/81، 83/82، 84/83، 85/84، 86/85، 87/86، 88/87، 89/88، 90/89، 91/90، 92/91، 93/92، 94/93، 95/94، 96/95، 97/96، 98/97، 99/98، 100/99، 101/100، 102/101، 103/102، 104/103، 105/104، 106/105، 107/106، 108/107، 109/108، 110/109، 111/110، 112/111، 113/112، 114/113، 115/114، 116/115، 117/116، 118/117، 119/118، 120/119، 121/120، 122/121، 123/122، 124/123، 125/124، 126/125، 127/126، 128/127، 129/128، 130/129، 131/130، 132/131، 133/132، 134/133، 135/134، 136/135، 137/136، 138/137، 139/138، 140/139، 141/140، 142/141، 143/142، 144/143، 145/144، 146/145، 147/146، 148/147، 149/148، 150/149، 151/150، 152/151، 153/152، 154/153، 155/154، 156/155، 157/156، 158/157، 159/158، 160/159، 161/160، 162/161، 163/162، 164/163، 165/164، 166/165، 167/166، 168/167، 169/168، 170/169، 171/170، 172/171، 173/172، 174/173،

175/174، 176/175، 177/176، 178/177، 179/178، 180/179، 181/180، 182/181، 183/182، 184/183، 185/184، 186/185، 187/186، 188/187، 190/189، 191/190، 192/191، 193/192، 194/193، 195/194، 196/195، 197/196، 198/197، 199/198، 200/199 أو 201/200.

في أحد التجسيدات يشتمل B_X على المتوالية رقم: 24 مع متوالية DNA تم إدخالها بين زوج القاعدة 27 وزوج قاعدة 28 أو مكان يناظر بين المواضع 28192 زوج قاعدة و28193 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 24.

في أحد التجسيدات يكون لـ B_X متوالية من 28166 زوج قاعدة إلى 28366 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21. في أحد التجسيدات يكون BX عبارة عن رابطة.

يشير B_B مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر المنطقة L5. مثلما هو مستخدم هنا تشير المنطقة L5 إلى متوالية DNA محتوية على جين يشفِّر بولي ببتيد/بروتين ليفي، مثلما هو ملائم في السياق. يشفِّر الجين/المنطقة الليفية بروتين ليفي وهو مكون غلافي رئيسي للفيروسات الغدية. وظائف الألياف في التعرف على المستقبل ويسهم في قدرة الفيروس الغدي على ربط وإصابة الخلايا بالعدوى انتقائيًا.

في الفيروسات وفقًا للكشف الحالي الألياف من أي نوع مصلي للفيروس الغدي والفيروسات الغدية الخيمرية كنتيجة لتغيير الألياف لواحد من نوع مصلي مختلف ويتم تصورها أيضًا في الكشف الحالي. في أحد التجسيدات تكون الألياف من فيروس من المجموعة "ب"، على وجه التحديد Ad11، مثل Ad11p.

في أحد التجسيدات يكون لـ B_B متوالية من 28367 زوج قاعدة إلى 29344 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

تشير متوالية DNA فيما يخص من خلال مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA بجوار الطرف 3' من الجين L5 لـ B_B. يشير مصطلح بجوار أو قرب الطرف 3' من الجين L5 مثلما هو مستخدم هنا إلى: مجاور (متماس) للطرف 3' من الجين L5 أو منطقة غير مشفِّرة ذات صلة

وثيقة به أي متاخمة أو متماسة مع الطرف 3' الأولي من الجين L5 أو منطقة غير مشفِّرة ذات صلة وثيقة به (أي كل أو جزء من المتوالية غير المشفِّرة داخلية المنشأ إلى L5). على نحو بديل، يمكن أن يشير مصطلح بجوار أو قرب إلى القرب من الجين L5، بحيث لا يوجد متواليات تشفير بين المنطقة BY والطرف 3' من الجين L5.

بالتالي في أحد التجسيدات يتم ربط BY مباشرة بمجموعة قاعدية من L5 تمثل "طرف" متوالية تشفير.

بالتالي في أحد التجسيدات يتم ربط BY مباشرة بمجموعة قاعدية من L5 تمثل "طرف" متوالية غير مشفِّرة، أو ربطه مباشرة بمنطقة غير مشفِّرة متصلة بشكل طبيعي بـ L5.

يتم استخدام بشكل متأصل وبشكل طبيعي على نحو تبادلي هنا. في أحد التجسيدات يشتمل BY على متوالية ذات المتوالية رقم: 25. تكون هذه المتوالية عبارة عن متوالية غير مشفِّرة حيث تشتمل متوالية DNA، على سبيل المثال على جين ناقل (أو مجموعة جينات ناقلة)، موقع تقييد أو توليفة مما سبق يمكن إدخالها. تكون هذه المتوالية مفيدة لأنها تعمل كحاجز من حيث أنها تسمح ببعض المرونة على مكان الجين الناقل تحديدًا مع الحد من التأثيرات الخطيرة على ثبات الفيروس وقابليته للحياة.

يمكن أن يتم إدخال وليجة (ولائج) في أي موضع في المتوالية رقم: 22 من الطرف 5'، الطرف 3' أو عند أي نقطة بين زوج القاعدة 1 إلى 35، على سبيل المثال بين أزواج القاعدة 2/1، 3/2، 4/3، 5/4، 6/5، 7/6، 8/7، 9/8، 10/9، 11/10، 12/11، 13/12، 14/13، 15/14، 16/15، 17/16، 18/17، 19/18، 20/19، 21/20، 22/21، 23/22، 24/23، 25/24، 26/25، 27/26، 28/27، 29/28، 30/29، 31/30، 32/31، 33/32، 34/33، أو 35/34.

في أحد التجسيدات يشتمل BY على المتوالية رقم: 25 مع متوالية DNA تم إدخالها بين المواضع زوج القاعدة 12 و13 أو مكان يناظر 29356 زوج قاعدة و29357 زوج قاعدة في المتوالية رقم: 21. في أحد التجسيدات تكون الوليجة عبارة عن وليجة موقع تقييد. في أحد التجسيدات تشتمل

وليجة موقع التقييد على واحد أو اثنين من مواقع التقييد. في أحد التجسيدات يكون موقع التقييد عبارة عن وليجة موقع تقييد من 19 زوج قاعدة تشتمل على 2 من مواقع التقييد. في أحد التجسيدات تكون وليجة موقع التقييد عبارة عن وليجة موقع تقييد من 9 زوج قاعدة تشتمل على 1 موقع تقييد. في أحد التجسيدات تشتمل وليجة موقع التقييد على واحد أو اثنين من مواقع التقييد وجين ناقل واحد على الأقل، على سبيل المثال واحد أو اثنين أو ثلاثة جينات ناقلة، مثل واحد أو اثنين من الجينات الناقلة. في أحد التجسيدات يكون موقع التقييد عبارة عن وليجة موقع تقييد من 19 زوج قاعدة تشتمل على 2 من مواقع التقييد وجين ناقل واحد على الأقل، على سبيل المثال واحد أو اثنين من الجينات الناقلة. في أحد التجسيدات تكون وليجة موقع التقييد عبارة عن وليجة موقع تقييد من 9 زوج قاعدة تشتمل على 1 موقع تقييد وجين ناقل واحد على الأقل، على سبيل المثال واحد أو اثنين من الجينات الناقلة. في أحد التجسيدات يحمل اثنين من مواقع التقييد بينهما واحد أو أكثر، مثل اثنين من الجينات الناقلة (على سبيل المثال في مجموعة جينات ناقلة). في أحد التجسيدات عندما يشتمل BY على اثنين من مواقع التقييد تكون مواقع التقييد المذكورة مختلفة عن بعضها البعض. في أحد التجسيدات تكون واحد أو أكثر مواقع التقييد المذكورة في BY غير طبيعية (مثل فريدة من نوعها) على وجه التحديد جينوم الفيروس الغدي التي تم إدخالها به. في أحد التجسيدات تكون واحد أو أكثر مواقع التقييد المذكورة في BY مختلفة عن مواقع التقييد الأخرى الموجود في موضع آخر في جينوم الفيروس الغدي، على سبيل المثال مختلفة عن مواقع التقييد لبطبيعية أو مواقع التقييد التي يتم إدخالها في أجزاء أخرى من الجينوم، مثل BX. بالتالي في أحد التجسيدات تسمح موقع التقييد أو المواقع بقطع DNA في القسم على وجه الخصوص.

في أحد التجسيدات يكون لـ BY متوالية من 29345 زوج قاعدة إلى 29379 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21. في أحد التجسيدات يكون BY عبارة عن رابطة.

في أحد التجسيدات تكون الوليجة بعد زوج القاعدة 12 في المتوالية رقم: 25.

في أحد التجسيدات تكون الوليجة عند نحو الموضع 29356 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

في أحد التجسيدات تكون الوليجة عبارة عن مجموعة جينات ناقلة تشتمل على واحد أو أكثر من الجينات الناقلة، على سبيل المثال 1، 2 أو 3، مثل 1 أو 2.

يشير E4 مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر جزء أو كل المنطقة E4 للفيروس الغدي (أي منطقة بولي ببتيد/ بروتين)، يمكن تحويرها بحيث يكون بالبروتين المشفَّر من خلال E4 الجين تغييرات محافظة أو غير محافظة بالحمض الأميني (على سبيل المثال 1، 2، 3، 4 أو 5 تغييرات بالحمض الأميني، إضافات و/أو حذوفات)، ويكون له نفس وظيفة النوع غير المعالج (البروتين غير المحوَّر المناظر)؛ وظيفة زائدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج؛ وظيفة مخفضة، مثل لا وظيفة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج أو يكون له وظيفة جديدة مقارنة ببروتين من النوع غير المعالج أو توليفة مما سبق مثلما هو ملائم.

في أحد التجسيدات يتم حذف المنطقة E4 جزئيًا، على سبيل المثال يتم حذفها بنسبة 95%، 90%، 85%، 80%، 75%، 70%، 65%، 60%، 55%، 50%، 45%، 40%، 35%، 30%، 25%، 20%، 15%، 10% أو 5%. في أحد التجسيدات يكون للمنطقة E4 متوالية من 32188 زوج قاعدة إلى 29380 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

في أحد التجسيدات توجد E4 ما عدا المنطقة E4orf4 التي تم حذفها.

في أحد التجسيدات تكون B_3 عبارة عن رابطة، أي حيث تكون E4 غائبة.

في أحد التجسيدات تكون لـ B_3 متوالية تتكون من 32188 زوج قاعدة إلى 29380 زوج قاعدة هي المتوالية رقم: 21.

مثلما هو مستخدم هنا تشمل النطاقات العددية نقاط طرفية.

سوف يدرك صاحب المهارة في الفن أن العناصر في الصيغ هنا، مثل الصيغة (I)، (Ia) تكون متماسة ويمكن أن تجسد متواليات DNA غير المشفِّرة بالإضافة إلى الجينات ومتواليات DNA المشفِّرة (السمات البنائية) المذكورة هنا. في واحد أو أكثر التجسيدات تصف الصيغ وفقًا للكشف الحالي متوالية طبيعية في جينوم الفيروس الغدي. في هذا السياق سوف يتضح لصاحب المهارة في المجال أن الصيغة تشير إلى العناصر الرئيسية التي تحدد سمات القسم ذا الصلة من الجينوم ولا يقصد بها أن تكون وصف شامل للتمدد الجينومي لـ DNA.

تشير كل من E1A، E1B، E3 وE4 مثلما هو مستخدم هنا على حدة إلى صور من النوع غير المعالج ومكافئات مما سبق، يتم تحويرها أو حذفها جزئيًا من كل منطقة مثلما هو موصوف هنا، على وجه التحديد متوالية من النوع غير المعالج من فيروس غدي معروف.

يشير "وليجة" مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA مدرجة إما عند الطرف 5'، الطرف 3' أو في مقطع مرجعي من متوالية DNA محددة بحيث يعترض متوالية مرجعية. متوالية مرجعية مستخدمة كنقطة مرجعية نسبة إليها يتم وضع الوليجة. في السياق وفقًا للكشف الحالي يتم إدخال الولائج بصفة عامة سواء في المتوالية رقم: 24 أو المتوالية رقم: 25. يمكن أن تكون الوليجة إما عبارة عن وليجة موقع تقييد، مجموعة جينات ناقلة أو كلاهما. عندما يتم اعتراض المتوالية سوف يستمر الفيروس في الاشتمال على المتوالية الأصلية، لكن بصفة عامة سوف يكون كاثنتين من الشظايا بينهما وليجة.

في أحد التجسيدات لا يشتمل الجين الناقل أو مجموعة الجينات الناقلة على جزيء ناقل لإدخال غير انحيازي، مثل جزيء ناقل TN7 أو جزء منه. يشير الجزيء الناقل Tn7 مثلما هو مستخدم هنا إلى جزيء ناقل لإدخال غير انحيازي مثلما هو موصوف في الطلب الدولي رقم .2008/080003

في أحد التجسيدات يشتمل الجين الناقل أو مجموعة الجينات الناقلة كذلك على عنصر منظم أو متوالية منظمة.

متواليات منظمة أخرى

يشير "جزيء تنظيم التعبير الوراثي" (أو جزيء تنظيم/عنصر تنظيم) مثلما هو مستخدم هنا إلى عنصر وراثي، مثل معزز، محسِّن أو متوالية مستقبل جدل تلعب دورًا في التعبير الوراثي، نمطيًا من خلال بدء أو تحسين الاستنساخ أو الترجمة الوراثية.

يشير "متوالية مستقبل الجدل"، "مستقبل الجدل" أو "موقع الجدل" مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية منظمة تحدد عندما سوف يتم التعرف على جزيء mRNA من خلال البروتينات النووية الريبوزية صغيرة النوى لمعقد جسيم جدل. بمجرد تجميعه يحفز جسيم الجدل تكوين الجدل بين موقع مستقبل

الجدل لجزيء mRNA إلى موقع مانح الجدل القبلي الذي ينتج جزيء mRNA ناضج يمكن ترجمته وراثيًا لإنتاج بولي ببتيد أو بروتين مفرد.

يمكن استخدام متواليات مستقبل جدل مختلفة الأحجام في الاختراع الحالي ويمكن وصفها كمستقبل جدل قصير (صغير)، مستقبل جدل (متوسط) ومستقبل جدل متفرع (كبير).

يشير SSA مثلما هو مستخدم هنا إلى مستقبل جدل قصير، يشتمل نمطيًا على موقع جدل فقط، على سبيل المثال 4 زوج قاعدة. يشير SA مثلما هو مستخدم هنا إلى مستقبل جدل، يشتمل نمطيًا على مستقبل جدل قصير ومسار بولي بيريميدين، على سبيل المثال 16 زوج قاعدة. يشير bSA مثلما هو مستخدم هنا إلى مستقبل جدل متفرع، نمطيًا يشتمل على مستقبل جدل قصير، مسار بولي بيريميدين ونقطة تفرع، على سبيل المثال 26 زوج قاعدة.

في أحد التجسيدات مستقبل الجدل المستخدم في البنيات وفقًا للكشف هو CAGG أو المتوالية رقم: 3 أو 4. في أحد التجسيدات يكون لـ SSA متوالية نيوكليوتيد هي متوالية رقم: CAGG. في أحد التجسيدات يكون لـ SA متوالية نيوكليوتيد هي المتوالية رقم: 23. في أحد التجسيدات يكون لـ bSA متوالية نيوكليوتيد هي cagg. في أحد التجسيدات يتم اختيار متوالية مستقبل الجدل على حدة من مجموعة تشتمل على: tgctaatctt cctttctctc ttcagg (المتوالية رقم: 4)، tttctctctt cagg (المتوالية رقم: 3)، و cagg.

في أحد التجسيدات يتم إكمال موقع الجدل مباشرة (أي يُتبع في اتجاه 5' إلى 3') بمتوالية Kozak توافقية تشتمل على CCACC. في أحد التجسيدات يكون موقع الجدل ومتوالية Kozak متداخلين (منفصلين) من خلال حتى 100 زوج قاعدة أو أقل. في أحد التجسيدات يكون لمتوالية Kozak متوالية نيوكليوتيد هي CCACC.

نمطيًا، عندما تحت تحكم معزز داخلي المنشأ أو معزز خارجي المنشأ (مثل معزز داخلي المنشأ)، سوف يتم إكمال متوالية التشفير مباشرة بمتوالية Kozak. يتم تحديد بداية منطقة التشفير من خلال رامزة بدء (AUG)، على سبيل المثال في سياق المتوالية gccRccAUGg(gcc) [المتوالية رقم: 105] يتم تحديد بداية متواليات التشفير من خلال القواعد التي بخط غليظ. تدل الأحرف الصغيرة على القواعد الشائعة عند هذا الموضع (الذي يمكن أن يختلف مع ذلك) وتحدد الأحرف الكبيرة

القواعد شديدة المحافظة، أي تكون المتوالية 'AUGG' ثابتة أو نادرًا، إن حدث ذلك، تتغير؛ يحدد 'R' أن بورين (أدينين أو جوانين) يلاحظ عادة عند هذا الموضع ولا تكون المتوالية في الأقواس (gcc) ذات أهمية محددة. بالتالي في أحد التجسيدات يتم إدراج رامزة البدء AUG في متوالية Kozak.

تشير متوالية دخول الريبوزوم الداخلي DNA مثلما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفِّر متوالية دخول الريبوزوم الداخلي (IRES). يعني IRES مثلما هو مستخدم هنا متوالية نيوكليوتيد تسمح ببدء الترجمة الوراثية لمتوالية RNA مرسال (mRNA)، تتضمن البدء الحادث في متوالية mRNA. يكون ذلك مفيدًا على وجه التحديد عندما مجموعة تشفِّر mRNA متعدد المقارين. ينتج عن استخدام IRES جزيء mRNA متعدد المقارين تتم ترجمته وراثيًا في العديد من البروتينات أو الببتيدات الفردية. في أحد التجسيدات يكون لمتوالية دخول الريبوزوم الداخلي DNA متوالية نيوكليوتيد هي المتوالية رقم: 6. في أحد التجسيدات يتم فقط استخدام IRES معينة مرة واحدة في الجينوم. يمكن أن يكون لذلك فوائد تتعلق بثبات الجينوم.

يشير "ببتيد 2A ذاتي الانشطار بشكل عالي الفاعلية" أو "ببتيد 2A" مثلما هو مستخدم هنا إلى ببتيد ينشطر بشكل فعال بعد الترجمة الوراثية. تتضمن ببتيدات 2A المناسبة P2A، F2A، E2A وT2A. لاحظ المخترعون الحاليون أنه بمجرد استخدام متوالية DNA معينة تشفِّر ببتيد 2A محدد مرة واحدة، يمكن ألا يتم استخدام نفس متوالية DNA المعينة مرة أخرى. مع ذلك، يمكن استخدام التكرار في كود DNA لإنتاج متوالية DNA تتم ترجمتها وراثيًا في نفس الببتيد 2A. يكون استخدام الببتيدات 2A مفيدًا على وجه التحديد عندما تشفِّر المجموعة mRNA متعدد المقارين. ينتج عن استخدام الببتيدات 2A بولي ببتيد أحادي السلسلة تتم ترجمته وراثيًا ويتم تعديلة بعد الترجمة الوراثية لإنتاج العديد من البروتينات أو الببتيدات الفردية.

في أحد التجسيدات يكون لببتيد P2A المشفَّر المستخدم متوالية حمض أميني هي المتوالية رقم: 7. في أحد التجسيدات يكون لببتيد F2A المشفَّر المستخدم متوالية حمض أميني هي المتوالية رقم: 8. في أحد التجسيدات يكون لببتيد E2A المشفَّر المستخدم متوالية حمض أميني هي المتوالية رقم: 9. في أحد التجسيدات يكون لببتيد T2A المشفَّر المستخدم متوالية حمض أميني هي المتوالية رقم: 10.

في أحد التجسيدات يشتمل mRNA أو كل mRNA مشفَّر من خلال جين ناقل على متوالية إشارة المعالجة ببولي أدينيل، مثل نمطيًا عند طرف متوالية mRNA، على سبيل المثال مثلما هو موضح في المتوالية رقم: 5. بالتالي في أحد التجسيدات يشتمل الجين الناقل أو مجموعة الجينات الناقلة على متوالية واحدة على الأقل تشفِّر متوالية إشارة المعالجة ببولي أدينيل.

يعني "بولي A"، "إشارة المعالجة ببولي أدينيل" أو "متوالية المعالجة ببولي أدينيل" مثلما هو مستخدم هنا متوالية DNA، يحتوي عادة على موقع AATAAA، الذي بمجرد نسخه يمكن التعرف عليه من خلال معقد متعدد البروتينات ينشطر ويعالج ببولي أدينيل جزيء mRNA حديث التولد.

في أحد التجسيدات يكون بمتوالية المعالجة ببولي أدينيل متوالية نيوكليوتيد هي المتوالية رقم: 5.

في أحد التجسيدات يمكن أن تتضمن البنية متوالية معالجة ببولي أدينيل. في أحد التجسيدات يكون جزيء تنظيم التعبير الوراثي عبارة عن متوالية مستقبل جدل.

في أحد التجسيدات تشتمل المتوالية التي تشفِّر بروتين/بولي ببتيد/ببتيد، مثل جسم مضاد أو شظية ربط جسم مضاد كذلك على إشارة معالجة ببولي أدينيل.

في أحد التجسيدات يتم توفير فيروس أو بنية لها متوالية تم الكشف عنها هنا، على سبيل المثال فيروس مختار من NG-330 (المتوالية رقم: 16)؛ NG-334 (المتوالية رقم: 17)؛ NG-345 (المتوالية رقم: 18)؛ NG-346 (المتوالية رقم: 19)؛ NG-347 (المتوالية رقم: 20) و NG-348 (المتوالية رقم: 96).

في أحد التجسيدات الفيروس هو NG-347 (المتوالية رقم: 20) أو NG-348 (المتوالية رقم: 96).

الصيغ

يتعلق الكشف الحالي أيضًا بـ ويمتد إلى صيغة صيدلية لفيروس مثلما هو موصوف هنا.

في أحد التجسيدات يتم توفير صيغة سائلة تعطى عن طريق غير القناة الهضمية، على سبيل المثال للتسريب أو الحقن، لجزيء استنساخ قادر على حل الورم وفقًا للكشف الحالي حيث توفر الصيغة جرعة في نطاق 1×10 10 إلى 1×10 14 جسيم فيروسي حسب حجم الجرعة.

تعني صيغة تعطى عن طريق غير القناة الهضمية صيغة مصممة كي لا يتم توصيلها عبر الجهاز الهضمي GI. تتضمن طرق التوصيل النمطية عن طريق غير القناة الهضمية الحقن، الغرس أو التسريب. في أحد التجسيدات يتم توفير الصيغة في صورة توصيل بجرعة واحدة.

في أحد التجسيدات تكون الصيغة التي تعطى عن طريق غير القناة الهضمية في صورة حقن. يتضمن الحقن حقن داخل الوريد، تحت الجلد، داخل الورم أو داخل العضل. يعني الحقن مثلما هو مستخدم هنا إدخال سائل في الجسم عن طريق محقنة. في أحد التجسيدات لا تتضمن الطريقة الكشف الحالي حقن داخل الورم.

في أحد التجسيدات تكون الصيغة التي تعطى عن طريق غير القناة الهضمية في صورة تسريب.

يعني التسريب مثلما هو مستخدم هنا إعطاء موائع عند معدل أبطأ من خلال وسيلة تقطير، مضخة تسريب، دافع محقنة أو وسيلة مكافئة. في أحد التجسيدات يتم التسريب على مدار فترة في نطاق من 1.5 دقيقة إلى 120 دقيقة، مثل نحو 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19 20، 25، 30، 35، 40، 45، 50، 55، 60، 65، 70، 65، 80، 85، 90، 95، 100، 105، 110 أو 115 دقيقة.

في أحد التجسيدات جرعة واحدة من الصيغة أقل من 100 ملليلتر، على سبيل المثال 30 ملليلتر، مثل جرعة يتم إعطاؤها من خلال دافع محقنة.

في أحد التجسيدات يتم الحقن كحقن بطيء، على سبيل المثال على مدار فترة تتراوح من 1.5 إلى 30 دقيقة.

في أحد التجسيدات تكون الصيغة للإعطاء داخل الوريد (i.v.). تكون هذه الطريقة فعالة على وجه التحديد لتوصيل الفيروس الحال للورم لأنها تسمح بالوصول السريع إلى غالبية الأعضاء والأنسجة وتكون مفيدة على وجه التحديد لعلاج انتشار سرطاني ثانوي، على سبيل المثال الانتشارات

السرطانية الثانوية المتأصلة على وجه الخصوص تلك الموجودة في المناطق كثيرة الأوعية مثل الكبد والرئتين.

سوف تكون الصيغ العلاجية نمطيًا معقمة وثابتة في ظروف التصنيع والتخزين. يمكن صياغة التركيبة كمحلول، مستحلب مجهري، جسيم شحمي، أو صيغة أخرى تعطى عن طريق غير القناة الهضمية مناسبة للإعطاء إلى البشر ويمكن صياغتها كوسيلة مملوءة مسبقًا مثل محقنة أو قارورة، على وجه التحديد كجرعة مفردة.

سوف تشتمل الصيغة بصفة عامة على عامل مخفف أو عامل حامل مقبول صيدليًا، على سبيل المثال عامل حامل غير سام ومتساوي التوتر متوافق مع الفيروس، وحيث يكون الفيروس ثابتًا لفترة مطلوبة من الزمن.

يمكن أن يكون العامل الحامل مذيب أو وسط تشتيت يحتوي على، على سبيل المثال، الماء، إيثانول، بولي اول (على سبيل المثال، جليسرول، بروبيلين جليكول، وبولي إيثيلين جليكول سائل، وما شابه)، وخلائط مناسبة مما سبق. يمكن الحفاظ مائعية ملائمة على، على سبيل المثال، باستخدام عامل تشتيت أو عامل خافض لتوتر السطح مثل ليسثين أو عامل غير أيوني خافض لتوتر السطح مثل بولي سوربات 80 أو 40. في عوامل التشتيت يمكن المساعدة في الحفاظ على الحجم المطلوب للجسيم من خلال وجود عامل خافض لتوتر السطح. تتضمن الأمثلة على العوامل متساوية التوتر مركبات سكرية، مركبات بولي الكحول مثل مانيتول، سوربيتول، أو كلوريد الصوديوم في التركيبة.

في أحد التجسيدات يمكن أن تشتمل الصيغ التي تعطى عن طريق غير القناة الهضمية المستخدمة على واحد أو أكثر مما يلي محلول منظم، على سبيل المثال حمض 4-(2-هيدروكسي إيثيل)-1-بيبرازين إيثان سلفونيك، محلول منظم من فوسفات و/أو محلول منظم من تريس، مركب سكري على سبيل المثال ديكستروز، مانوز، سكروز أو ما شابه، ملح مثل كلوريد الصوديوم، كلوريد المجنسيوم أو كلوريد البوتاسيوم، عامل منظف مثل عامل غير أيوني خافض لتوتر السطح مثل brij، PS-80، PS-40 أو ما شابه. يمكن أن تشتمل الصيغة أيضًا على مادة حافظة مثل

EDTA أو إيثانول أو توليفة من EDTA وإيثانول، التي يرى أنها تمنع واحد أو أكثر من مسارات التحلل المحتمل.

في أحد التجسيدات سوف تشتمل الصيغة على فيروس حال للورم تمت تنقيته وفقًا للكشف الحالي، على سبيل المثال 1×10 10 إلى 1×10 14 جسيم فيروسي لكل جرعة، مثل 1 ×10 10 إلى 1×10 12 جسيم فيروسي لكل جرعة. في أحد التجسيدات يكون تركيز الفيروس في الصيغة في نطاق يتراوح من 2×10 8 إلى 2×10 14 جسيم فيروس/ ملليلتر، مثل 2 × 10 12 جسيم فيروس/ ملليلتر.

في أحد التجسيدات تشتمل الصيغة التي تعطى عن طريق غير القناة الهضمية على جليسرول.

في أحد التجسيدات تشتمل الصيغة على فيروس غدي حال للورم مثلما هو موصوف هنا، HEPES (حمض N-2-هيدروكسي إيثيل بيبرازين-´N-2-إيثان سلفونيك)، جليسرول ومحلول منظم.

في أحد التجسيدات تتكون الصيغة التي تعطى عن طريق غير القناة الهضمية من الفيروس وفقًا للكشف، HEPES على سبيل المثال 5 مللي مولار، جليسرول على سبيل المثال 5-20% (حجم/ حجم)، حمض هيدروكلوريك، على سبيل المثال لضبط الرقم الهيدروجيني في نطاق يتراوح من 7-8 وماء للحقن.

في أحد التجسيدات تتم صياغة 0.7 ملليلتر من الفيروس وفقًا للكشف عند تركيز يبلغ 2 × 10 12 جسيم فيروس/ ملليلتر في 5 مللي مولار من HEPES، 20% من جليسرول برقم هيدروجيني نهائي يبلغ 7.8.

تتوفر مناقشة متعمقة للعوامل الحاملة المقبولة صيدليًا في Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

في أحد التجسيدات يتم توفير الصيغة كصيغة لإعطاءات موضعية تتضمن الاستنشاق.

تتضمن المستحضرات القابلة للاستنشاق المناسبة مساحيق قابلة للاستنشاق، إيروسولات معايرة تحتوي على غازات دافعة أو محاليل قابلة للاستنشاق خالية من الغازات الدافعة. سوف تحتوي

المساحيق القابلة للاستنشاق وفقًا للكشف بصفة عامة على فيروس مثلما هو موصوف هنا مع سواغ مقبول فسيولوجيًا.

يمكن أن تتضمن هذه المساحيق القابلة للاستنشاق مركبات مونو سكاريد (على سبيل المثال جلوكوز أو أرابينوز)، مركبات داي سكاريد (على سبيل المثال لاكتوز، سكروز، مالتوز)، مركبات أوليجو- وبولي سكاريد (على سبيل المثال مركبات ديكستران)، مركبات بولي الكحول (على سبيل المثال سوربيتول، مانيتول، زيليتول)، أملاح (على سبيل المثال كلوريد الصوديوم، كربونات الكالسيوم) أو خلائط منها مع بعضها البعض. يتم استخدام مركبات مونو أو داي سكاريد على نحو ملائم، مثل لاكتوز أو جلوكوز، على وجه التحديد لكن ليس حصريًا في صورة الهيدرات الخاصة بها.

تتطلب جسيمات للترسيب في الرئة حجم جسيم أقل من 10 ميكرون، مثل 1-9 ميكرون على سبيل المثال من 0.1 إلى 5 ميكرو متر، على وجه التحديد من 1 إلى 5 ميكرو متر. يكون حجم الجسيم الذي يحمل الفيروس ذا أهمية قصوى وبالتالي في أحد التجسيدات يمكن امتزاز الفيروس وفقًا للكشف الحالي أو امتصاصه على جسيم، مثل جسيم لاكتوز له حجم محدد.

تكون الغازات الدافعة التي يمكن استخدامها لتحضير الإيروسولات القابلة للاستنشاق معروفة في المجال. يتم اختيار الغازات الدافعة المناسبة من بين هيدروكربونات مثل n-بروبان، n-بيوتان أو أيزو بيوتان وهالو هيدروكربونات مثل مشتقات معالجة بكلور و/أو معالجة بفلور من ميثان، إيثان، بروبان، بيوتان، سيكلو بروبان أو سيكلو بيوتان. يمكن استخدام الغازات الدافعة المذكورة أعلاه وحدها أو في خلائط مما سبق.

على وجه التحديد الغازات الدافعة المناسبة هي مشتقات ألكان معالجة بهالوجين مختارة من بين TG 11، TG 12، TG 134A و TG227. من الهيدروكربونات المعالجة بهالوجين المذكورة أعلاه، تكون TG134A (1، 1، 1، 2-تترا فلورو إيثان) و TG227 (1، 1، 1، 2، 3، 3، 3-هبتا فلورو بروبان) وخلائط مما سبق مناسبة على وجه التحديد.

يمكن أن تحتوي الإيروسولات القابلة للاستنشاق المحتوية على غاز دافع أيضًا على مكونات أخرى، مثل مذيبات مشتركة، عوامل تثبيت، عوامل نشطة السطح (العوامل الخافضة لتوتر

السطح)، عوامل مضادة للأكسدة، عوامل تزليق ووسيلة لضبط الرقم الهيدروجيني. تكون جميع هذه المكونات معروفة في المجال.

يمكن أن تحتوي الإيروسولات القابلة للاستنشاق المحتوية على غاز دافع وفقًا للاختراع حتى 5% بالوزن من مادة نشطة. تحتوي الإيروسولات وفقًا للاختراع على، على سبيل المثال، 0.002 إلى 5% بالوزن، 0.01 إلى 3% بالوزن، 0.015 إلى 2% بالوزن، 0.1 إلى 2% بالوزن، 0.5 إلى 2% بالوزن أو 0.5 إلى 1% بالوزن من مكون نشط.

على نحو بديل، يمكن أن تكون الإعطاءات الموضعية بالرئة أيضًا من خلال إعطاء محلول سائل أو صيغة معلق، على سبيل المثال باستخدام وسيلة مثل وسيلة ترذيذ، على سبيل المثال، وسيلة ترذيذ متصلة بمكبس (على سبيل المثال، وسيلة الترذيذ Pari LC-Jet Plus(R) المتصلة بالمكبس Pari Master(R) المصنع لدى شركة Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

يمكن توصيل الفيروس وفقًا للاختراع مشتتًا في مذيب، على سبيل المثال في صورة محلول أو معلق، على سبيل المثال مثلما هو موصوف بالفعل أعلاه للصيغ التي تعطى عن طريق غير القناة الهضمية. ويمكن تعليقه في محلول فسيولوجي ملائم، على سبيل المثال، محلول ملحي أو مذيب مقبول دوائيًا آخر أو محلول منظم. يمكن أن تحتوي المحاليل المنظمة المعروفة في المجال على 0.05 مجم إلى 0.15 مجم من إديدات داي الصوديوم، 8.0 مجم إلى 9.0 مجم من NaCl، 0.15 مجم إلى 0.25 مجم من بولي سوربات، 0.25 مجم إلى 0.30 مجم من حمض سيتريك لا مائي، و0.45 مجم إلى 0.55 مجم من سيترات الصوديوم لكل 1 ملليلتر من الماء لتحقيق رقم هيدروجيني يتراوح من نحو 4.0 إلى 5.0.

يمكن أن تحتوي معلقات علاجية أو صيغ محلول أيضًا على واحد أو أكثر من السواغات. تكون السواغات معروفة جيدًا في المجال وتتضمن المحاليل المنظمة (على سبيل المثال، محلول منظم من سيترات، محلول منظم من فوسفات، محلول منظم من أسيتات ومحلول منظم من بيكربونات)، أحماض أمينية، يوريا، الكحولات، حمض أسكوربيك، شحوم فسفورية، بروتينات (على سبيل المثال، ألبيومين المصل)، EDTA، كلوريد الصوديوم، جسيمات شحمية، مانيتول، سوربيتول، وجليسرول.

يمكن تغليف المحاليل أو المعلقات في جسيمات شحمية أو كريات صغيرة قابلة للتحلل الحيوي. سوف يتم توفير الصيغة بصفة عامة في صورة معقمة إلى حدٍ كبير باستخدام عمليات تصنيع معقمة.

يمكن أن يتضمن ذلك الإنتاج والتعقيم من خلال ترشيح مذيب/محلول منظم مستخدم للصيغة، معلق طاهر من جسم مضاد في محلول مذيب منظم معقم وتشتيت الصيغة في آنية معقمة من خلال طرق معروفة لأصحاب المهارة العادية في المجال.

يمكن توفير صيغة قابلة للترذيذ وفقًا للكشف الحالي، على سبيل المثال، كوحدات جرعة فردية (على سبيل المثال، حاويات أو قارورات بلاستيكية محكمة الإغلاق) مغلفة في أغلفة رقيقة. تحتوي كل قارورة على وحدة جرعة بحجم، على سبيل المثال، 2 ملليلتر، من مذيب/محلول منظم.

يمتد الكشف الحالي أيضًا إلى محاليل أو معلقات سائلة يتم توصيلها داخل الأنف، على سبيل المثال باستخدام وسيلة مثلما تم الكشف عنه في الطلب الدولي رقم 2009/068877 والبراءة الأمريكية رقم 2004/0153033 مدرج كل منهما هنا كمرجع.

العلاج

في جانب آخر يتعلق الكشف الحالي بفيروس أو صيغة مما سبق مثلما هو موصوف هنا للاستخدام في العلاج، وتحديدًا علاج سرطان.

في أحد التجسيدات تكون طريقة العلاج للاستخدام في علاج ورم.

يشير الورم مثلما هو مستخدم هنا إلى كتلة غير طبيعية من الأنسجة تنتج من انقسام شديد للخلايا لا يمكن التحكم فيه ويكون تدريجيًا، يسمى أيضًا تنشؤ خبيث. يمكن أن تكون الأورام إما حميدة (غير سرطانية) أو خبيثة. يتضمن الورم جميع صور السرطان والانتشارات السرطانية الثانوية. في أحد التجسيدات يكون الورم سرطاني.

في أحد التجسيدات يكون الورم عبارة عن ورم صلب. يمكن أن يكون الورم الصلب موضعيًا أو نقيليًا.

في أحد التجسيدات يكون الورم من أصل ظهاري.

في أحد التجسيدات يكون الورم عبارة عن ورم خبيث، مثل سرطان القولون والمستقيم، ورم كبدي، سرطان البروستاتا، سرطان البنكرياس، سرطان الثدي، سرطان المبيض، سرطان الغدة الدرقية، سرطان الكلى، سرطان المثانة، سرطان الرأس والعنق أو سرطان الرئة.

في أحد التجسيدات يكون الورم عبارة عن ورم خبيث بالقولون والمستقيم.

إلى ورم خبيث مثلما هو مستخدم هنا يشير خلايا سرطانية.

في أحد التجسيدات يتم استخدام فيروس غدي حال للورم في علاج أو الوقاية من الانتشار السرطاني الثانوي.

في أحد التجسيدات يتم استخدام الطريقة أو الصيغة هنا في علاج أنواع سرطان مقاومة للعقاقير.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء الفيروس في توليفة مع إعطاء علاج أو عامل معالجة آخر للسرطان.

في أحد التجسيدات يتم توفير فيروس أو صيغة وفقًا للكشف الحالي للاستخدام في تصنيع دواء لعلاج سرطان، على سبيل المثال سرطان موصوف أعلاه.

في جانب آخر يتم توفير طريقة لعلاج سرطان تشتمل على إعطاء كمية فعالة علاجيًا من فيروس أو صيغة وفقًا للكشف الحالي إلى مريض في حاجة لذلك، على سبيل المثال مريض من البشر.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء الفيروس الحال للورم أو الصيغة هنا في توليفة مع علاج آخر.

يتضمن "في توليفة" مثلما هو مستخدم هنا حيث يتم إعطاء الفيروس الحال للورم قبل، في نفس الوقت و/أو بعد علاج أو عامل معالجة السرطان. مع ذلك، بصفة عامة أنظمة العلاج لعلاج توليفي

يتضمن علاج السرطان الجراحة، العلاج بالإشعاع، العلاج المستهدف و/أو العلاج الكيميائي.

يشير علاج السرطان مثلما هو مستخدم هنا إلى العلاج بمركب علاجي أو عامل حيوي، على سبيل المثال جسم مضاد مخصص لعلاج سرطان و/أو علاج مداومة مما سبق.

في أحد التجسيدات يتم اختيار علاج السرطان من أي علاج آخر مضاد للسرطان يتضمن عامل علاجي كيميائي؛ عامل مستهدف مضاد للسرطان، مثل مترافق جسم مضاد وعقار؛ علاج إشعاعي، علاج بالنظائر المشعة أو أي توليفة مما سبق.

في أحد التجسيدات يمكن استخدام الفيروس وفقًا للكشف الحالي مثل فيروس غدي حال للورم كعلاج مسبق للعلاج، مثل جراحة (علاج تمهيدي مساعد)، لتقليص الورم، لعلاج الانتشار السرطاني الثانوي و/أو منع الانتشار السرطاني الثانوي أو المزيد من الانتشار السرطاني الثانوي.

يمكن استخدام الفيروس الغدي الحال للورم بعد العلاج، مثل جراحة (علاج مساعد)، لعلاج الانتشار السرطاني الثانوي و/أو منع الانتشار السرطاني الثانوي أو المزيد الانتشار السرطاني الثانوي.

في أحد التجسيدات يتم استخدام فيروس أو صيغة وفقًا للكشف الحالي في علاج مداومة.

في نفس الوقت مثلما هو مستخدم هنا يتم إعطاء علاج سرطان إضافي عند نفس الوقت أو نفس الوقت تقريبًا كصيغة الفيروس الغدي الحال للورم. يمكن تضمين العلاج في نفس الصيغة أو إعطاؤه كصيغة منفصلة.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء الفيروس في توليفة مع إعطاء عامل علاجي كيميائي.

يشير عامل العلاج الكيميائي مثلما هو مستخدم هنا للإشارة إلى عوامل كيميائية معينة مضادة للورم أو عقاقير مدمرة انتقائيًا للخلايا والأنسجة الخبيثة. على سبيل المثال، عوامل ألكلة، عوامل مضادة لنواتج الأيض، مركبات أنثراسيكلين، قلوانيات نباتية، مثبطات توبوايزوميراز، وعوامل مضادة للورم أخرى. الأمثلة على عوامل علاج كيميائي معينة تتضمن دوكسوروبيسين، 5-فلورو يوراسيل (5-FU)، باكليتاكسيل، كابيسيتابين، إيرينوتيكان، ومركبات بلاتين مثل سيس بلاتين وأوكسالي بلاتين. يمكن اختيار الجرعة من خلال بناءً على طبيعة السرطان المراد علاجه.

في أحد التجسيدات يكون العامل العلاجي هو غانسيكلوفير، الذي يمكن أن يساعد في التحكم في الاستجابات المناعية و/أو تكوين أوعية الورم.

في أحد التجسيدات يكون واحد أو أكثر من العلاجات المستخدمة في الطريقة هنا عبارة عن بنادولي الإيقاع، أي علاج مستمر أو متكرر بجرعات منخفضة من عقاقير مضادة للسرطان، يعطى غالبًا مصاحبًا لطرق علاج أخرى.

يمكن أن تكون الفيروسات الغدية الحالة للورم من المجموعة الفرعية "ب"، على وجه التحديد Ad11 وتلك المشتقة منها مثل EnAd تأزرية على وجه التحديد مع العوامل الكيميائية العلاجية لأنها تبدو ذات آلية عمل مستقلة بدرجة كبيرة عن موت الخلايا المبرمج، قتل الخلايا السرطانية من خلال آلية نخرية انحلالية سائدة. علاوة على ذلك، يمكن أن يسمح الكبت المناعي الذي يحدث أثناء العلاج الكيميائي للفيروس الحال للورم بالعمل بفاعلية أكبر.

يشير الجرعة العلاجية مثلما هو مستخدم هنا إلى كمية من الفيروس، مثل فيروس غدي حال للورم تكون مناسبة لتحقيق تأثير علاجي مخصص عند استخدامها في نظام علاج مناسب، على سبيل المثال يخفف الأعراض أو الحالات المرضية لمرض، على وجه التحديد دون إحداث آثار جانبية حاصرة للجرعة. يمكن اعتبار جرعة كجرعة علاجية في علاج سرطان أو انتشار سرطاني ثانوي عندما يمكن أن يكون عدد الجسيمات الفيروسية كافيًا للتسبب فيما يلي: إبطاء نمو الورم أو الانتشار السرطاني الثانوي أو إيقافه، أو تقليص حجم الورم أو الانتشار السرطاني الثانوي، و/أو تمديد عمر المريض. تكون الجرعات العلاجية المناسبة توازنًا بصفة عامة بين التأثير العلاجي والسمية المحتملة، على سبيل المثال حيث يكون كل الآثار الجانبية والسمية محتملين عند معرفة الفائدة المحققة بالعلاج.

في أحد التجسيدات يتم توفير إعطاء للعديد من الجرعات في أجهزة الجسم من صيغة تعطى عن طريق غير القناة الهضمية من فيروس غدي حال للورم وفقًا للكشف الحالي في دورة علاج مفردة، على سبيل المثال حيث يكون إجمالي الجرعة المعطاة في كل إعطاء في نطاق 1×10 10 إلى 1×10 14 جسيم فيروسي لكل جرعة.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء واحدة أو أكثر من جرعات (على سبيل المثال كل جرعة) الفيروس أو تركيبة تشتمل عليه بحيث يكون معدل توصيل الجسيم الفيروسي في نطاق 2×10 10 جسيم في الدقيقة إلى 2×10 12 جسيم في الدقيقة.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء فيروس أو بنية علاجية وفقًا للكشف الحالي (تتضمن صيغة تشتمل على ذلك) أسبوعيًا، على سبيل المثال في أسبوع واحد 1 يتم إعطاء الجرعة باليوم 1، 3، 5، يتبع ذلك جرعة واحدة كل أسبوعين.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء فيروس أو بنية علاجية وفقًا للكشف الحالي (تتضمن صيغة تشتمل على ذلك) كل أسبوعين أو كل 3 أسابيع، على سبيل المثال يتم إعطاءها في الأسبوع 1 الأول بالأيام 1، 3 و5، وبالأسبوع 2 أو 3 يتم إعطاءها أيضًا بالأيام 1، 3 و5 منه. يمكن تكرار نظام إعطاء الجرعات هذا أي عدد ملائم من المرات.

في أحد التجسيدات يتم إعطاء فيروس أو بنية علاجية وفقًا للكشف الحالي (تتضمن صيغة تشتمل على ذلك) شهريًا، على سبيل المثال في دورة علاج أو كعلاج مداومة.

في أحد التجسيدات يتم تحضير الفيروسات والبنيات وفقًا للكشف الحالي من خلال تقنيات ناتجة عن عودة الارتباط الجيني. سوف يدرك صاحب المهارة في الفن أنه يمكن تصنيع جينوم فيروس غدي محمي من خلال وسيلة تقنية أخرى، تتضمن تخليق كلي لجينوم أو بلازميد يشتمل على جزء من كل الجينوم. سوف يدرك صاحب المهارة في الفن أنه في حالة تخليق الجينوم يمكن ألا تشتمل منطقة الإدخال على نيوكليوتيدات موقع تقييد حيث أن الأخيرة ما هي إلا آثار مفتعلة بعد إدخال الجينات باستخدام طرق النسخ.

في أحد التجسيدات يتم تصنيع جينوم الفيروس الغدي المحمي بشكل تخليقي كليًا، على سبيل المثال حسب المتوالية رقم: 109، التي استخدمت مع مجموعات الجين الناقل في المتواليات أرقام: 18، 20، 96، 101، 102، 103.

يتعلق يمتد الكشف هنا كذلك بفيروس غدي له الصيغة (I) أو صيغة فرعية منه، يتم حصول عليه أو يمكن الحصول عليه من إدخال جين ناقل أو مجموعة جينات ناقلة.

تعني "يكون" مثلما هو مستخدم هنا "يشتمل على".

في سياق هذه المواصفة يفهم "يشتمل على" على أنه "يتضمن".

من المقصود أيضًا أن تمتد تجسيدات الاختراع التي تشتمل على سمات/ عناصر معينة أيضًا إلى تجسيدات بديلة "تتكون من" أو "تتكون بشكل أساسي" من العناصر/السمات ذات الصلة.

حيثم يكون ملائمًا من الناحية التقنية، يمكن دمج تجسيدات الاختراع.

تم إدراج المراجع التقنية مثل براءات الاختراع وطلبات براءات الاختراع هنا كمرجع.

يمكن أن تشكل أي تجسيدات مذكورة على وجه الخصوص وبوضوح هنا أساسًا لإخلاء للمسئولية إما وحدها أو في توليفة مع واحد أو أكثر من التجسيدات الأخرى.

يتم استخدام العناوين هنا لتقسيم الوثيقة إلى أقسام ولا تستخدم لتأويل معنى الكشف المتوفر هنا.

يتم وصف الاختراع الحالي بمزيد من التفصيل من خلال التوضيح فقط في الأمثلة التالية.

الأمثلة

المثال 1: إنتاج الفيروس EnAd الذي يعبر وراثيًا عن مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميد pNG-330 من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية البشرية (المتوالية رقم: 11). تحتوي مجموعة pNG-330 على متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' هي CAGG، متوالية cDNA لـ CD80 البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعة الجينات الناقلة التي تم إدخالها في الشكل 3أ. تم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

الإشارات هنا إلى الفيروسات مثل NG-330-00 هي ببساطة إشارات إلى مجموعة محددة "00" من الفيروس NG-330. يمكن استخدام تسمية مشابهة لفيروسات أخرى.

تم تحويل البلازميد pNG-330 إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-330 (المتوالية رقم: 16). تمت تنقية DNA المهتضم من خلال استخلاص فينول/كلوروفورم وترسيبه لمدة 16ساعة، -20 درجة مئوية في 300 ميكرو لتر >95% من إيثانول من رتبة حيوية جزيئية و10 ميكرو لتر من 3 مولار من أسيتات الصوديوم. تم تكوين كريات من DNA المرسب من خلال الطرد المركزي عند 14000 لفة في الدقيقة، 5 دقائق وتم غسله في 500 ميكرو لتر من 70% من إيثانول، قبل الطرد المركزي مرة أخرى، 14000 لفة في الدقيقة، 5 دقائق. تم تجفيف كرية DNA نظيفة بالهواء، إعادة تعليقها في 500 ميكرو لتر من OptiMEM المحتوي على 15 ميكرو لتر من كاشف نقل العدوى ليبوفكتامين وحضانتها لمدة 30 دقيقة، درجة حرارة الغرفة. تمت عندئذٍ إضافة خليط نقل العدوى بالتقطير إلى دورق T-25 محتوي على خلايا 293 يتم إنماءها إلى 70% اقتران. بعد حضانة الخلايا مع خليط نقل العدوى لمدة ساعتين عند 37 درجة مئوية، تمت إضافة 5% من CO2 من 4 ملليلتر من أوساط الخلايا (الجلوكوز كثير الذرات DMEM مع جلوتامين مكمل بنسبة 2% من FBS) إلى الخلايا وتمت حضانة الدوارق عند 37 درجة مئوية، 5% من CO2.

تمت مراقبة الخلايا 293 المنقول إليها العدوى كل 24 ساعة وتم إكمالها بأوساط إضافية كل 48-72 ساعة. تمت ملاحظة إنتاج الفيروس من خلال ملاحظة تأثير اعتلال خلوي كبير (CPE) في الطبقة الأحادية للخلية. بمجرد ملاحظة CPE مكثف تم حصاد الفيروس من الخلايا 293 من خلال ثلاث دورات تجميد وإذابة. تم استخدام الفيروسات التي تم حصادها لإعادة إصابة الخلايا 293 بالعدوى لتضخيم المحاليل الخام الفيروس. تم تأكيد إنتاج الفيروس القابل للحياة أثناء التضخيم من خلال ملاحظة الكثير من CPE في الطبقة الأحادية للخلية. بمجرد ملاحظة CPE تم حصاد الفيروس من الخلايا 293 من خلال ثلاث دورات تجميد وإذابة. تم استخدام المحلول الخام الذي تم تضخيمه لمزيد من التضخيم قبل تنقية الفيروس من خلال التطويق بكلوريد سيزيوم مزدوج لإنتاج محلول خام من الفيروس NG-330.

المثال 2: تحديد سمات نشاط الفيروس NG-330 مقارنة بـ EnAd في سلالات خلايا سرطانة

تمت مقارنة استنساخ الفيروس NG-330 أو EnAd (الذي تم تقييمه بمساعدة qPCR)، والتعبير الغشائي عن CD80 (الذي تم تقييمه بمساعدة مقياس تدفق الخلايا (الأشكال 4 و5) في سلالة

خلايا سرطانة القولون HT-29 وسلالة خلايا سرطانة الرئة A549. NG-330 هو فيروس مشتق من EnAd يحتوي على مجموعة جينات ناقلة تشفِّر مولد الضد المنشط للخلية التائية البشرية، CD80 بعد الجين المتأخر لـ EnAd، L5 (Fibre). يتم توضيح رسم تخطيطي للمجموعة التي تم إدخالها في الشكل 3أ. تم ذكر تفاصيل إنتاج الفيروس NG-330 في المثال 1. تم استزراع سلالات خلايا السرطانة A549 أو HT-29 في أطباق بها 6 عيون عند درجات كثافة للخلايا تبلغ 7.5× 10 5 خلية/ العين للخلايا A549 أو 2× 10 6 خلية/ العين للخلايا HT-29. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى، 100 جسيم من الفيروس EnAd أو الفيروس NG-330 لكل خلية (جسيم لكل خلية) أو تركها غير مصابة بعدوى. تم إجراء الاختبارات بعد 24، 48 أو 72 ساعة من الإصابة بالعدوى.

استنساخ الفيروس الذي تم تقييمه بواسطة qPCR

تم استخدام سلالات الخلايا HT-29 وA549 التي تم إما إصابتها بالعدوى لمدة 24، 48 أو 72 ساعة بعدد 100 جسيم لكل خلية من EnAd أو NG-330 أو تركها غير مصابة بعدوى لإحصاء DNA الفيروسي بمساعدة qPCR. تم تجميع المواد الطافية من مزرعة الخلايا وتصفيتها من خلال الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 لفة في الدقيقة. تم استخلاص DNA من 10 ميكرو لتر من المادة الطافية من المزرعة باستخدام طاقم الاستخلاص Sigma Genelute لـ DNA، وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع. تم تجهيز منحنى معياري باستخدام جسيمات الفيروس EnAd (2.5× 10 10- 2.5× 10 5 جسيم فيروس) أيضًا واستخلاصه باستخدام الطاقم Sigma Genelute. تم تحليل كل عينة أو عينة قياسية تم استخلاصها بمساعدة qPCR باستخدام مجموعة المسبار- مواد البدء النوعية تجاه الجين E3 لـ EnAd.

أوضح إحصاء عدد جينومات الفيروس التي تم الكشف عنها لكل خلية أن استنساخ الفيروس NG-330 والفيروس EnAd كان قابلًا للمقارنة في كل من سلالات الخلايا HT-29 (الشكل 4أ) وA549 (الشكل 4ب). لم يمكن الكشف عن جينومات الفيروس في الخلايا غير المصابة بالعدوى (البيانات غير موضحة).

التعبير عن CD80 على سطح الخلية الذي تم تقييمه بواسطة مقياس تدفق الخلايا

تم استخدام سلالات الخلايا HT-29 وA549 التي تم إما إصابتها بالعدوى لمدة 24، 48 أو 72 ساعة بعدد 100 جسيم لكل خلية من EnAd أو NG-330 أو تركها غير مصابة بعدوى لتحليل التعبير عن الجين الناقل CD80 على سطح الخلية. تمت إزالة خلايا الورم من سطح الطبق من خلال المعالجة بتربسين، معالجتها بالطرد المركزي ثم إعادة تعليقها في 1% من BSA/PBS. تم عندئذٍ إما حضانة العينات عند 5 درجة مئوية لمدة ساعة مع محلول منظم، جسم مضاد للتحكم في النمط الإسوي لفأر مترافق مع Cy5 أو جسم مضاد لـ CD80 البشري مترافق مع Cy5 (النسيلة 2D10). تم تلطيخ جميع العينات بشكل مشترك أيضًا بـ Zombie Aqua للخلايا الحية/ الميتة لتمييز الخلايا القابلة للحياة. تم غسل العينات 3 مرات بنسبة 1% من BSA/PBS قبل التحليل بمقياس تدفق الخلايا (FACS، Attune) للكشف عن قابلية حياة الخلية والتعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلية. أوضح التحليل أنه يمكن الكشف عن CD80 عند سطح الخلية في كل من الخلايا A549 (الشكل 5أ) أو HT-29 (الشكل 5ب) المعالجة بـ NG-330 لكن ليس تلك المعالجة بـ EnAd أو تم تركها غير معالجة.

مقارنة فاعلية الفيروس الحال للورم

تم استزراع خلايا سرطانة القولون HT-29 في أطباق بها 96 عين عند كثافة خلايا تبلغ 2.5× 10 4 خلية/ العين. تمت حضانة الأطباق لمدة 4 ساعات، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى جسيم من الفيروس EnAd أو الفيروس NG-330 عند نطاق لكثافة الإصابة بالعدوى يبلغ 0.39-100 جسيم لكل خلية (جسيم لكل خلية). تم تقييم قابلية حياة الخلية HT-29 باستخدام الكاشف Cell Titre 96 MTS (Promega: G3581) بعد 72 ساعة من الإصابة بالعدوى. أوضح إحصاء% بقاء الخلية عند كل كثافة للإصابة بالعدوى أن فاعلية NG-330 الحال للورم كانت قابلة للمقارنة بـ EnAd في الخلايا HT29 (الشكل 6).

المثال 3: إنتاج الفيروسات EnAd التي تعبر عن مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية والسيتوكين IFNα

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميد pNG-343 من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية البشرية (المتوالية رقم 11) وإنترفيرون السيتوكين البشري α (IFNα، المتوالية رقم: 12). تحتوي مجموعة pNG-343 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' وهي CAGG؛ cDNA لـ IFNα البشري؛ متوالية ببتيد P2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 7)؛ متوالية cDNA لـ CD80 البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعة الجينات الناقلة التي تم إدخالها في الشكل 3ب. تم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

تم تحويل البلازميد pNG-343 إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-343 (المتوالية رقم: 17)). تم تضخيم الفيروس NG-343 وتنقيته وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1.

المثال 4: إنتاج الفيروسات EnAd التي تعبر عن النطاق خارج الخلايا للمركب الترابطي تيروسين كيناز-3 الشبيه بـ FMS، الكيموكين MIP1α والسيتوكين IFNα

يتم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميد pNG-345 من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر صورة متغيرة قابلة للذوبان للمركب الترابطي تيروسين كيناز-3 الشبيه بـ FMS (Flt3L، المتوالية رقم: 13)، MIP1α (الصورة المتشاكلة LD78β، المتوالية رقم: 14) وIFNα (المتوالية رقم: 12). تحتوي مجموعة pNG-345 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' وهي CAGG؛ cDNA لـ Flt3L البشري؛ متوالية ببتيد P2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 7)؛ cDNA لـ MIP1α البشري؛ متوالية ببتيد T2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 10)؛ cDNA لـ IFNα البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعة الجينات الناقلة التي تم إدخالها في الشكل 3د. يتم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

يتم تحويل البلازميد pNG-345 إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-345 (المتوالية رقم: 18)). تم تضخيم الفيروس NG-345 وتنقيته وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1.

المثال 5: إنتاج الفيروسات EnAd التي تعبر عن مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية، المركب الترابطي للكيموكين MIP1α و Flt3

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميدات pNG-346 من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية البشرية (المتوالية رقم 11)، البروتين الالتهابي للخلايا البلعمية الكبيرة البشرية 1α (MIP1α، المتوالية رقم. 14) والمركب الترابطي لـ Flt3 البشري (المتوالية رقم: 13). تحتوي مجموعة pNG-346 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' وهي CAGG؛ cDNA لـ IFNα البشري؛ متوالية ببتيد P2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 7)؛ cDNA لـ MIP1α البشري (الصورة المتشاكلة LD78β)؛ متوالية ببتيد T2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 10)؛ متوالية cDNA للمركب الترابطي لـ Flt3 البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعة الجينات الناقلة التي تم إدخالها في الشكل 3هـ. يتم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

يتم تحويل البلازميد pNG-346إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-346 (المتوالية رقم: 19). تم تضخيم الفيروس NG-346 وتنقيته وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1

المثال 6: إنتاج الفيروسات EnAd التي تعبر عن مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية، الكيموكين MIP1α والسيتوكين IFNα

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميدات pNG-347 من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية البشرية (المتوالية رقم: 11)، البروتين الالتهابي للخلايا البلعمية الكبيرة البشرية 1α (MIP1α، المتوالية رقم. 14) وإنترفيرون السيتوكين

البشري α (IFNα، المتوالية رقم: 12). تحتوي مجموعة pNG-347 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' وهي CAGG؛ cDNA لـ IFNα البشري؛ متوالية ببتيد P2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 7)؛ cDNA لـ MIP1α البشري (الصورة المتشاكلة LD78β)؛ متوالية ببتيد T2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 10)؛ متوالية cDNA لـ CD80 البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعة الجينات الناقلة التي تم إدخالها في الشكل 3و. يتم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

يتم تحويل البلازميد pNG-347إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-347 (المتوالية رقم: 20). تم تضخيم الفيروس NG-347 وتنقيته وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1.

المثال 7: إنتاج الفيروسات EnAd التي تعبر عن مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية وجسم مضاد لشظية Fv أحادي السلسلة مثبت بالغشاء إلى السلسلة من معقد CD3 البشري (CD3)

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميدات pNG-348 من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية البشرية (المتوالية رقم: 11) وصورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة (المتوالية رقم: 15). تحتوي مجموعة pNG-348 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' وهي CAGG؛ cDNA لجسم مضاد لـ CD3e scFv البشري مثبت بالغشاء؛ متوالية ببتيد P2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 7)؛ متوالية cDNA لـ CD80 البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعة الجينات الناقلة التي تم إدخالها في الشكل 3ج. يتم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

يتم تحويل البلازميد pNG-348 إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-348 (المتوالية رقم: 96). تم تضخيم الفيروس NG-348 وتنقيته وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1.

المثال 8: نشاط الفيروس EnAd، NG-343، الذي يعبر عن اثنين من الجينات الناقلة؛ مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية والسيتوكين IFNα

تحديد سمات نشاط الفيروس NG-343 مقارنة بـ EnAd في سلالات خلايا سرطانة

تمت مقارنة استنساخ الفيروس NG-343 أو EnAd (الذي تم تقييمه بمساعدة qPCR)، التعبير عن الجين الناقل CD80 (الذي تم تقييمه بمساعدة مقياس تدفق الخلايا) أو التعبير عن الجين الناقل IFNα (الذي تم تقييمه بمساعدة ELISA) في سلالة خلايا سرطانة القولون، HT-29 أو سلالة خلايا سرطانة الرئة، A549. NG-343 هو فيروس مشتق من EnAd يحتوي على مجموعة جينات ناقلة تشفِّر مولد الضد المنشط للخلية التائية البشرية، CD80 بالإضافة إلى إنترفيرون السيتوكين البشري ألفا 2b الموجود بعد الجين المتأخر لـ EnAd، L5 (Fibre). يتم توضيح رسم تخطيطي للمجموعة التي تم إدخالها في الشكل 3ب. تم ذكر تفاصيل إنتاج الفيروس NG-343 في المثال 3. تم استزراع سلالات خلايا السرطانة A549 أو HT-29 في أطباق بها 12 عين عند درجات كثافة للخلايا تبلغ 7.5×10^5 خلية/ العين للخلايا A549 أو 1.4×10^6 خلية/ العين من الخلايا HT-29. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO_2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى EnAd أو NG-343 عند 100 جسيم فيروس لكل خلية (جسيم لكل خلية) أو تركها غير مصابة بعدوى. تم إجراء الاختبارات بعد 24، 48 أو 72 ساعة من الإصابة بالعدوى.

استنساخ الفيروس الذي تم تقييمه بواسطة qPCR

تم استخدام الخلايا HT-29 التي تمت إصابتها بالعدوى لمدة 24، 48 أو 72 ساعة بعدد 100 جسيم لكل خلية من EnAd أو NG-343 أو تركها غير مصابة بعدوى لإحصاء DNA الفيروسي بمساعدة qPCR. تم تجميع المواد الطافية من مزرعة الخلايا وتصفيتها من خلال الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 لفة في الدقيقة. تم استخلاص DNA من 10 ميكرو لتر من المادة

الطافية من المزرعة باستخدام طاقم الاستخلاص Sigma Genelute لـ DNA، وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع. تم تجهيز منحنى معياري باستخدام جسيمات الفيروس EnAd (2.5×10 10 إلى 2.5 ×10 5 جسيم فيروس) أيضًا واستخلاصه باستخدام الطاقم Sigma Genelute. تم تحليل كل عينة أو عينة قياسية تم استخلاصها بمساعدة qPCR باستخدام مجموعة المسبار- مواد البدء النوعية تجاه الجين E3 لـ EnAd.

أوضح إحصاء عدد جينومات الفيروس التي تم الكشف عنها لكل خلية أن استنساخ الفيروس NG-343 و EnAd كان قابلًا للمقارنة عند كل النقاط الزمنية التي تم تحليلها (الشكل 7أ). لم يمكن الكشف عن جينومات الفيروس في الخلايا غير المصابة بالعدوى (البيانات غير موضحة).

تحليل التعبير عن IFNα بواسطة ELISA

تم تحليل المواد الطافية من مزرعة سلالات الخلايا HT-29 أو A549 المصابة بعدوى لمدة 24، 48 أو 72 ساعة بعدد 10 جسيم لكل خلية لـ EnAd أو NG-343 أو تركها غير مصابة بعدوى للتعبير عن IFNα المفرز بمساعدة ELISA.

تمت إزالة المواد الطافية من المزرعة من كل عين ومعالجتها بالطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 لفة في الدقيقة لإزالة بقايا الخلايا. تم تخفيف المواد الطافية من المزرعة في 5% من المحلول المنظم للاختبار BSA/PBS (1: 2 أو 1: 50 أو 1: 100) وتم إجراء ELISA باستخدام الطاقم Verikine Human IFN alpha (Pbl assay science) وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع.

تم تحديد تركيزات IFNα المفرز من خلال الاستقراء من المنحنيات المعيارية. تم الكشف عن التعبير عن IFNα الذي زاد في المواد الطافية من المزرعة الخلوية عبر سياق الإصابة بالعدوى في كل من سلالات الخلايا HT-29 و A549 (الشكل 7ب)

التعبير عن CD80 على سطح الخلية الذي تم تقييمه بواسطة مقياس تدفق الخلايا

تم استخدام سلالات الخلايا A549 التي تمت إصابتها بالعدوى لمدة 48 أو 72 ساعة بعدد 10 جسيم لكل خلية من EnAd أو NG-343 أو تركها غير مصابة بعدوى لتحليل التعبير عن الجين

الناقل CD80 على سطح الخلية. عند نقطة زمنية ملائمة بعد الإصابة بالعدوى تمت إزالة الخلايا A549 من سطح الطبق من خلال المعالجة بتربسين، معالجتها بالطرد المركزي ثم إعادة تعليقها في 1% من BSA/PBS. تم عندئذٍ إما حضانة العينات عند 5 درجة مئوية لمدة ساعة مع محلول منظم، جسم مضاد للتحكم في النمط الإسوي لفأر مترافق مع Cy5 أو جسم مضاد لـ CD80 البشري مترافق مع Cy5 (النسيلة 2D10). تم تلطيخ جميع العينات بشكل مشترك أيضًا بـ Zombie Aqua للخلايا الحية/ الميتة لتمييز الخلايا القابلة للحياة. تم غسل العينات 3 مرات بنسبة 1% من BSA/PBS قبل التحليل بمقياس تدفق الخلايا (FACS، Attune) للكشف عن قابلية حياة الخلية والتعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلية. أوضح تحليل التعبير عن CD80 في مقابل تلطيخ الخلايا الحية/ الميتة أن بعد كل من 48 و72 ساعة من الإصابة بالعدوى يمكن الكشف عن CD80 عند سطح الخلايا المعالجة بـ NG-343 لكن ليس EnAd أو خلايا مجموعة المقارنة غير المصابة بالعدوى (UIC) (الشكل 8). لم تكن كافية قابلية حياة الخلية بعد 72 ساعة من المعالجة بالفيروس لإجراء تحليل شامل للتعبير عن CD80، مع ذلك يمكن الكشف عن مستويات عالية من CD80 على كل من الخلايا الحية والمحتضرة المعالجة بـ NG-343 عند هذه النقطة الزمنية (الشكل 8د، اللوح السفلي).

تمت عندئذٍ مقارنة التعبير عن البروتين CD80 في الخلايا HT-29 وA549 بعد 48 ساعة من الإصابة بعدوى عدد 100 جسيم لكل خلية. تم حصاد العينات وتلطيخها كما هو مذكور أعلاه قبل تحليل قابلية حياة الخلية والتعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلية. أوضح تحليل التعبير عن CD80 عند هذه النقطة الزمنية على فقط الخلايا التي تم تلطيخها كخلايا حية إمكانية الكشف عن CD80 على سطح ~91% من الخلايا HT-29 المعالجة بـ NG-343 و~98% من الخلايا A549 المعالجة بـ NG-343 لكن ليس على مجموعات المقارنة المعالجة بـ EnAd.

المثال 9: انتقائية نشاط الفيروس NG-343 والتعبير عن الجين الناقل في سرطانة، الأرومة الليفية السدوية وسلالات الخلايا الظهارية.

لتوضيح أن الجينات الناقلة IFNα وCD80 المشفَّرة في الفيروس NG-343 يتم التعبير عنها انتقائيًا فقط في الخلايا التي تسمح بالإصابة بعدوى NG-343 أو EnAd، تم قياس استنساخ الفيروس (الذي تم تقييمه بمساعدة qPCR)، التعبير عن IFNα (الذي تم تقييمه بمساعدة

ELISA) والتعبير عن CD80 (الذي تم تقييمه بمساعدة مقياس تدفق الخلايا) في الخلايا السرطانية (HT-29) المعروف أنها تسمح بالإصابة بعدوى EnAd، سلالات خلايا الأرومة الليفية (WI-38 و MRC-5) التي تميزت سابقًا بأنها لا تسمح بذلك وسلالة الخلايا الظهارية المتشعبة ((bronchial epithelial cell line (BE) التي تظهر فقط سماحية محدودة للإصابة بعدوى EnAd. باختصار، تم استزراع الخلايا في أطباق بها 12 عين وإصابتها بالعدوى بعد 18 ساعة من الاستزراع مع 100 جسيم لكل خلية من الفيروس NG-343 أو EnAd للخلايا WI38، MRC5 أو BE أو 10 جسيم لكل خلية من الفيروس NG-343 أو EnAd للخلايا HT-29. تمت حضانة الخلايا مع جسيمات الفيروس لمدة 4 ساعات قبل إزالة أوساط الإصابة بالعدوى من الخلايا واستبدالها بأوساط مزرعة جديدة. بعد ساعة أو 72 ساعة من فترة إصابة بالعدوى تبلغ 4 ساعات، تم حصاد المواد الطافية من مزرعة الخلايا لتحليل qPCR أو ELISA وتمت معالجة الخلايا بـ تربسين لإزالتها من الأطباق للتحليل بمساعدة مقياس تدفق الخلايا.

استنساخ الفيروس الانتقائي NG-343 و EnAd

لتحليل qPCR، تم تجميع المواد الطافية من مزرعة الخلايا وتصفيتها من خلال الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 لفة في الدقيقة. تم استخلاص DNA من 10 ميكرو لتر من المادة الطافية من المزرعة باستخدام طاقم الاستخلاص Sigma Genelute لـ DNA، وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع. تم تجهيز منحنى معياري باستخدام جسيمات الفيروس EnAd (2.5×10 10 إلى 2.5×10 5 جسيم فيروس) أيضًا واستخلاصه باستخدام الطاقم Sigma Genelute. تم تحليل كل عينة أو عينة قياسية تم استخلاصها بمساعدة qPCR باستخدام مجموعة المسبار – مواد البدء النوعية تجاه الجين E3 لـ EnAd.

أوضح إحصاء عدد جينومات الفيروس التي تم الكشف عنها لكل خلية أن استنساخ الفيروس NG-343 و EnAd كان قابلًا للمقارنة في جميع سلالات الخلايا التي تم تحليلها (الشكل 9أ).

التعبير عن الجين الناقل الانتقائي NG-343

للكشف عن التعبير عن IFNα، تم تجميع المواد الطافية من مزرعة الخلايا وتصفيتها من خلال الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 لفة في الدقيقة. تم تخفيف المواد الطافية من المزرعة في

5% من المحلول المنظم للاختبار BSA/PBS (1: 2 أو 1: 50 أو 1: 100) وتم إجراء ELISA باستخدام الطاقم Verikine Human IFN alpha (Pbl assay science) وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع.

تم تحديد تركيزات IFNα المفرز من خلال الاستقراء من المنحنى المعياري. يمكن الكشف عن التعبير عن IFNα فقط في المواد الطافية من مزرعة الخلايا HT-29 المصابة بعدوى NG-343 ولم يمكن الكشف عنه (أقل من الحد الأدنى للإحصاء [LLOQ>]) في أي من سلالات خلايا الأرومة الليفية، أو سلالة الخلايا الظهارية المتشعبة (الشكل 9ب).

للتعبير عن CD80 على سطح الخلية، تم عندئذٍ إما حضانة الخلايا عند 5 درجة مئوية لمدة ساعة مع محلول منظم، جسم مضاد للتحكم في النمط الإسوي لفأر مترافق مع Cy5 أو جسم مضاد لـ CD80 البشري مترافق مع Cy5 (النسيلة 2D10). تم تلطيخ جميع العينات بشكل مشترك أيضًا بـ Zombie Aqua للخلايا الحية/ الميتة لتمييز الخلايا القابلة للحياة. تم غسل العينات 3 مرات بنسبة 1% من BSA/PBS قبل التحليل بمقياس تدفق الخلايا (FACS، Attune) للكشف عن قابلية حياة الخلية والتعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلية. تماشيًا مع بيانات التعبير عن IFNα، يمكن الكشف عن التعبير عن CD80 فقط على الخلايا HT-29، دون تعبير يمكن الكشف عنه على إما الأرومة الليفية أو سلالات الخلايا الظهارية المتشعبة (الشكل 9ج).

البيانات الإطلاع على هذه أوضح أن كل من الجينات الناقلة IFNα وCD80 يتم التعبير عنها انتقائيًا في الخلايا التي تسمح بالإصابة بعدوى الفيروس EnAd أي خلايا السرطانة، ولا يغير تشفير الجينات الناقلة انتقائية الفيروس NG-343 عند مقارنته بالفيروس EnAd الأصلي.

المثال 10: نشاط التعبير عن الجين الناقل NG-343 على تنشيط الخلية المناعية

لتحديد إذا ما كانت معالجة خلايا الورم بالفيروس NG-343 يمكن أن تؤدي إلى استجابات فطرية محسنة للاستجابات المناعية مقارنة بعدم المعالجة أو بالمعالجة بـ EnAd، تم زراعة خلايا الدم المحيطية أحادية النواة المعزولة حديثًا (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) بشكل مشترك مع خلايا الورم إما التي تمت إصابتها بعدوى NG-343 أو EnAd

أو تركها غير مصابة بعدوى. تم تقييم تنشيط الخلية المناعية من خلال تحليل مقياس تدفق الخلايا لمجموعات الخلايا المناعية الفطرية أو تحليل ELISA للمواد الطافية من المزرعة المشتركة.

باختصار، تم استزراع خلايا سرطانة الرئة A549 في أطباق بها 12 عين عند كثافة تبلغ 4×10 5 خلية/ العين. بعد 20 ساعة تمت إصابة الخلايا بعدوى عدد 10 جسيم لكل خلية من الفيروس EnAd أو NG-343 أو تركها غير مصابة بعدوى ثم حضانتها لمدة 24 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2. تمت عندئذٍ إضافة PBMCs المعزولة من مانح بشري سليم الصحة من خلال الطرد المركزي متدرج الكثافة إلى عيون مزرعة A549 عند نسبة 5 من PBMCs إلى 1 من الخلية A549. بعد 48 ساعة من إضافة تم حصاد المواد الطافية من المزرعة المشتركة لـ PBMCs من الأطباق. لتحليل تنشيط الخلية المتغصنة عند هذه النقطة، تمت حضانة الخلايا عند 5 درجة مئوية لمدة ساعة مع محلول منظم، أجسام مضادة للتحكم في النوع الإسوي لفأر مترافقة مع Alexa Fluor 488، PE، PerCP/Cy5.5، BV605 أو BV412، جسم مضاد لـ CD14 مترافق مع Alexa Fluor 488، جسم مضاد لـ CD80 مترافق مع PE، جسم مضاد لـ HLA-DR مترافق مع PerCP.Cy5.5، جسم مضاد لـ CD3 مترافق مع BV605 أو جسم مضاد لـ PD-L1 مترافق مع BV421. تم تلطيخ جميع العينات بشكل مشترك أيضًا بـ Zombie Aqua للخلايا الحية/ الميتة لتمييز الخلايا القابلة للحياة. تم غسل العينات 3 مرات بنسبة 1% من BSA/PBS قبل التحليل بمقياس تدفق الخلايا (FACS، Attune). تم تحديد الخلايا القابلة للحياة التي تم تلطيخها على أنها سلبية لكل من CD14 وCD3 لكن إيجابية لـ HLA-DR كمجموعة خلايا متغصنة. التعبير عن مرقم تنشيط DC، تمت مقارنة CD80 و-PD L1 بهذه المجموعة (الشكل 10). كشفت هذه التحاليل عن أن خلايا الورم المصابة بعدوى NG-343 يمكن أن تحث زيادة المستويات الموجودة على السطح من كل من CD80 وPD-L1 على سطح DCs عند مقارنتها بمزرعة خلايا الورم المصابة بعدوى أو غير المصابة بعدوى EnAd.

المثال 11: نشاط الفيروس EnAd، NG-347، الذي يعبر عن ثلاثة جينات ناقلة؛ مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية، الكيموكين MIP1α والسيتوكين IFNα

تحديد سمات نشاط الفيروس NG-347 مقارنة بـ EnAd في سلالات خلايا سرطانة

تم مقارنة التعبير عن الجين الناقل CD80 (الذي تم تقييمه بمساعدة مقياس تدفق الخلايا) والتعبير عن الجين الناقل IFNα أو MIP1α (CCL3) (الذي تم تقييمه بمساعدة ELISA) في سلالة خلايا سرطانة القولون المعالجة بـ NG-347 وEnAd، HT-29 أو سلالة خلايا سرطانة الرئة، A549. NG-347 هو فيروس مشتق من EnAd يحتوي على مجموعة جينات ناقلة تشفِّر مولد الضد المنشط للخلية التائية البشرية، CD80، إنترفيرون السيتوكين البشري ألفا 2b والكيموكين البشري MIP1α (الصورة المتشاكلة LD78β). يكون التعبير عن الجين الناقل تحت تحكم المعزز المتأخر الرئيسي داخلي المنشأ للفيروس. يتم توضيح رسم تخطيطي للمجموعة التي تم إدخالها في الشكل 3و. تم ذكر تفاصيل إنتاج الفيروس NG-347 في المثال 6. تم استزراع سلالات خلايا السرطانة A549 أو HT-29 في أطباق بها 12 عين عند درجات كثافة للخلايا تبلغ 7.5×10 5 خلية/ العين من الخلايا A549 أو 1.4×10 6 خلية/ العين من الخلايا HT-29. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى عدد 100 جسيم لكل خلية من الفيروس EnAd أو NG-347 (جسيم لكل خلية) أو تركها غير مصابة بعدوى. تم إجراء الاختبارات بعد 24، 48 أو 72 ساعة من الإصابة بالعدوى.

تحليل التعبير عن IFNα أو MIP1α بواسطة ELISA

تم تحليل المواد الطافية من مزرعة سلالات الخلايا HT-29 أو A549 التي تمت إصابتها بالعدوى لمدة 24، 48 أو 72 ساعة بعدد 100 جسيم لكل خلية من EnAd أو NG-347 أو تركها غير مصابة بعدوى للكشف عن التعبير عن IFNα المفرز أو MIP1α المفرز بمساعدة ELISA.

تم تحضير المواد الطافية من المزرعة وفقًا للطرق المذكورة في المثال 9. تم إجراء ELISA لـ IFNα باستخدام الطاقم Verikine Human IFN alpha (Pbl assay science) وتم إجراء ELISA لـ MIP1α باستخدام الطاقم Human CCL3 Quantikine ELISA (R & D systems). تم إجراء كل من الاختبارات وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع.

تم تحديد تركيزات IFNα أو MIPα المفرز من خلال الاستقراء من المنحنيات المعيارية. زاد التعبير عن IFNα وMIP1α في المواد الطافية من المزرعة الخلوية عبر سياق الإصابة بالعدوى وتم الكشف عنه لكل من سلالات الخلايا HT-29 وA549 (الشكل 11أ والشكل 11ب).

تحليل التعبير عن CD80 بواسطة مقياس تدفق الخلايا

تمت مقارنة التعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلايا HT-29 وA549 بعد 48 ساعة من الإصابة بالعدوى. تم حصاد الخلايا وتلطيخها وفقًا للطرق المذكورة في المثال 9. تم تحليل الخلايا للكشف عن قابلية حياة الخلية والتعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلية بمساعدة مقياس تدفق الخلايا. أوضح تحليل التعبير عن CD80 عند هذه النقطة الزمنية على الخلايا الحية إمكانية الكشف عن CD80 على سطح ~96% من الخلايا HT-29 المعالجة بـ NG-347 و~99% من الخلايا A549 المعالجة بـ NG-347 لكن لم يتم الكشف عن تلطيخ بمجموعات المقارنة المعالجة بـ EnAd (الشكل 11ج).

المثال 12: نشاط الفيروس EnAd، NG-345، الذي يعبر عن ثلاثة جينات ناقلة؛ المركب الترابطي للسيتوكين Flt3، الكيموكين MIP1α والسيتوكين IFNα.

تحديد سمات نشاط الفيروس NG-345 مقارنة بـ EnAd في سلالات خلايا سرطانة

تمت مقارنة المركب الترابطي Flt3، التعبير عن الجين الناقل IFNα وMIP1α (الذي تم تقييمه بمساعدة ELISA) في سلالة خلايا سرطانة القولون المعالجة بـ NG-345 وEnAd، HT-29 أو سلالة خلايا سرطانة الرئة، A549. NG-345 هو فيروس مشتق من EnAd يحتوي على مجموعة جينات ناقلة تشفِّر صورة متغيرة قابلة للذوبان من المركب الترابطي FLt-3 البشري، إنترفيرون السيتوكين البشري ألفا 2b والكيموكين البشري MIP1α (الصورة المتشاكلة LD78β). يكون التعبير عن الجين الناقل تحت تحكم المعزز المتأخر الرئيسي داخلي المنشأ للفيروس. يتم توضيح رسم تخطيطي للمجموعة التي تم إدخالها في الشكل 3د. تم ذكر تفاصيل إنتاج الفيروس NG-345 في المثال 4. تم استزراع سلالات خلايا السرطانة A549 أو HT-29 في أطباق بها 12 عين عند درجات كثافة للخلايا تبلغ 7.5×10 5 خلية/ العين من الخلايا A549 أو 1.4×10 6 خلية/ العين من الخلايا HT-29. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة

مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى عدد 100 جسيم لكل خلية من الفيروس EnAd أو NG-345 (جسيم لكل خلية) أو تركها غير مصابة بعدوى. تم إجراء الاختبارات بعد 24، 48 أو 72 ساعة من الإصابة بالعدوى.

تحليل المركب الترابطي FLt-3، التعبير عن IFNα أو MIP1α بواسطة ELISA

تم تحليل المواد الطافية من مزرعة سلالات الخلايا HT-29 أو A549 التي تمت إصابتها بالعدوى لمدة 24، 48 أو 72 ساعة بعدد 100 جسيم لكل خلية من EnAd أو NG-345 أو تركها غير مصابة بعدوى للكشف عن التعبير عن المركب الترابطي Flt3 المفرز، IFNα المفرز أو MIP1α المفرز بواسطة ELISA.

تم تحضير المواد الطافية من المزرعة وفقًا للطرق المذكورة في المثال 9. تم إجراء ELISA لـ IFNα باستخدام الطاقم Verikine Human IFN alpha (Pbl assay science)، تم إجراء ELISA لـ MIP1α باستخدام الطاقم Human CCL3 Quantikine ELISA (R & D systems) وتم إجراء ELISA لـ Flt3L باستخدام Flt3L human ELISA kit (Abcam). تم إجراء جميع الاختبارات وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع.

تم تحديد تركيزات IFNα، MIPα أو Flt3L المفرز من خلال الاستقراء من المنحنيات المعيارية. زاد التعبير عن IFNα، MIP1α و Flt3 L في المواد الطافية من المزرعة الخلوية عبر سياق الإصابة بالعدوى وتم الكشف عنه في كل من سلالات الخلايا HT-29 و A549 (الشكل 12أ - ج).

المثال 13. النشاط الحال للورم وقابلية الإصابة بعدوى الفيروسات NG-347 و NG-348 في خلايا سرطانة القولون

فاعلية الفيروس الحال للورم

تم استزراع خلايا سرطانة القولون HT-29 في أطباق بها 96 عين عند كثافة للخلايا تبلغ 2.5× 10 4 خلية/ العين. تمت حضانة الأطباق لمدة 4 ساعات، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى جسيمات الفيروس EnAd، NG-347 أو NG-348 عند نطاق

لكثافة الإصابة بالعدوى يبلغ 100-0.39 جسيم لكل خلية (جسيم لكل خلية). تم تقييم قابلية حياة الخلية HT-29 باستخدام الكاشف Cell Titre 96 MTS (Promega: G3581) بعد 72 ساعة من الإصابة بالعدوى. أوضح إحصاء% بقاء الخلية عند كل كثافة للإصابة بالعدوى أن فاعلية NG-347 وNG-348 في حل الورم كانت قابلة للمقارنة بـ EnAd (الشكل 13أ و13ب).

قابلية الإصابة بعدوى الجسيم الفيروسي

تم استزراع خلايا سرطانة القولون HT-29 في أطباق بها 12 عين عند كثافة خلايا تبلغ 4× 10 5 خلية/ العين. تمت حضانة الأطباق لمدة 24 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى جسيمات الفيروس EnAd، NG-347 أو NG-348 عند نطاق لكثافة الإصابة بالعدوى يبلغ 1.6× 10 7-2× 10 6 جسيم فيروس/ ملليلتر. تم الكشف عن إصابة الخلايا HT-29 بالعدوى من خلال تلطيخ الجسم المضاد لهكسون بروتين الفيروس. تم إحصاء الخلايا التي تلطيخها من خلال العد اليدوي من 6 مجالات رؤية لكل عين، عبر 6 عيون مستنسخة لكل تخفيف تم اختباره. تم حساب نسبة الجسيم إلى قابلية الإصابة بالعدوى (P: I) لكل فيروس من العيار الفيروسي وأوضحت أن كل من NG-347 وNG-348 له نسب قابلية إصابة بالعدوى مشابهة لمجموعات المقارنة المرجعية EnAd (الشكل 13ج).

المثال 14. التعبير على سطح الخلية عن مولد الضد المنشط للخلية التائية، CD80، في سلالات خلايا سرطانة المصابة بعدوى NG-347 وNG-348

تمت مقارنة التعبير عن الجين الناقل CD80 (الذي تم تقييمه بمساعدة مقياس تدفق الخلايا) في سلالة خلايا سرطانة القولون المعالجة بـ NG-347، NG-348 وEnAd، DLD-1 أو سلالة خلايا سرطانة الرئة، A549. تم استزراع سلالات خلايا السرطانة A549 أو DLD-1 في أطباق بها 12 عين عند درجات كثافة للخلايا تبلغ 7.5× 10 5 خلية/ العين. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى، عدد 10 جسيم لكل خلية من الفيروس EnAd، NG-348 أو NG-347 (جسيم لكل خلية) أو تركها غير مصابة بعدوى. تمت مقارنة التعبير عن البروتين CD80 على سطح الخلايا A549 أو DLD-1

بعد 24، 48، 72 أو 96 ساعة من الإصابة بالعدوى. عند كل نقطة زمنية تم حصاد الخلايا وتلطيخها وفقًا للطرق المذكورة في المثال 9. تم تحليل الخلايا للكشف عن قابلية حياة الخلية والتعبير عن البروتين CD80 عند سطح الخلية بمساعدة مقياس تدفق الخلايا. أوضح تحليل التعبير عن CD80 بعد 72 ساعة من الإصابة بالعدوى في الخلايا A549 إمكانية الكشف عن CD80 على سطح >95% من الخلايا المعالجة بـ NG-347 أو NG-348 (الشكل 14أ و14ب). بعد 96 ساعة من الإصابة بالعدوى سببت عمليات المعالجة بالفيروس تحلل غالبية الخلايا A549 بالتالي لم يتم إجراء تحليل FACS. للخلايا DLD-1 يمكن الكشف عن التعبير عن على >50% من الخلايا بعد 96 ساعة من المعالجة بـ NG-348 و>70% من الخلايا بعد المعالجة بـ NG-347 (الشكل 15أ و15ب). لم يتم الكشف عن التلطيخ بـ EnAd أو مجموعات المقارنة غير المعالجة.

المثال 15. تنشيط الخلية التائية وإزالة الحبيبات التي تسببها سلالات خلايا السرطانة المصابة بعدوى NG-348

تمت زراعة خلايا سرطانة الرئة A549، إما التي تمت إصابتها بعدوى جسيمات الفيروس NG-348 أو EnAd أو تركها غير مصابة بعدوى، بشكل مشترك مع الخلايا التائية المعزولة من مانحين PBMC البشري. تم تقييم انتقائية التعبير عن CD80 المشفَّر بالفيروس NG-348 على سطح كل من الخلايا A549 والخلايا التائية بمساعدة مقياس تدفق الخلايا. تم تقييم تنشيط الخلية التائية من خلال تحليل مرقمات تنشيط سطح الخلية (بمساعدة مقياس تدفق الخلايا)، التعبير عن CD107a على سطح الخلية كمرقم لإزالة الحبيبات (بمساعدة مقياس تدفق الخلايا) وإفراز السيتوكينات التحفيزية، IL-2 وIFNγ (بمساعدة ELISA).

تم استزراع الخلايا A549 في أطباق بها 12 عين عند كثافة تبلغ 5× 10 5 خلية/ العين. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى عدد 10 جسيم فيروس لكل خلية من EnAd أو NG-348 (جسيم لكل خلية) أو تركها غير مصابة بعدوى. بعد 48 ساعة من الإصابة بالعدوى تمت إضافة الخلايا CD3+ T، المعزولة من خلال اختيار سلبي من PBMCs (MACs) إلى الطبقات الأحادية للخلية A549 عند نسبة 8 من الخلايا التائية: 1 من خلية الورم. تم إجراء مزرعة مشتركة لمدة 16ساعة، بعد هذه النقطة تم

تجميع المواد الطافية من المزرعة الخلوية لتحليل ELISA وخلايا الورم والخلايا التائية التي تم حصادها لتحليل مقياس تدفق الخلايا.

تمت إزالة أوساط المزرعة المحتوية على خلايا غير ملتصقة من عيون المزرعة المشتركة ومعالجتها بالطرد المركزي (300 لفة). تمت إزالة المادة الطافية من المزرعة بحذر، تخفيفها 1 في 2 بـ PBS 5% من BSA وتخزينها لتحليل ELISA. تم غسل الطبقات الأحادية من الخلايا الملتصقة مرة بـ PBS ثم فصلها باستخدام تربسين. تم تعطيل نشاط تربسين باستخدام أوساط تامة وتمت إضافة الخلايا إلى كريات الخلية التي تم تجميعها من المواد الطافية من المزرعة. تمت معالجة الخلايا بالطرد المركزي (300 لفة)، التخلص من المادة الطافية من المزرعة وغسل كرية الخلية في 200 ميكرو لتر من PBS. تمت معالجة الخلايا بالطرد المركزي مرة أخرى ثم إعادة تعليقها في 50 ميكرو لتر من المحلول المنظم FACs (5% من BSA PBS) المحتوي على Aqua الحية/ الميتة (Life tech) لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. تم غسل الخلايا مرة في المحلول المنظم FACs قبل تلطيخها بألواح من الأجسام المضادة المترافقة مباشرة: جسم مضاد لـ CD3 مترافق مع BV605؛ جسم مضاد لـ CD25 مترافق مع BV421؛ جسم مضاد لـ CD107a مترافق مع FITC؛ جسم مضاد لـ EpCam مترافق مع PE أو جسم مضاد لـ CD4 مترافق مع PE؛ وإما جسم مضاد لـ CD80 مترافق مع Cy5/PE أو جسم مضاد لـ HLA-DR مترافق مع Cy5/PE. تم تلطيخ عينة من الخلايا من كل تهيئة لمزرعة مشتركة أيضًا بأجسام مضادة مقارنة من نوع إسوي ذي صلة. تم إجراء كل التلطيخ في المحلول المنظم FACs بإجمالي حجم يبلغ 50 ميكرو لتر/ العين لمدة 15 دقيقة، 4 درجة مئوية. تم عندئذٍ غسل الخلايا بالمحلول المنظم FACs (200 ميكرو لتر) قبل إعادة التعليق في 200 ميكرو لتر من المحلول المنظم FACs والتحليل بمساعدة مقياس تدفق الخلايا (Attune).

التعبير الانتقائي عن CD80

بشكل مشابه للنتائج الموضحة في المثال 14، أمكن الكشف عن التعبير عن CD80 عند سطح >80% من الخلايا EpCam+ A549 المصابة بعدوى NG-348 لكن ليس المصابة بعدوى EnAd أو خلايا مجموعة المقارنة غير المصابة بالعدوى (الشكل 16). على العكس من ذلك لم توضح الخلايا T CD3+ تعبير يمكن الكشف عنه عن CD80 عند سطح الخلية مما يدل، على

الأقل في هذه الظروف التجريبية، على أن التعبير عن الجين الناقل انتقائيًا تجاه خلايا الورم في المزرعة المشتركة.

الزيادة المقننة لمرقمات تنشيط الخلية التائية

تم تقييم تحليل مقياس تدفق الخلايا لتنشيط الخلية التائية من خلال التعبير عن المرقمات CD25 و HLA-DR لتنشيط الخلية التائية بالخلايا +CD3، الخلية الفردية. أوضحت هذه البيانات أن كل من عدد الخلايا التائية التي تعبر عن CD25 (الشكل 17أ و17ب) ومتوسط مستوى التعبير عن CD25 على سطح الخلية التائية (الشكل 17ج) كانا أعلى بدرجة كبيرة للخلايا T المزروعة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348 من المصابة بعدوى EnAd أو مجموعات المقارنة غير المصابة بالعدوى. على وجه الخصوص، لا فارق في حالة تنشيط الخلية التائية عند مقارنة مجموعات المقارنة غير المعالجة بـ EnAd (26.9% ± 3.4% و25.3 ± 3.5% من الخلايا التائية التي تعبر عن CD25، على الترتيب) بينما تمت زيادة CD25 بشكل مقنن بغالبية الخلايا المزروعة بشكل مشترك مع NG-348 (83.2 ± 1.5%). تم تحليل التعبير عن CD25 أيضًا على مجموعات الخلية التائية الفرعية لـ CD4 وCD8من خلال الإمرار الانتقائي للخلايا +CD3 T بناءً على تعبيرها عن CD4. أوضحت هذه التحاليل أنه تمت زيادة التعبير عن CD25 بشكل مقنن بدرجة كبيرة تمت زيادته بشكل مقنن بكل من مجموعات الخلية التائية الفرعية لـ +CD4 و_CD4 في المزارع المشتركة المعالجة بـ NG-348 مقارنة بـ EnAd ومجموعات المقارنة غير المصابة بالعدوى (الشكل 18).

على العكس من CD25 كان عدد الخلايا التي تعبر عن HLA-DR منخفضًا، <5%، لجميع الظروف التي اختبارها (الشكل 19أ). يحتمل أن يكون ذلك نتيجة للنقطة الزمنية المبكرة بعد المزرعة المشتركة التي عندها تم إجراء تحليل مقياس تدفق الخلايا. ومع ذلك، كانت هناك زيادة طفيفة لكن ذات دلالة إحصائية في متوسط الكثافة الفلورية لـ HLA-DR الذي يلطخ الخلايا +CD3+HLA-DR من المزارع المشتركة المعالجة بـ NG-348 مقارنة بمجموعات المقارنة (الشكل 19ب).

حث إزالة حبيبات الخلية التائية

أوضح تحليل التعبير عن CD107a على سطح الخلايا T +CD3 الحية زيادة ذات دلالة إحصائية في عدد الخلايا التائية التي تمت إزالة الحبيبات منها وتم بالتالي تلطيخها بـ CD107a، عندما تمت إصابة الخلايا A549 بعدوى NG-348 (8.3% ± 1.7% من الخلايا) مقارنة إما بـ EnAd (0.6% ± 0.2% من الخلايا) أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (0.1% ± 0.02% من الخلايا) (الشكل 20). بشكل مشابه للزيادة المقننة CD25، أوضحت كل من مجموعات الخلية التائية الفرعية لـ +CD4 و_CD4 زيادة بدرجة كبيرة في التعبير عن CD107a مقارنة بمجموعات المقارنة EnAd أو A549 (الشكل 21).

إفراز السيتوكينات التحفيزية IL-2 وIFNγ

للكشف عن التعبير عن IL-2 أو IFNγ، تم تخفيف المواد الطافية من المزرعة المشتركة في 5% من المحلول المنظم للاختبار BSA/PBS (في نطاق يتراوح 1: 100 إلى 1: 1000) وتم إجراء ELISA باستخدام طاقم Ready Set go لـ IL-2 البشري (Affymetrix) أو طاقم Ready Set go لـ IFN جاما البشري (Affymetrix) وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع.

تم تحديد تركيزات IL-2 أو IFNγ المفرز من خلال الاستقراء من المنحنيات المعيارية. يمكن الكشف عن التعبير عن IL-2فقط في المواد الطافية من المزارع المشتركة باستخدام الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348 ولم يمكن الكشف عنه سواء في EnAd، أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (الشكل 22أ). يمكن الكشف أيضًا عن التعبير عن IFNγ، عند مستويات عالية للغاية (>300 نانو جم/ ملليلتر) في المواد الطافية من المزارع المشتركة من الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348، التي كانت أعلى بدرجة كبيرة من إما EnAd أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (الشكل 22ب).

المثال 16. يمكن التسبب تنشيط الخلايا التائية CD4 والخلايا التائية CD8على حدة من خلال سلالات خلايا السرطانة المصابة بعدوى NG-348

تمت زراعة خلايا سرطانة الرئة A549 التي تمت إصابتها بعدوى جسيمات الفيروس NG-348 أو EnAd أو تركها غير مصابة بعدوى، بشكل مشترك إما مع الخلايا T +CD4 أو الخلايا

CD8+ T المعزولة من مانحين PBMC البشري. تم تقييم تنشيط الخلية التائية من خلال إفراز السيتوكين IFNγ التحفيزي في المواد الطافية من المزرعة.

تم استزراع الخلايا A549 وإصابتها بعدوى جسيمات الفيروس NG-348 أو EnAd أو تركها غير مصابة بعدوى وفقًا للطرق المذكورة في المثال 14. بعد 48 ساعة من الإصابة بالعدوى تمت إضافة الخلايا CD4+ T أو الخلايا CD8+ T المعزولة من خلال اختيار سلبي من مانح PBMC إلى الطبقة الأحادية للخلية A549 عند نسبة 8 من الخلايا التائية إلى 1 من خلايا الورم. بعد 16ساعة من المزرعة المشتركة تم حصاد المواد الطافية من المزرعة وتقييمها للكشف عن IFNγ وفقًا للطرق المذكورة في المثال 14.

بالنسبة للخلايا CD4+ T تم الكشف عن التعبير عن IFNγ فقط في المواد الطافية من المزارع المشتركة من الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348 ولم يمكن الكشف عنه سواء في EnAd أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (الشكل 23أ). بالنسبة للخلايا CD8+T تم الكشف عن التعبير عن IFNγ عند مستويات أعلى بدرجة كبيرة من الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-348 من المصابة بعدوى EnAd أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (الشكل 23ب)، مما يوضح أنه يمكن تنشيط كل من الخلايا CD8 و CD4 لإفراز IFNγ من خلال نشاط الفيروس NG-348 في سلالات خلايا الورم.

المثال 17. تنشيط الخلية التائية الذي يسببها سلالات خلايا السرطانة المصابة بعدوى NG-347

تمت زراعة خلايا سرطانة الرئة A549، إما التي تمت إصابتها بعدوى جسيمات الفيروس NG-347 أو EnAd أو تركها غير مصابة بعدوى، بشكل مشترك مع الخلايا التائية المعزولة من مانحين PBMC البشري. تم تقييم تنشيط الخلية التائية من خلال تحليل مرقمات تنشيط سطح الخلية (بمساعدة مقياس تدفق الخلايا) وإفراز السيتوكين التحفيزي، IFNγ (بمساعدة تحليل ELISA للمواد الطافية من المزرعة الخلوية).

تم استزراع الخلايا A549 في أطباق بها 12 عين عند كثافة تبلغ 5× 10 5 خلية/ العين. تمت حضانة الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إما إصابة الخلايا بعدوى عدد 10 جسيم لكل خلية من الفيروس EnAd أو NG-347 (جسيم لكل خلية) أو تركها غير

مصابة بعدوى. بعد 24 ساعة من الإصابة بالعدوى تمت إضافة الخلايا T +CD3، المعزولة من خلال اختيار سلبي من PBMCs (MACs) إلى الطبقات الأحادية للخلية A549 عند نسبة 5 من الخلايا التائية: 1 من خلية الورم. تم إجراء مزرعة مشتركة لمدة 48 ساعة، قبل تجميع المواد الطافية من المزرعة الخلوية لتحليل ELISA وخلايا الورم والخلايا التائية التي تم حصادها لتحليل مقياس تدفق الخلايا وفقًا للطرق المذكورة في الشكل 15.

تم تلطيخ الخلايا التي تم حصادها بالأجسام المضادة المترافقة مباشرة: جسم مضاد لـ CD3 مترافق مع BV605 وجسم مضاد لـ CD69 مترافق مع BV421. تم تلطيخ عينة من الخلايا من كل تهيئة لمزرعة مشتركة أيضًا بأجسام مضادة مقارنة من نوع إسوي ذي صلة. تم إجراء كل التلطيخ في المحلول المنظم FACs بإجمالي حجم يبلغ 50 ميكرو لتر/ العين لمدة 15 دقيقة، 4 درجة مئوية. تم عندئذٍ غسل الخلايا بالمحلول المنظم FACs (200 ميكرو لتر) قبل إعادة التعليق في 200 ميكرو لتر من المحلول المنظم FACs والتحليل بمساعدة مقياس تدفق الخلايا (Attune).

الزيادة المقننة لمرقم تنشيط الخلية التائية، CD69

تم تقييم تحليل مقياس تدفق الخلايا لتنشيط الخلية التائية من خلال التعبير عن المرقم CD69 لتنشيط الخلية التائية على الخلايا +CD3 الحية الفردية. أوضحت هذه البيانات أن عدد الخلايا التائية التي تعبر عن CD69 كان أعلى بدرجة كبيرة للخلايا T المزروعة مع الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-347 من المصابة بعدوى EnAd أو مجموعات المقارنة غير المصابة بالعدوى (الشكل 24).

إفراز السيتوكين IFNγ التحفيزي

للكشف عن التعبير عن IL-2 أو IFNγ، تم تخفيف المواد الطافية من المزرعة المشتركة في 5% من المحلول المنظم للاختبار BSA/PBS (في نطاق يتراوح 1: 100 إلى 1: 1000) وتم إجراء ELISA باستخدام طاقم Ready Set go لـ IFN جاما البشري (Affymetrix) وفقًا لبروتوكول جهة التصنيع.

تم تحديد تركيز IFNγ المفرز من خلال الاستقراء من المنحنى المعياري. يمكن الكشف عن التعبير عن IFNγ فقط في المواد الطافية من المزارع المشتركة باستخدام الخلايا A549 المصابة

بعدوى NG-347 ولم يمكن الكشف عنه سواء في EnAd، أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (الشكل 25).

المثال 18: إنتاج الفيروسات EnAd التي تعبر عن مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية وجسم مضاد لشظية Fv أحادي السلسلة مثبت بالغشاء إلى السلسلة من معقد CD3 البشري (CD3)

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميدات pNG-348A من خلال الإدخال المباشر لمجموعة تشفِّر مولد الضد CD80 المنشط للخلية التائية البشرية (المتوالية رقم 11) وصورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة بعلامة V5 عند الطرف C (المتوالية رقم: 99). تحتوي مجموعة pNG-348 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' (المتوالية رقم. 2)؛ cDNA لجسم مضاد لـ CD3e scFv البشري مثبت بالغشاء؛ علامة V5 عند الطرف C (المتوالية رقم: 100)؛ متوالية ببتيد P2A عالي الفاعلية ذاتي الانشطار (المتوالية رقم: 7)؛ متوالية cDNA لـ CD80 البشري ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسم تخطيطي لمجموعات الجينات الناقلة NG-348 في الشكل 26أ. يتم تأكيد تشكيل البلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

يتم تحويل البلازميد pNG-348A إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس NG-348A (المتوالية رقم: 101). تم تضخيم الفيروس NG-348A وتنقيته وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1.

المثال 19: إنتاج الفيروسات EnAd لجسم مضاد لشظية Fv أحادي السلسلة مثبت بالغشاء إلى السلسلة من معقد CD3 البشري (CD3)

تم استخدام البلازميد pEnAd2.4 لإنتاج البلازميدات pNG-420 وpNG-420A من خلال الإدخال المباشر لمجموعات تشفِّر صورة خيمرية مثبتة بالغشاء من جسم مضاد لـ CD3e البشري خاص بـ Fv أحادي السلسلة بعلامة V5 عند الطرف C (المتوالية رقم: 99) أو دون علامة V5 (المتوالية رقم: 15). تحتوي مجموعة pNG-420 على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف

5' وهي CAGG؛ cDNA لجسم مضاد لـ CD3e scFv البشري مثبت بالغشاء ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). تحتوي مجموعة pNG-420A على؛ متوالية مستقبل جدل قصيرة عند الطرف 5' وهي cagg؛ cDNA لجسم مضاد لـ CD3e scFv البشري مثبت بالغشاء؛ علامة V5 عند الطرف C (المتوالية رقم: 100) ومتوالية المعالجة ببولي أدينيل عند الطرف 3' (المتوالية رقم: 5). يتم توضيح رسوم تخطيطية لمجموعات الجينات الناقلة NG-420 وNG-420A في الشكل 26ب و26ج. يتم تأكيد تشكيل كل بلازميد من خلال تكوين متواليات DNA.

إنتاج الفيروس وتحديد سماته

يتم تحويل البلازميدات pNG-420 وpNG-420A إلى شكل مستقيم من خلال الاهتضام المقيد بالإنزيم AscI لإنتاج جينومات الفيروس NG-420 (المتوالية رقم: 102) وNG-420A (المتوالية رقم: 103). يتم تضخيم الفيروسات NG-420 وNG-420A وتنقيتها وفقًا للطرق المذكورة في المثال 1.

المثال 20

تمت زراعة خلايا سرطانة الرئة البشرية A549 وخلايا الأرومة الليفية البشرية MRC5 مع EnAd، الفيروسات NG-347 أو NG-348 (عند 10 جسيم لكل خلية) لمقارنة استنساخ جينوم الفيروس، هكسون الفيروس والتعبير عن الجين الناقل من خلال أنواع الخلايا هذه. بعد 72 ساعة من المزرعة، تم إما تلطيخ الخلايا لتحاليل FACS لمرقمات السطح أو المواد الطافية من المزرعة ونواتج تحلل الخلية التي تم تحضيرها لتحاليل استنساخ جينوم الفيروس (qPCR) أو mRNA (qPCR-RT) للهكسون أو التعبير عن الجين الناقل.

استنساخ جينوم الفيروس والتعبير عن mRNA للهكسون لاثنين من الجينات الناقلة التي تحمل الفيروسات، كان NG-347 وNG-348 مكافئين لتلك الخاص بالفيروس الأصلي، EnAd (الشكل 27). بالنسبة لـ NG-348 (الشكل 28)، كانت مستويات التعبير عن mRNA للجين الناقل لـ CD80 وجسم مضاد لـ CD3-scFv البشري عالية مع خلايا الورم A549، مع فقط إشارة منخفضة المستوى للخلايا MRC5 غير الورمية. تم الكشف عن التعبير عن البروتين

CD80 على سطح الخلايا الذي تم تقييمه من خلال FACS بغالبية الخلايا A549 المعالجة بـ NG-348 لكن لم يمكن الكشف عنه بالخلايا MRC5، مع عدم الكشف عن CD80 بأي نوع خلية تم تركها غير معالجة أو تمت معالجتها بـ EnAd. بالمثل، تم انتقائيًا الكشف عن التعبير عن mRNA للجين الناقل لـ CD80 والبروتين بعد المعالجة بـ NG-347 في خلايا الورم A549 ليس الخلايا MRC5 (الشكل 29).

بالنسبة لمزارع الخلايا المعالجة بـ EnAd و NG-347، تم قياس مستويات mRNA لـ MIP1 و IFN في نواتج تحلل الخلية والبروتينات المفرزة في المواد الطافية من المزرعة من خلال RT-qPCR و ELISAs نوعية، على الترتيب. توضح البيانات (الشكل 30) التعبير الانتقائي عن كل من الجينات الناقلة من خلال خلايا الورم A549، بدون الكشف عن الكيموكين MIP1 أو السيتوكين IFN في المواد الطافية من المزرعة MRC5.

المثال 21

تم تقييم انتقائية/نشاط الفيروسات EnAd، NG-347 و NG-348 مع الخلايا التائية البشرية من خلال زراعة الخلايا T +CD3 المعزولة لمدة 3 أيام سواء مع 500 جسيم لكل خلية أو 5000 جسيم لكل خلية من كل فيروس. تم تقييم الانتقائية/ النشاط من خلال أ) تحليل مقياس تدفق الخلايا التائية التي تم تلطيخها بالأجسام المضادة التي تستهدف CD69، CD4، CD80، CD25 و CD3، ب) تحليل ELISA لإفراز بروتين MIP1، IFN و IFN البشري، ج) تحليل qPCR لاستنساخ الفيروس ود) تحليل RT-qPCR للتعبير الوراثي.

مثلما هو موضح في الشكل 31، لم تدعم الخلايا التائية استنساخ جينوم الفيروس لأي من الفيروسات التي اختبارها بمساعدة فقط إشارات مرجعية في اختبار RT-qPCR لهكسون الفيروس. دعمت خلايا الورم A549 مستويات عالية من التعبير عن mRNA للهكسون. أوضحت تحاليل RT-qPCR للتعبير عن mRNA للجين الناقل من خلال الخلايا التائية فقط إشارات مرجعية (<1 نسخة/الخلية) لـ CD80 من خلال كل من NG-347 و NG-348، وافتقار مشابه لتعبير ذي دلالة إحصائية عن mRNA لجسم مضاد لـ ScFv-CD3 من خلال NG-348، على الرغم من التعرض الشديد للفيروس (5000 جسيم لكل خلية). تم الكشف عن مستويات عالية

من التعبير عن كل من الجينات الناقلة مع خلايا الورم A549 (الأشكال 32 و33) المعالجة (10جسيم لكل خلية). تم انتقائيًا الكشف عن التعبير عن mRNA للجين الناقل IFN و MIP1 من خلال خلايا الورم A549 (عند 10 جسيم لكل خلية) المعالجة بـ NG-347 (ليس EnAd) وليس من خلال الخلايا التائية المعالجة بعدد 5000 جسيم لكل خلية (الشكل 34). بالإضافة إلى ذلك، أمكن الكشف عن التعبير عن بروتين CD80 على سطح الخلية فقط مع الخلايا A549 وليس الخلايا التائية لكل من NG-347 وNG-348 (الأشكال 32 و33). لم تؤدي المعالجة بـ EnAd إلى التعبير عن CD80 من خلال أي نوع خلية، وكان موت الخلية A549 (مثلما تم تقييمه من خلال امتصاص الصبغة) مرتفعًا بالمثل لجميع الفيروسات الثلاثة؛ تم حث مستوى منخفض من موت الخلايا التائية غير النوعي من خلال جميع الفيروسات نتيجة للمستويات العالية للغاية من جسيمات الفيروس المستخدمة في التجربة (الأشكال 32 و33). تم الحصول على بيانات مشابهة للتعبير عن mRNA للجين الناقل والبروتين البيانات عندما تم استخدام الفيروسات عند 500 جسيم لكل خلية (البيانات غير موضحة).

في غياب خلايا الورم، لم تكن الخلايا التائية البشرية التي تمت تنقيتها منشطة لزيادة مرقمات التنشيط CD25 أو CD69 بشكل مقنن عند زراعتها مع أي من الفيروسات (الجدول 5).

الجدول 5. الافتقار إلى التعبير عن مرقمات التنشيط CD25 وCD69 من خلال الخلايا CD3+ T البشرية التي تمت تنقيتها والمعالجة بعدد 5000 جسيم لكل خلية من الفيروسات المختلفة

	غير المعالجة	EnAd	NG-347	NG-348
الخلايا CD25+ CD4 T	30.7	24.6	23.4	23.3
الخلايا CD69+ CD4 T	0.1	0.4	0.3	0.7
الخلايا CD25+ CD8 T	5.9	4.7	4.1	4.1
الخلايا CD69+ CD8 T	0.5	1.0	0.9	1.3

المثال 22

تم إجراء تجربة انتقائية تجاه الفيروس مشابهة لتلك الموصوفة في المثال 21 باستخدام PBMCs بشرية لم يتم فصلها بدلًا من الخلايا التائية التي تمت تنقيتها، التي تتضمن إجراء نفس تقييمات النشاط. كما مع الخلايا التائية البشرية في المثال 21، توضح البيانات من هذه الدراسة في المجمل الافتقار إلى استنساخ الفيروس والتعبير عن الجين الناقل من خلال PBMCs البشرية. توضح الأشكال 35-37 البيانات باستخدام 5000 جسيم لكل خلية من EnAd، NG-347 أو NG-348، لكن تم إخراج بيانات مشابهة باستخدام 500 جسيم لكل خلية (غير موضحة). يوضح الشكل 35 التعبير عن استنساخ جينوم الفيروس وmRNA للهكسون وتوضح الأشكال 36 و37 التعبير عن mRNA للجين الناقل. تم ضبط خلفيات الاختبار وفقًا للإشارات المتولدة في الاختبار مع الارتفاع الحاد لمستوى الفيروس المناظر في أوساط المزرعة ثم معالجتها بنفس الطريقة كعينات ناتج تحلل الخلية. لم يمكن الكشف عن التعبير عن الجين الناقل لـ CD80 بالخلايا T +CD3 أو الخلايا +CD40 (بشكل أساسي الخلايا البائية) في مزارع PBMC هذه مع أي من الفيروسات (غير موضحة).

كان التنشيط الذي يسببه جسيم الفيروس NG-347 وNG-348 لخلايا المناعة الفطرية (خلايا أحادية، DCs) في مزارع PBMC مشابهًا لذاك الخاص بـ EnAd، مثلما هو موضح في الأشكال 38 و39 لخفض مقنن للتعبير عن CD14 وزيادة مقننة لـ HLA-DR وCD80 داخلي المنشأ على سطح الخلية، بالإضافة إلى إفراز MIP1 وIFN (لاحظ أنه على الرغم من أن NG-347 يشفِّر كل من هذه الجزيئات في الجينوم الخاص بها لا توجد زيادة في مستويات الإنتاج مقارنة بتلك الخاصة بـ EnAd وNG-348 التي لا تشفِّر الجينات الناقلة).

المثال 23

يشبه هذا المثال في التصميم التجارب في الأمثلة 15-17، 21 و22 لكن في هذه الدراسات، تمت زراعة PBMCs البشرية أو الخلايا التائية التي تم تنقيتها بشكل مشترك مع خلايا الورم A549 أو الأورمات الليفية MRC5 المعالجة مسبقًا بالفيروس (48 ساعة). تمت معالجة الخلايا A549 أو MRC5 بعدد 10جسيم لكل خلية من EnAd، NG-347، NG-348 أو تم تركها غير معالجة (UTC) وزراعتها لمدة 48 ساعة للسماح بوقت كافي لاستنساخ الفيروس وأي تعبير

عن الجين الناقل. تمت عندئذٍ إضافة PBMCs أو الخلايا التائية إلى المزارع وتركها لمدة 24 أو 48 ساعة لتقييم قدرة الخلايا المعالجة بالفيروس على تنشيط الخلايا التائية.

يوضح الشكل 40 بيانات استنساخ جينوم الفيروس التي توضح استنساخ قابل للمقارنة لثلاثة فيروسات في المزارع المشتركة لـ PBMC أو الخلية التائية مع كل من أنواع الخلايا، تكون مستويات الاستنساخ مرتفعة مع خلايا الورم A549 ومنخفضة مع الأورمات الليفية MRC5.

تم حث كل من تنشيط الخلية التائية مثلما قيس من خلال الزيادة المقننة للتعبير عن CD25 على سطح الخلية وإزالة حبيبات الخلية التائية بالمؤثر CD8، مثلما قيس من خلال الزيادة المقننة لـ CD107a على سطح الخلية، وإنتاج IFN الذي تم قياسه من خلال تلطيخ السيتوكين داخل الخلايا انتقائيًا من خلال الخلايا A549 المعالجة بـ NG-348 مقارنة بتلك المعالجة بـ EnAd، مع عدم التسبب في الحث بمساعدة المزارع المشتركة لـ MRC (الجدول 6).

الجدول 6. التحاليل بمقياس تدفق الخلايا لتنشيط الخلايا T +CD3 البشرية في الخلية التائية والمزارع المشتركة لـ PBMC مع الفيروسات

الخلايا	المعالجة	% من CD25+	%من CD8+CD107a+	% من IFN+
الخلايا T + A549	غير المعالجة	37.5	0.1	0.1
الخلايا T + A549	EnAd	38.4	0.1	0.2
الخلايا T + A549	NG-348	88.2	17.9	12.0
الخلايا T + MRC5	غير المعالجة	38.8	0.3	0.4
MRC5 + الخلايا التائية	EnAd	38.9	0.2	0.4

MRC5 + الخلايا التائية	NG-348	39.1	0.3	0.3
PBMCs + A549	غير المعالجة	28.3	غير محدد	غير محدد
PBMCs + A549	EnAd	29.4	غير محدد	غير محدد
PBMCs + A549	NG-348	73.7	غير محدد	غير محدد
PBMCs + MRC5	غير المعالجة	23.0	غير محدد	غير محدد
PBMCs + MRC5	EnAd	23.3	غير محدد	غير محدد
PBMCs + MRC5	NG-348	21.7	غير محدد	غير محدد

ND = غير محدد

تم إحصاء إفراز IFN في المواد الطافية من المزرعة المشتركة أيضًا بمساعدة ELISA. توضح البيانات (الشكل 41) بالمثل التنشيط الانتقائي للخلايا T المزروعة بشكل مشترك مع خلايا الورم A549 المعالجة بـ NG-348 وليس الأورمات الليفية MRC5، سواء مع الخلايا التائية التي تم تنقيتها أو PBMCs المستخدمة في الاختبارات.

تم تقييم قدرة NG-347 على تنشيط الخلايا التائية أيضًا من خلال قياس مستويات CD69 بالخلايا التائية من المزارع المشتركة إما للخلايا التائية التي تم تنقيتها أو PBMCs مع خلايا الورم A549 أو الأورمات الليفية MRC5. مثلما هو موضح في الجدول 7، تمت ملاحظة تحسن طفيف في الخلايا التائية الإيجابية تجاه CD69 مع خلايا الورم A549 المعالجة بـ NG-347 مقارنة بتلك المعالجة بـ EnAd، مما يؤدي في حد ذاته إلى الزيادة المقننة لمرقم التنشيط المبكر هذا. لم تلحظ هذه التأثيرات في المزارع المشتركة لـ MRC5. لم يتم الكشف عن التعبير عن CD80 بالخلايا التائية (غير موضحة).

الجدول 7. التعبير عن CD69 بالخلايا التائية من المزارع المشتركة المعالجة بـ NG-347 أو EnAd

الخلايا	المعالجة	% من +CD69
الخلايا T + A549	غير المعالجة	2.1
الخلايا T + A549	EnAd	18.7
الخلايا T + A549	NG-348	35.0
الخلايا T + MRC5	غير المعالجة	3.8
الخلايا T + MRC5	EnAd	3.6
الخلايا T + MRC5	NG-348	4.4
PBMCs + A549	غير المعالجة	1.2
PBMCs + A549	EnAd	19.1
PBMCs + A549	NG-348	28.7
PBMCs + MRC5	غير المعالجة	2.6
PBMCs + MRC5	EnAd	2.7
PBMCs + MRC5	NG-348	3.9

في تجربة منفصلة، أدت الخلايا A549 المعالجة بـ NG-347 والمزروعة بشكل مشترك مع الخلايا T +CD3 البشرية إلى الزيادة المقننة لمرقم تنشيط CD69 على الخلايا التائية وإفراز IFN (انظر الأشكال 24 و25).

المثال 24

تم عزل الخلايا الأحادية +CD14 من PBMCs من خلال فصل خرزات مغناطيسي مغلف بالجسم المضاد وزراعتها مع IL-4 وGM-CSF البشرية لتمييزها إلى خلايا متغصنة. بعد 3 أيام من المزرعة، تمت معالجة الخلايا بـ EnAd، NG-347 أو NG-348 عند 5000 جسيم لكل

خلية أو تم تركها غير معالجة. كمجموعة مقارنة إيجابية للتنشيط، تم حث بعض الخلايا بـ LPS. بعد يومان تم أخذ المواد الطافية من المزرعة لتحاليل ELISAs للسيتوكين وتم تلطيخ الخلايا للكشف عن التعبير عن مرقم التنشيط على سطح الخلية وتحليلها بمساعدة مقياس تدفق الخلايا. مثلما هو موضح في الجدول 8 قامت جميع الفيروسات بحثّ الزيادة المقننة للجزيئات CD80 و CD86 التحفيزية بشكل مشترك، مما يدل على أن تأثير تنشيط الخلية المناعية الفطرية بمساعدة جسيم المحدد مسبقًا هذا لم يتغير بإدخال الجين الناقل في جينومات NG-347 و NG-348. قامت جميع الفيروسات أيضًا بحثّ إفراز مستويات مشابهة من MIP1 و IFN (الشكل 42).

الجدول 8. تنشيط الخلايا المتغصنة البشرية الذي يسببه جسيم بمساعدة EnAd، NG-347 و NG-348

المعالجة بـ DC	% من +CD80	% من +CD86
غير المعالجة	3.0	10.4
EnAd	81.6	99.3
NG-347	82.1	99.4
NG-348	62.5	99.5
مجموعة مقارنة إيجابية تجاه LPS	97.5	98.5

المثال 25

في مجموعة من التجارب، تم استخدام الخلايا JurkatDual في مزارع مشتركة مع خلايا الورم كاختبار مرشد لتنشيط الخلية التائية لتقييم قابلية عمل التعبير عن الجين الناقل بمساعدة الفيروسات NG-347، NG-348 و NG-420، حيث يعمل EnAd كمجموعة مقارنة سلبية. تعبر الخلايا JurkatDual بثبات عن جينين مرشدين مختلفين: الجين المرشد NF B الذي ينتج صورة مفرزة من لوسيفيراز تستجيب لإرسال الإشارات عن طريق معقد مستقبل الخلية التائية وجين مرشد لفوسفتاز قلوي مفرز مستجيب لـ IFN (SEAP). تمت زراعة الخلايا A549 مسبقًا مع

الفيروسات عند '10 جسيم لكل خلية لمدة يومان، ثم تمت إضافة الخلايا JurkatDual لمزرعة مشتركة طوال الليل (18-24 ساعة) ثم المواد الطافية من المزرعة التي تم جمعها لاختبار نشاط لوسيفيراز وSEAP. مثلما هو موضح في الشكل 43، قامت الخلايا A549 المصابة بعدوى NG-347 انتقائيًا بحثّ إنتاج SEAP، الذي يتحاذى مع إنتاجها لـ IFN (انظر الشكل 11) لكن لم تحث نشاط لوسيفيراز. على العكس من ذلك، قام NG-348 الذي يعبر عن جسم مضاد لـ ScFv-CD3 بغشاء الخلية لتنشيط معقد مستقبل الخلية التائية بحثّ لوسيفيراز لكن ليس SEAP.

في تجربة أخرى تمت زراعة خلايا سرطانة الرئة A549 وHCT-116، خلايا سرطانة القولون HT-29 & DLD مسبقًا لمدة 48 ساعة مع 10 جسيم لكل خلية من الفيروسات EnAd، NG-347، NG-348 أو NG-420 قبل الزراعة المشتركة مع الخلايا JurkatDual طوال الليل، مع اختبار المواد الطافية من المزرعة للكشف عن مستويات لوسيفيراز لتحديد مستوى التنشيط المستحث. مثلما هو موضح في الشكل 44، جميع قامت أنواع خلايا الورم الأربعة المزروعة مع الفيروسات NG-348 أو NG-420، التي تشفِّر جسم مضاد لـ ScFv-CD3 على سطح الخلية، بتنشيط الخلايا JurkatDual بينما لم يقم EnAd وNG-347 بذلك، مع مستويات لوسيفيراز مشابهة لتلك الخاصة بمجموعات خلايا الورم المقارنة (UIC) غير المصابة بالعدوى.

في تجربة أخرى، تمت زراعة خلايا الورم A549 أو HT-29مسبقًا مع كميات مختلفة إما من NG-348 أو NG-420 قبل إضافة الخلايا JurkatDual وقياس إفرازها للوسيفيراز. توضح البيانات في الشكل 45 أن تفعيل نشاط NFB في الخلايا JurkatDual يعتمد على جرعة الفيروس المستخدمة لمعالجة خلايا الورم.

المثال 26

تمت مقارنة أنشطة الحركيات الدوائية في جسم الكائن الحي، التوزيع الحيوي وحث السيتوكين بأجهزة الجسم والذي يسببه جسيم لـ EnAd وNG-348 بعد إعطاء جرعة داخل الوريد في الفئران CD1 المؤهلة مناعيًا، تم إعطاء جرعة إلى الفئران داخل الوريد من 5×10 9 جسيم إما من EnAd أو NG-348 وتعريضها لنزيف لمدة 2، 10، 30، 60 و120 دقيقة بعد إعطاء الجرعة. كان الدم بالكامل عبارة عن DNA تم استخلاصه وتحليله بمساعدة qPCR للكشف عن مستويات

جينوم الفيروس (الشكل 46). اتبعت تصفية كل من الفيروسات من الدم حركيات مشابهة. بالمثل، كان حث استجابة السيتوكين MCP-1 (إجراء يتمثل في تنشيط يسببه جسيم لخلايا المناعة الفطرية مثل الخلايا Kupffer بالكبد) مشابهًا أيضًا لكل من الفيروسات، كما كانت أنماط التوزيع الحيوي للأنسجة (الشكل 46).

المثال 27

تم غرس الخلايا HCT116 تحت جلد الفئران CB17 SCID وحقنها داخل الورم (IT) أو داخل الوريد (IV) مع الفيروسات EnAd، NG-347 أو NG-348 (5×10 9 من جسيمات الفيروس)، أو مجموعة المقارنة، بمجرد أن أصبحت الأورام أكبر من 70 مللي متر3. بالنسبة للفئران التي أعطيت جرعة داخل الوريد، تم أخذ عينات الدم من ثلاثة فئران من كل مجموعة بعد 3، 15 و30 دقيقة من إعطاء جرعة داخل الوريد، DNA المستخلص ومستوى جينومات الفيروس في الدم الذي تم تقييمه بمساعدة qPCR (تحليل الحركيات الدوائية [PK]). توضح البيانات (الشكل 47) أن NG-347 وNG-348 يتسمان بـ PK مشابهة لحركيات EnAd (ولبعضها البعض). بعد 6 ساعات، تم قطع الأورام، الأكباد، الرئات والطحالات من 3 فئران من كل مجموعة. كانت الأنسجة التي تمت مجانستها عبارة عن DNA تم استخلاصه وتحليله للكشف عن مستوى جينومات الفيروس بمساعدة qPCR (تحليل التوزيع الحيوي). توضح البيانات (الشكل 48أ) توزيع حيوي متشابه لأنسجة الفيروسات الثلاثة. بعد 7 أيام أو 14-21 يوم، تم استئصال الأورام من ثلاثة فئران من كل مجموعة ومجانستها لإنتاج ناتج تحلل للورم تم استخدامه لتحضير كل من DNA وRNA. تم قياس مستوى جينومات الفيروس في الأورام عند اثنتين من النقاط الزمنية بمساعدة التحاليل qPCR لـ DNA الذي تم استخلاصه. توضح البيانات (الشكل 48ب) أن الأورام من كل من الفئران التي أعطيت جرعة داخل الوريد وIT اتسمت بمستويات لجينومات الفيروس أعلى من كمية الفيروس المعطاة، مما يدل على أن استنساخ الفيروس في النسيج، مع إعطاء جرعة داخل الورم يعطي مستويات أعلى من الجينوم من جرعة داخل الوريد عند اليوم 7، لكن تكون كل منها بالمثل مرتفعة عند إطار زمني يتراوح من 14-21 يوم. تم استنساخ جميع الفيروسات الثلاثة إلى مستويات مشابهة.

بالمثل، كانت مستويات mRNA لهكسون الفيروس في نواتج تحلل الورم التي تم الكشف عنها من خلال RT-qPCR قابلة للمقارنة بين EnAd، NG-347 وNG-348 عند كل من النقاط الزمنية التي تم اختبارها (الأشكال 49 و50). تم الكشف عن مستويات مشابهة من الجسم المضاد لـ ScFv-CD3 وmRNA لـ CD80 عند كل من النقاط الزمنية وكل من طرق إعطاء الجرعات للمعالجة بـ NG-348، مع فقط قراءات خلفية الاختبار عند إعطاء جرعة من EnAd (الشكل 50 و51). تم الكشف عن مستويات mRNA لـ MIP1 وIFN انتقائيًا أيضًا بعد إعطاء جرعة من NG-347، إما داخل الورم أو داخل الوريد (الشكل 52).

تم قياس مستويات البروتين CD80 المشفَّر من خلال كل من NG-347 وNG-348، والبروتين MIP1a المشفَّر من خلال NG-347 في نواتج تحلل الورم باستخدام ELISAs نوعية. توضح البيانات في الشكل 53 أن بعد جرعة داخل الوريد مفردة من الفيروس، يمكن الكشف أيضًا عن كل من البروتينات انتقائيًا في نواتج استخلاص الورم. لم يتم الكشف عن أي من البروتينات في عينات الدم من نفس الفئران.

المثال 28

لتقييم نشاط واعتمادية خلية الورم للفيروس NG-348 في جسم الكائن الحي، تم حقن توليفة مختلفة من PBMCs البشرية (5×10 7 خلية)، خلايا الورم A549 البشرية (5×10 6) وأي من EnAd أو NG-348 (عند 5×10 9 جسيم لكل خلية) في صفاق فئران SCID-beige ناقصة المناعة، مع إعطاء جرعة من الفيروسات أو مجموعة المقارنة (محلول ملحي) في غضون 15 دقيقة بعد حقن الخلايا. بعد 3 أيام، تم غسل التجويف الصفاقي بكمية تبلغ 5 ملليلتر من محلول ملحي وتم تحليل الخلايا التي تم استخلاصها من خلال تحاليل مقياس تدفق الخلايا مع مجموعة مرقمات تنشيط الخلية التائية (CD25، CD69 وHLA-DR) لتقييم مستويات تنشيط الخلية التائية، بعد الإمرار الانتقائي على مجموعة الخلايا T +CD3. توضح البيانات من اثنتين من التجارب المنفصلة (الجدول 9) أن NG-348 يؤدي انتقائيًا إلى تنشيط الخلية التائية البشرية في جسم الكائن الحي بطريقة تعتمد على خلايا الورم.

الجدول 9.

تنشيط الخلايا التائية البشرية في جسم الكائن الحي في الفئران التي تحمل الورم A549 بواسطة NG-348

المجموعة	الفيروس	الورم	N	% من CD25+	% CD69+	% من DR+	% من CD25+، CD69+	% من CD25+، DR+
التجربة 1								
1	EnAd	محلول ملحي	2	1.9، 2.3	1.6، 3.0	7.7، 9.1	0.2، 0.5	0.3، 0.6
2	EnAd	6 10×5 من الخلايا A549	2	4.2، 2.9	6.2، 5.5	8.4، 8.4	0.8، 0.3	1.4، 0.4
3	NG-348	محلول ملحي	1	3.4	2.6	9.2	0.5	0.8
4	NG-348	6 10×5 من الخلايا A549	2	35.8، 36.6	50.4، 42.2	26.3، 19.2	22.4، 18.0	16.4، 12.2
التجربة 2								
1	محلول ملحي	محلول ملحي	1	25.6	37.3	14.8	14.1	7.08
2	EnAd	محلول ملحي	2	6.5، 7.3	17.8، 18.2	5.50، 6.1	3.58، 3.46	1.01، 1.49

3	NG-348	محلول ملحي	2	10.2، 6.5	26.7، 18.3	7.7، 6.0	6.73، 3.61	2.16، 1.44
4	محلول ملحي	6 10×5 من الخلايا A549	2	28.4، 22.7	54.4، 51.1	13.3 15.0	22.3 17.5	8.54، 7.72
5	EnAd	6 10×5 من الخلايا A549	1	13.2	29.4	5.1	7.84	1.62
6	NG-348	6 10×5 من الخلايا A549	3	34.4، 29.6، 56.4	58.9، 59.2، 85.0	12.5 9.8، 17.0	27.2، 23.3، 52.7	9.07 7.5، 14.2

عناصر الحماية

1- فيروس غدي حال للورم من المجموعة "ب" replication competent oncolytic group B adenovirus يقوم بالنسخ بانتقائية تجاه الخلايا السرطانية cancer cells، حيث يشتمل الفيروس الغدي على جين ناقل transgene تحت تحكم معزز داخلي promoter endogenous للفيروس، حيث يشتمل الجين الناقل transgene على متوالية الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) تشفِّر بروتين B7 protein أو شظية نشطة active fragment منه، و
يوجد الجين الناقل transgene المذكور بين موقع التعرف على رامزة الإنهاء-بولي A stop codon-polyA للجين L5 من الفيروس الغدي adenovirus وموقع التعرف على رامزة الإنهاء- stop codon- بولي A polyA للجين E4 من الفيروس الغدي adenovirus ، حيث يقع الجين الناقل transgene تحت سيطرة المعزز المتأخر الرئيسي داخلي المنشأ.

2- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يتم اختيار البروتين B7 protein أو شظية نشطة active fragment منه على حدة من المجموعة التي تشتمل على B7-1، B7-2، B7-DC، B7-H1، B7-H2، B7-H3، B7-H4، B7-H5 وB7-H6.

3- فيروس حال للورم oncolytic virus يقوم بالنسخ وفقًا لعنصر الحماية 2، حيث يكون البروتين B7 protein عبارة عن B7-1.

4- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يكون الفيروس عبارة عن فيروس خيمري chimeric virus.

5- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 4، حيث تكون السلسلة الرئيسية الخاصة بالفيروس عبارة عن enadenotucirev.

6- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 5، حيث يكون للفيروس صيغة (I):

(I) 5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR

يشتمل B_1 على: E1A، E1B أو E1A-E1B؛

يكون B_A عبارة عن E2B-L1-L2-L3-E2A-L4؛

يكون B_2 غير موجود أو يشتمل على E3 أو جين ناقل transgene تحت سيطرة معزز داخلي المنشأ أو خارجي المنشأ.

يكون B_X غير موجود أو عبارة عن متوالية Deoxyribonucleic acid (DNA) تشتمل على: موقع تقييد، واحد أو اكثر من جينات ناقلة أو كليهما؛

يشتمل B_B على L5؛

يشتمل B_Y على جين ناقل transgene يشفِّر بروتين B7 protein أو شظية نشطة active fragment منه؛ و

يكون B_3 غير موجود أو يشتمل على E4.

7- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يشتمل البروتين B7 protein أو شظية نشطة active fragment منه على متوالية عابرة للأغشية تم اختيارها من مجموعة تشتمل على نطاق عابر للأغشية من مستقبل عامل نمو مشتق من الصفيحات Platelet-derived growth factor (PDGF)، أو جزيء تثبيت جليكوسيل فوسفاتيديل إناسيتول Glycosylphosphatidylinositol (GPI) مناسب لتثبيت البروتين protein أو الشظية fragment في غشاء الخلية cell membrane.

8- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 1، يشتمل ايضا على جين ناقل transgene ثاني يشفِّر بولي ببتيد polypeptide مختار من المجموعة التي تشتمل على سيتوكين cytokine، كيموكين chemokine، جزيء جسم مضاد مناهض أو شظية الارتباط بالجسم antibody binding fragment المضاد منه، وجزيء جسم مضاد مساعد أو شظية الارتباط بالجسم antibody binding fragment المضاد منه.

9- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 1، الذي يشتمل على جينات ناقلة transgene ثانية وثالثة تشفِّر بولي ببتيدين polypeptides مختلفين مختارين من المجموعة التي تشتمل على سيتوكين cytokine، كيموكين chemokine، جزيء جسم مضاد مناهض أو شظية الارتباط بالجسم المضاد antibody binding fragment منه، وجزيء جسم مضاد مساعد أو شظية الارتباط بالجسم المضاد antibody binding fragment منه.

10- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 9، حيث يشفِّر الجين الناقل transgene الثاني أو الثالث سيتوكين cytokine، مختار من المجموعة التي تشتمل على IL-2، IFN-ألفا، IFN-بيتا، IFN-جاما، المركب الترابطي Flt3، GM-CSF، IL-15، وIL-12.

11- فيروس حال للورم oncolytic virus يقوم بالنسخ وفقًا لعنصر الحماية 9، حيث يشفِّر الجين الناقل transgene الثاني أو الثالث كيموكين chemokine، مختار من المجموعة التي تشتمل على MIP-1 ألفا، IL-8، CCL5، CCL17، CCL20، CCL22، CXCL9، CXCL10، CXCL11، CXCL13، CXCL12، CCL2، CCL19 وCCL21.

12- فيروس حال للورم oncolytic virus يقوم بالنسخ وفقًا لعنصر الحماية 8، حيث يتم اختيار توليفة سيتوكين cytokine وكيموكين chemokine من خلال الفيروس المختار من المجموعة التي تشتمل على المركب الترابطي MIP1α وFlt3، وMIP1α وIFNα.

13- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يشفِّر الفيروس جزيء جسم مضاد أو شظية منه.

14- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 13، حيث يشتمل جزيء الجسم المضاد أو شظية الجسم المضاد على متوالية عابرة

للأغشية أو جزيء تثبيت جليكوسيل فوسفاتيديل إناسيتول Glycosylphosphatidylinositol (GPI) بحيث يكون عبارة عن صورة مثبتة بغشاء الخلية أو نطاق عابر للأغشية.

15- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 13، حيث يشتمل جزيء الجسم المضاد أو شظية الجسم المضاد على نطاق ربط مولد ضد جسم مضاد لـ CD3 البشري.

16- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 13، حيث يكون جزيء الجسم المضاد عبارة عن مثبط يتم اختياره من المجموعة التي تشتمل على جزيء جسم مضاد لعامل النمو البطاني الوعائي Vascular endothelial growth factor (VEGF)، و جزيء جسم مضاد لـ CTLA-4.

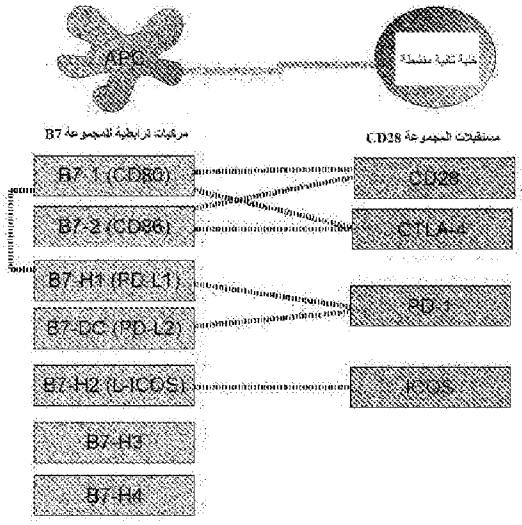
17- فيروس حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic virus وفقًا لعنصر الحماية 13، حيث يكون جزيء الجسم المضاد عبارة عن جزيء مساعد يتم اختياره من المجموعة التي تشتمل على CD40، GITR، OX40، CD27 و4-1BB.

18- تركيبة صيدلية تشتمل على عملية استنساخ تشتمل على فيروس غدي حال للورم يقوم بالنسخ replication competent oncolytic adenovirus وفقًا لعنصر الحماية 1، وعامل مخفف أو عامل حامل.

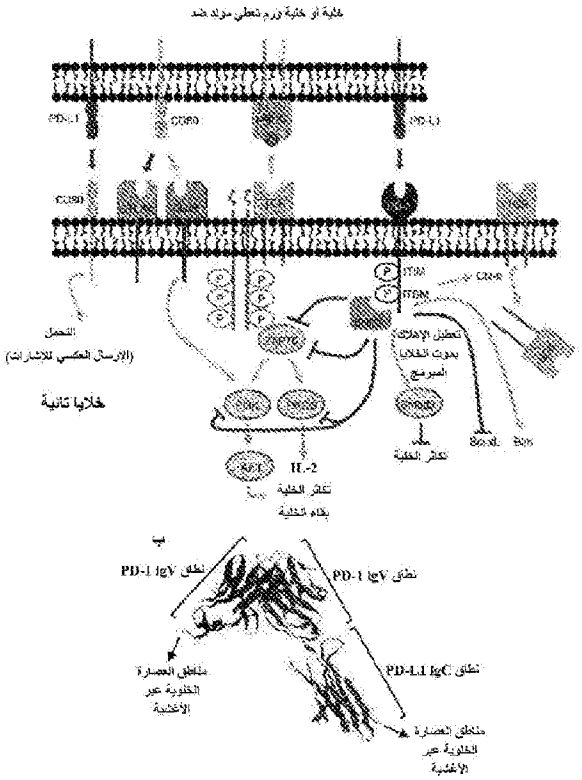
19- فيروس غدي adenovirus يقوم بالنسخ وفقًا لعنصر الحماية 1 للاستخدام في العلاج.

20- تركيبة صيدلية وفقًا لعنصر الحماية 18 للاستخدام في العلاج.

21- طريقة لإنتاج فيروس غدي يقوم بالنسخ replication competent adenovirus وفقًا لعنصر الحماية 1 تشتمل على الاستنساخ في خلية عائلة host cell.

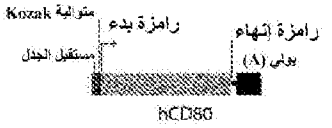

APC
خلية تائية منشطة
مركبات ترابطية للمجموعة B7
مستقبلات المجموعة CD28
B7-1 (CD80)
B7-2 (CD86)
B7-H1 (PD-L1)
B7-DC (PD-L2)
B7-H2 (L-ICOS)
B7-H3
B7-H4
CD28
CTLA-4
PD-1
ICOS

شكل ٢

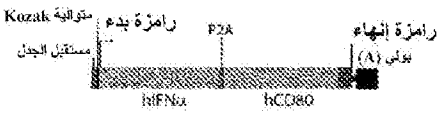

خلايا تائية
التحمل
(الإرسال العكسي للإشارات)
تكاثر الخلية
IL-2
تكاثر الخلية
بقاء الخلية
PD-1 IgV تطابق
PD-1 IgV تطابق
PD-L1 IgC تطابق
مناطق العصارة الخلوية غير الأغشية
مناطق العصارة الخلوية غير الأغشية

شكل ١

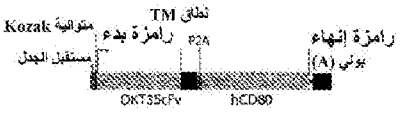
شكل ٣أ



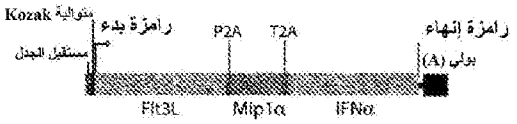
شكل ٣ب



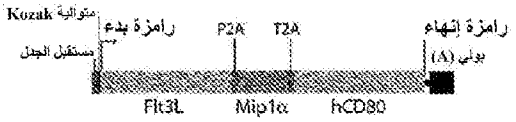
شكل ٣جـ



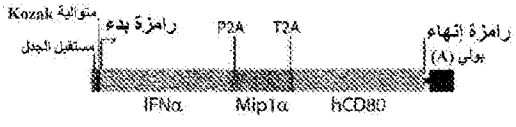
شكل ٣د



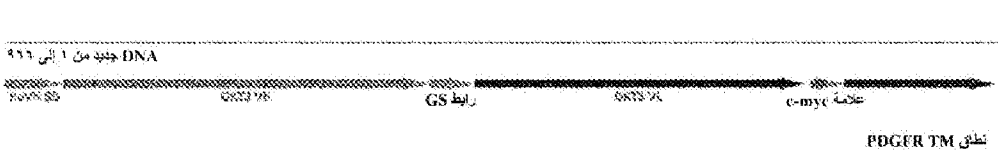
شكل ٣هـ

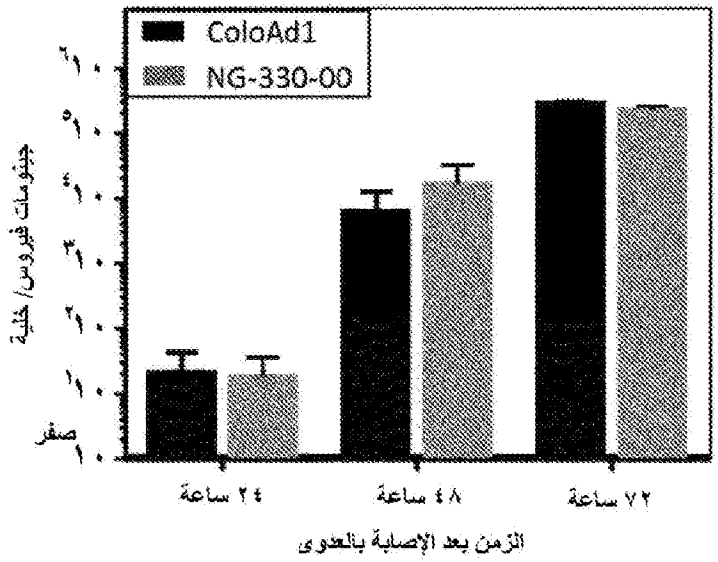


شكل ٣و

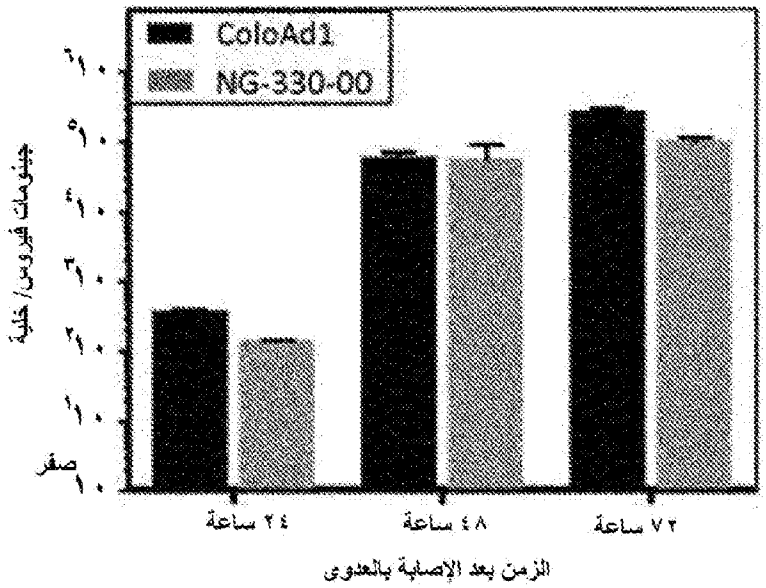


شكل ٣ز

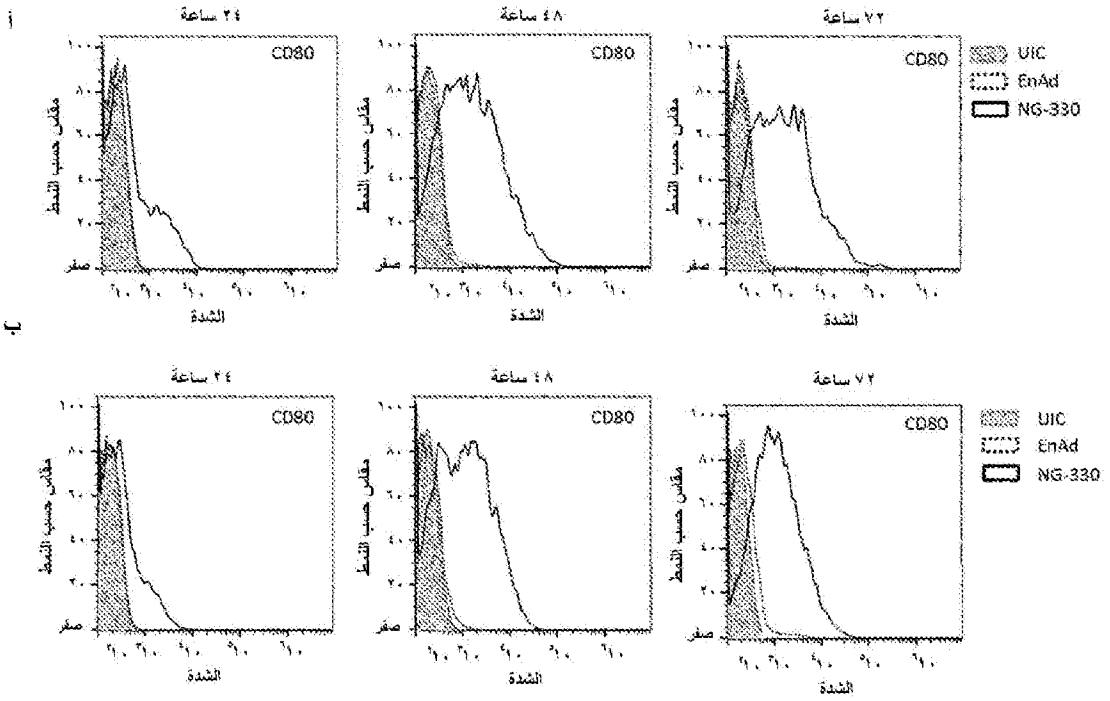



ColoAd1
NG-330-00
جينومات فيروس/ خلية
صفر
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى

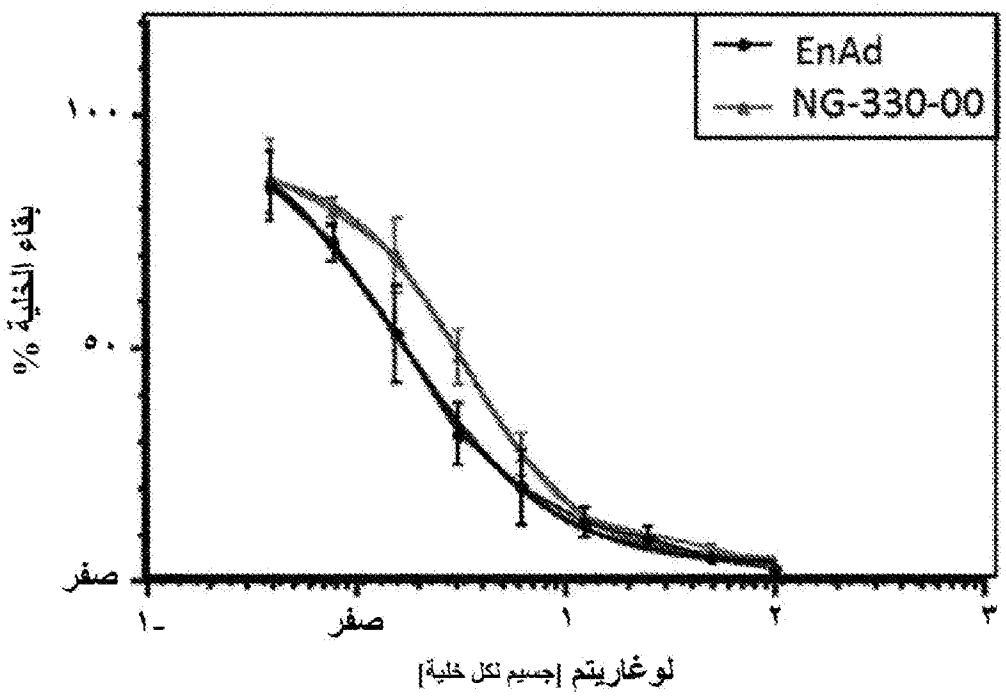
شكل ٤أ


ColoAd1
NG-330-00
جينومات فيروس/ خلية
صفر
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى

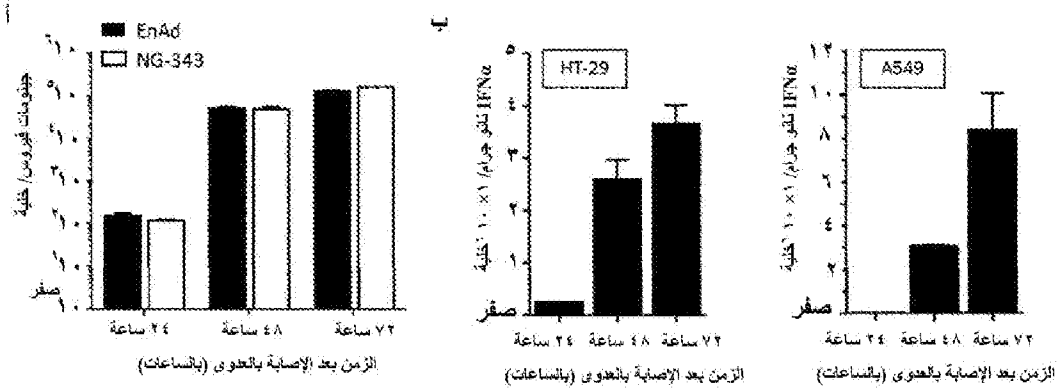
شكل ٤ب


أ
ب
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
CD80
مقاس حسب النمط
الشدة
صفر
UIC
EnAd
NG-330

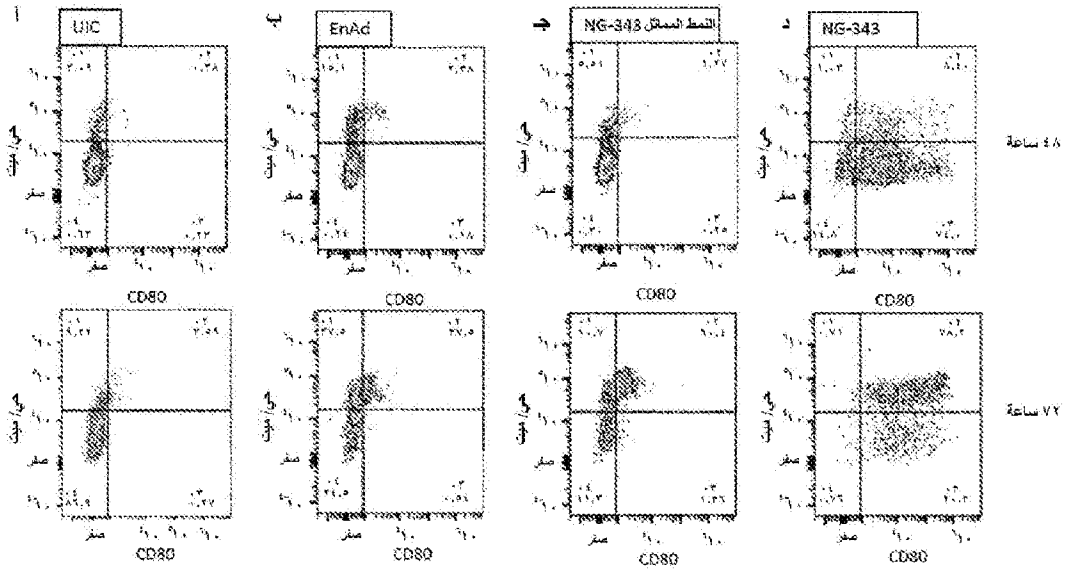
شكل ٥


EnAd
NG-330-00
١٠٠
٥٠
صفر
بقاء الخلية %
١-
صفر
١
٢
٣
لوغاريتم [جسيم لكل خلية]

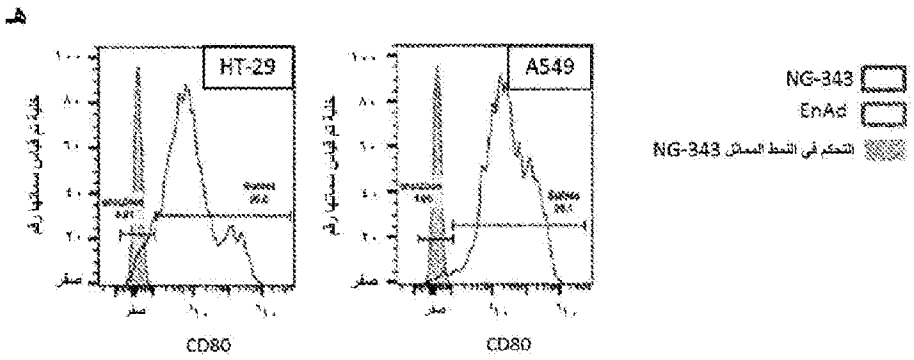
شكل ٦


أ
EnAd
NG-343
جزيئات فيروس/ خلية
صفر
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
ب
HT-29
IFNα نانو جرام/ ١٠ × ١ خلية
صفر
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
A549
IFNα نانو جرام/ ١٠ × ١ خلية
صفر
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)

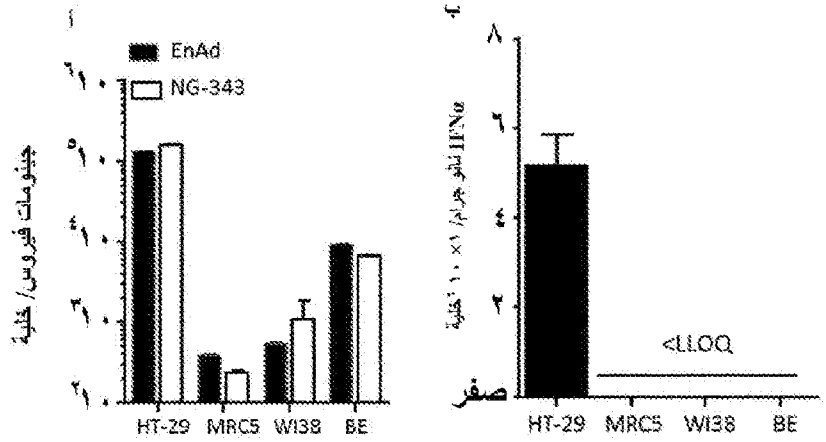
شكل ٧



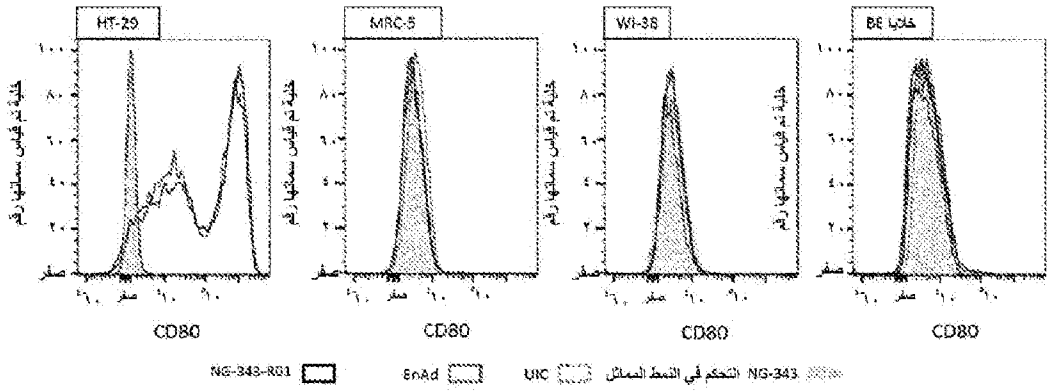
شكل ٨



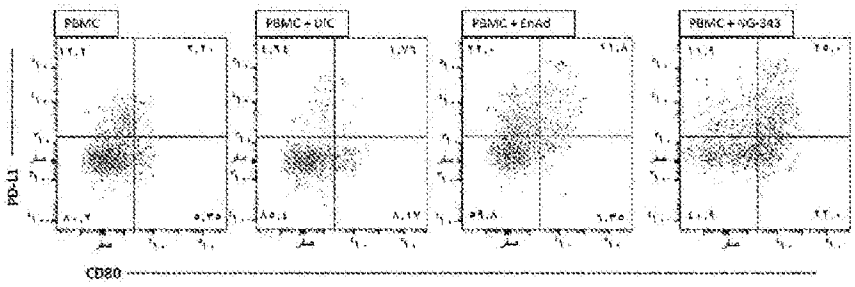
شكل ٨ يتبع



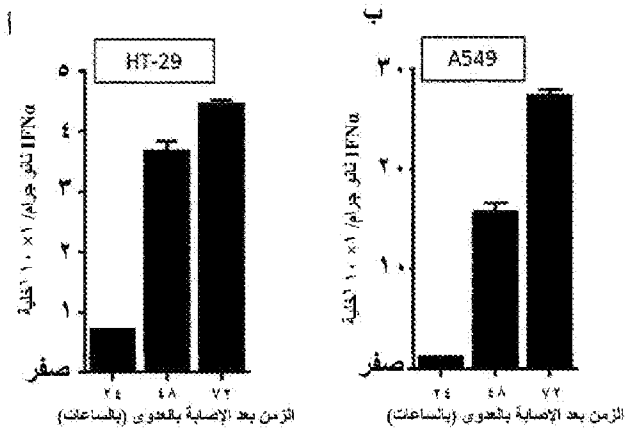
شكل ٩أوب



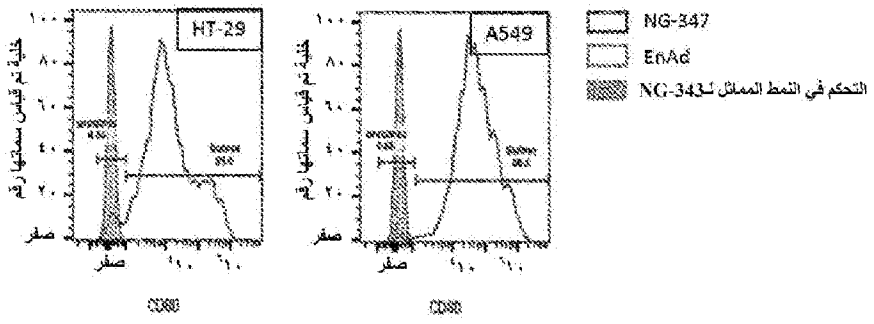
شكل ٩جـ



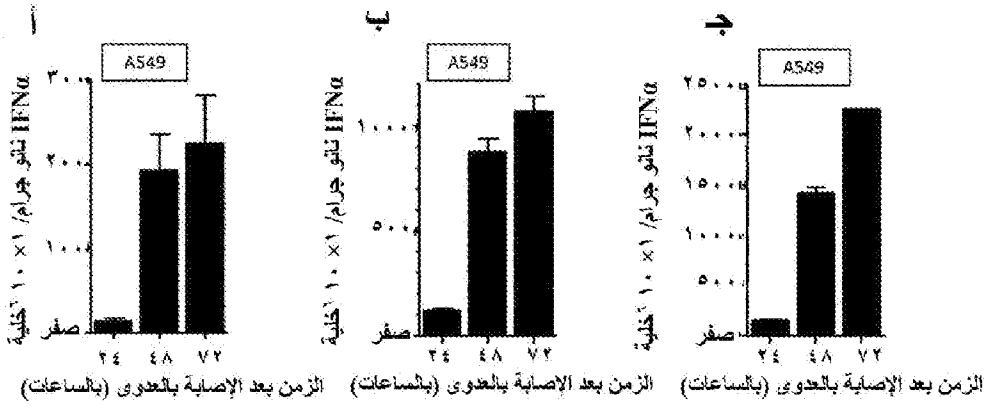
شكل ١٠



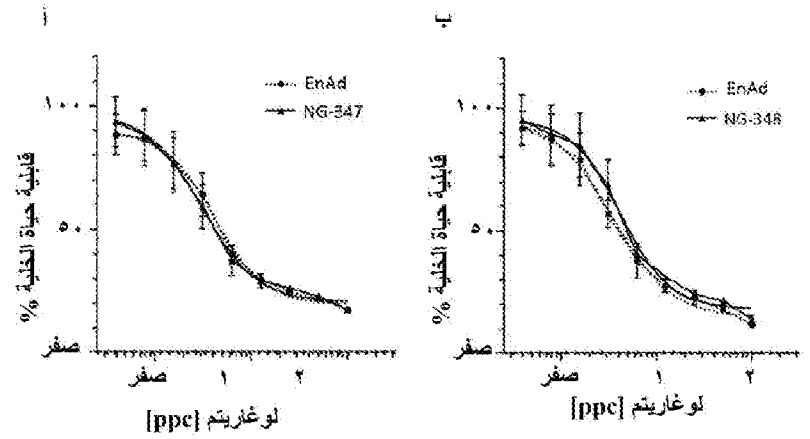
شكل ١١أ وب



شكل ١١جـ



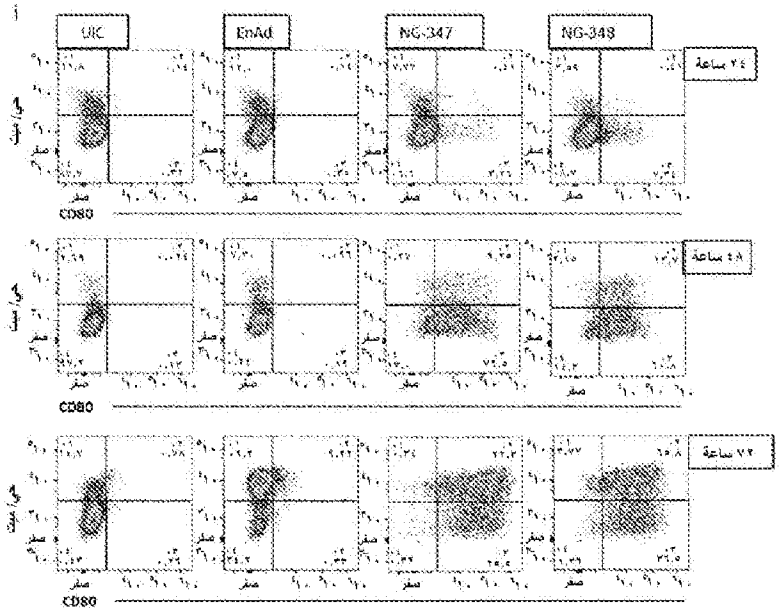
شكل ١٢



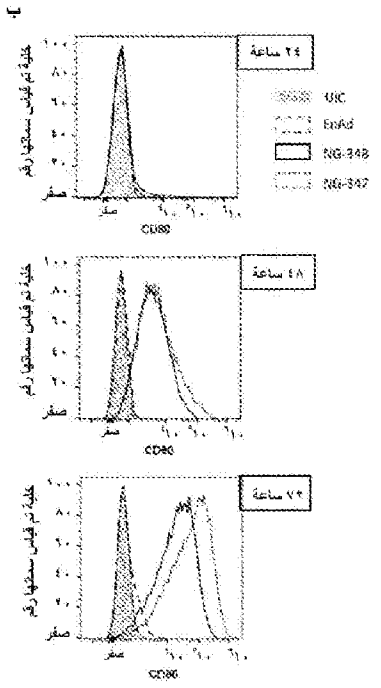
جـ

فيروس	العيار (بروتين فيروسي/ ملليلتر)	عيار معدي (وحدة معدية/ ملليلتر)	نسبة قابلية العدوى (I :P)
EnAd (المرجع ١)	3e12	7.83e10	٣٨,٣
EnAd (المرجع ٢)	3e12	9.37e10	٣٢,٠
NG-347	3.78e12	1.67e11	٢٢,٧
NG-348	6.68e12	3.31e11	٢٠,٢

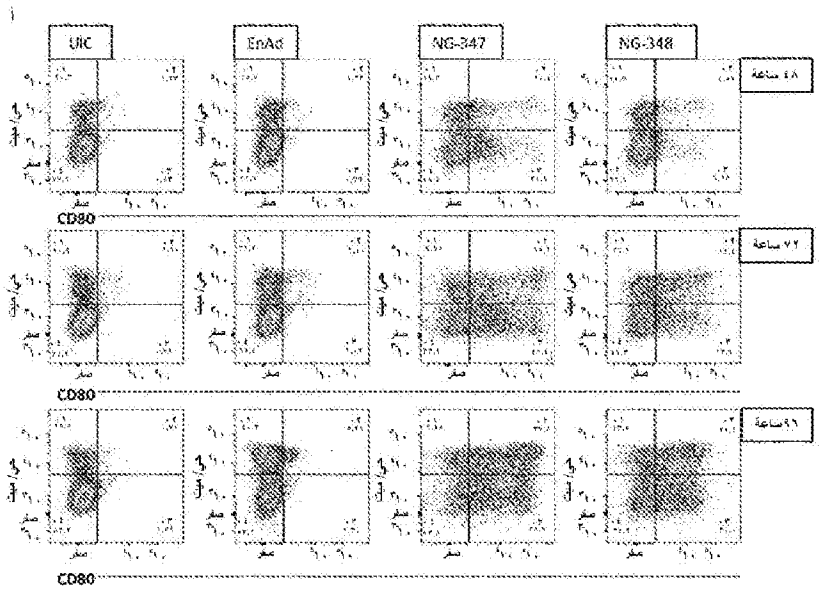
شكل ١٣



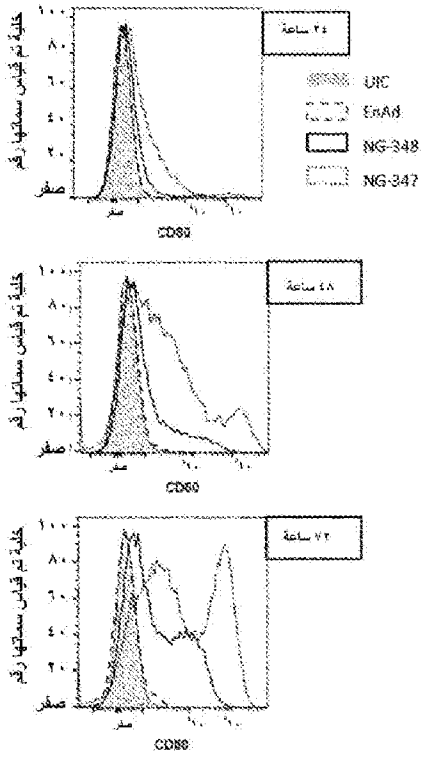
شكل ١٤أ



شكل ١٤ب

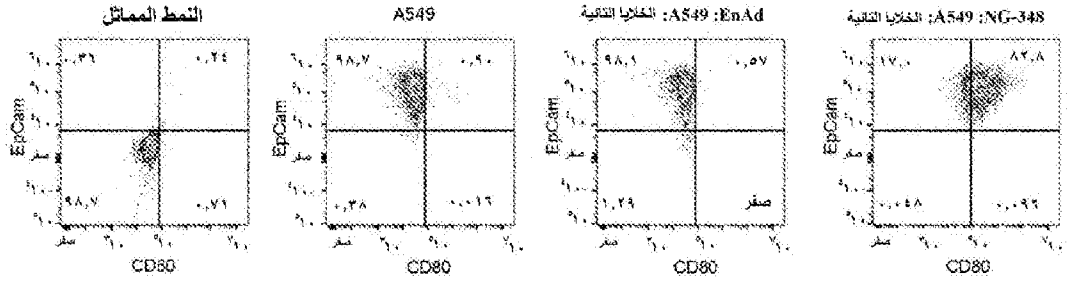


شكل ١٥أ

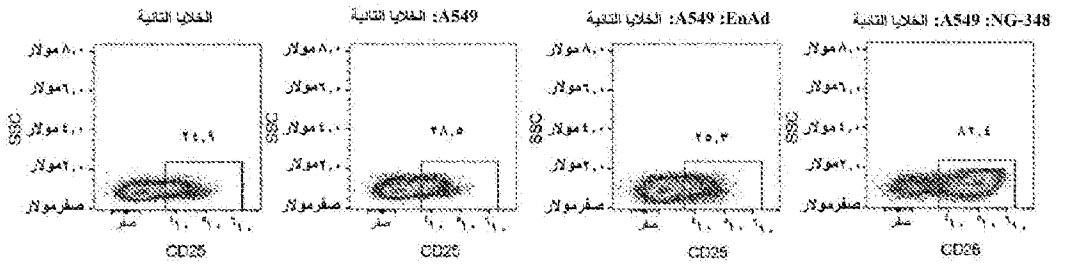


شكل ١٥ب

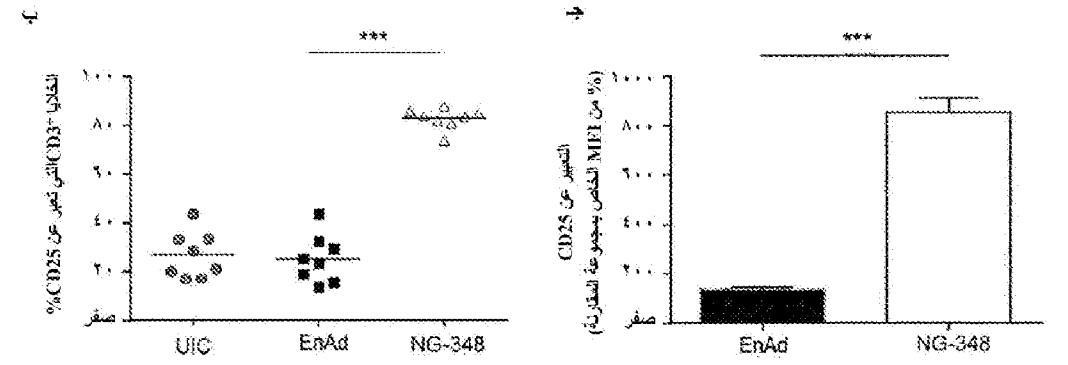
شكل ١٦



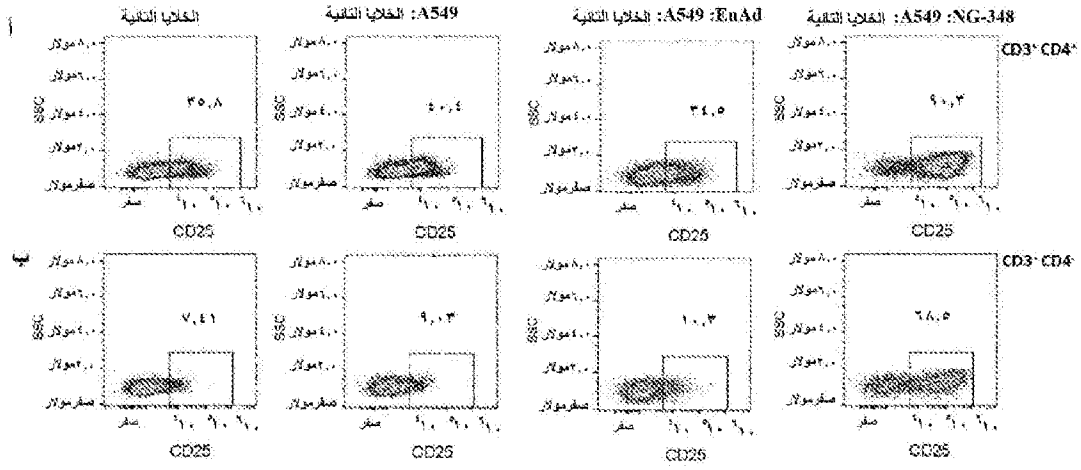
شكل ١٧أ



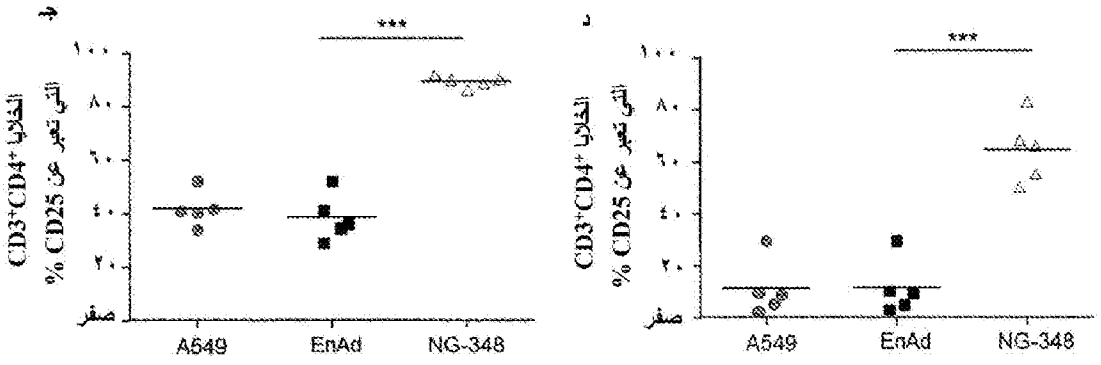
شكل ١٧ب و جـ



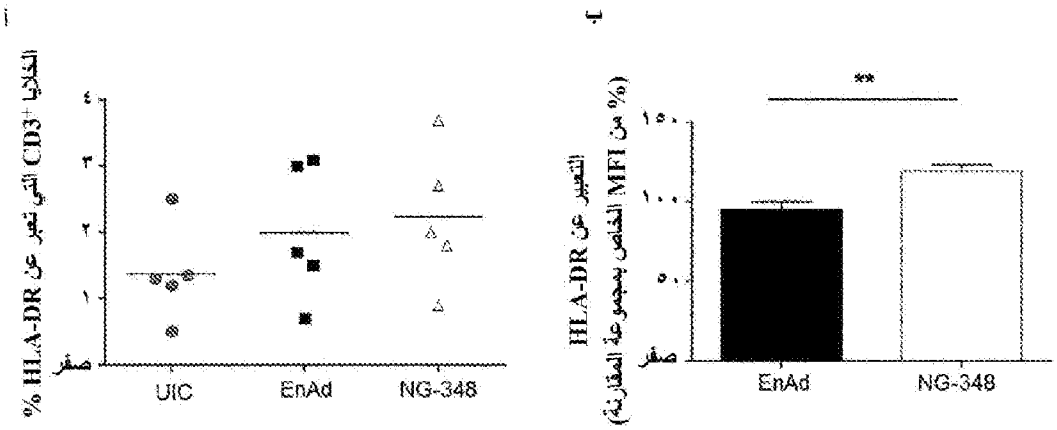
شكل ١٨أ و ب



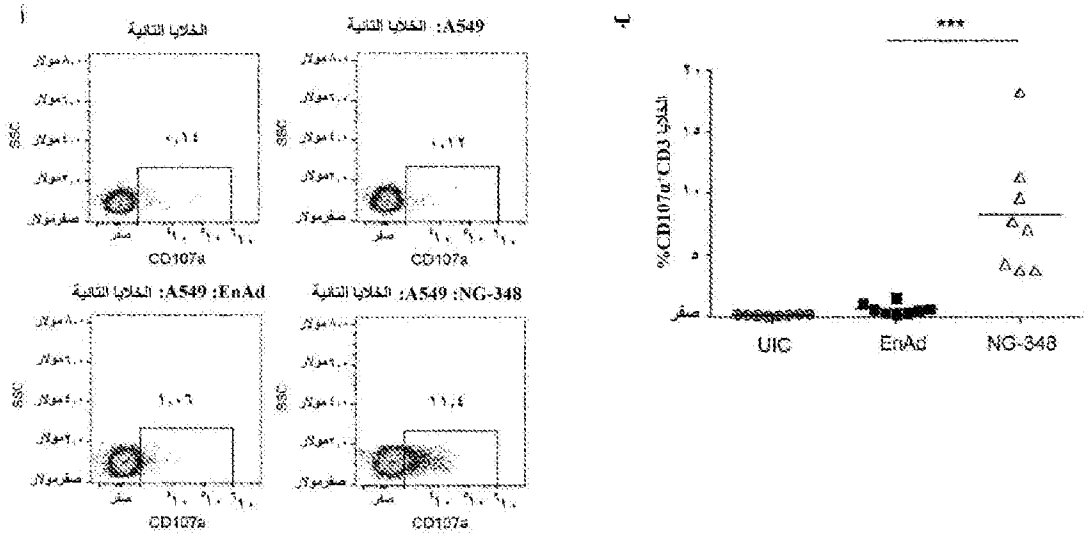
شكل ١٨جـ و د



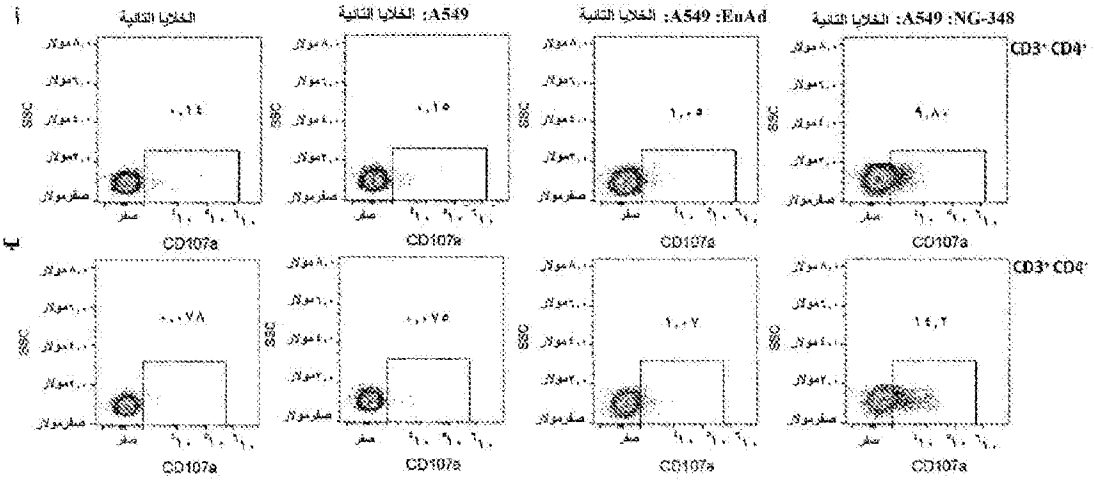
شكل ١٩



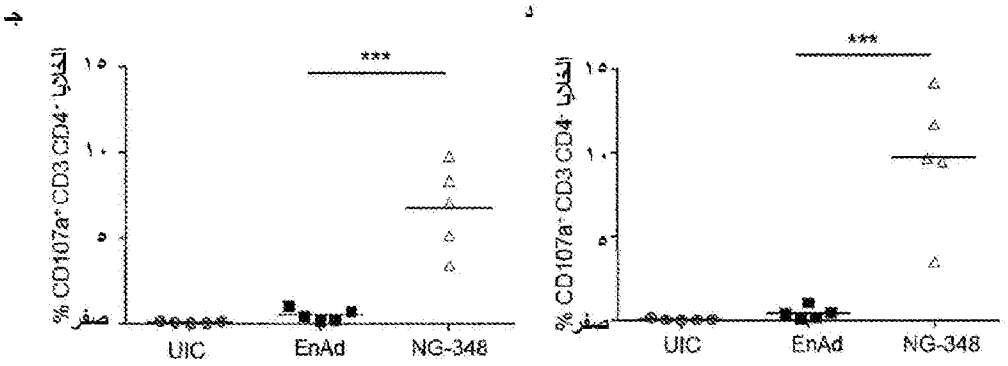
شكل ٢٠أوب



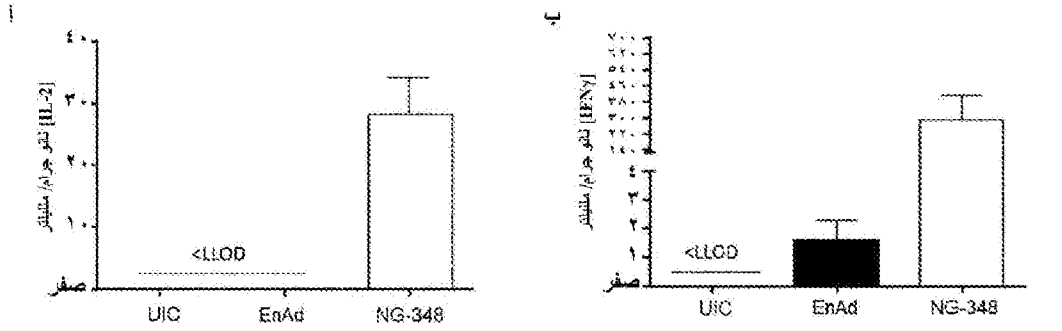
شكل ٢١أ وب



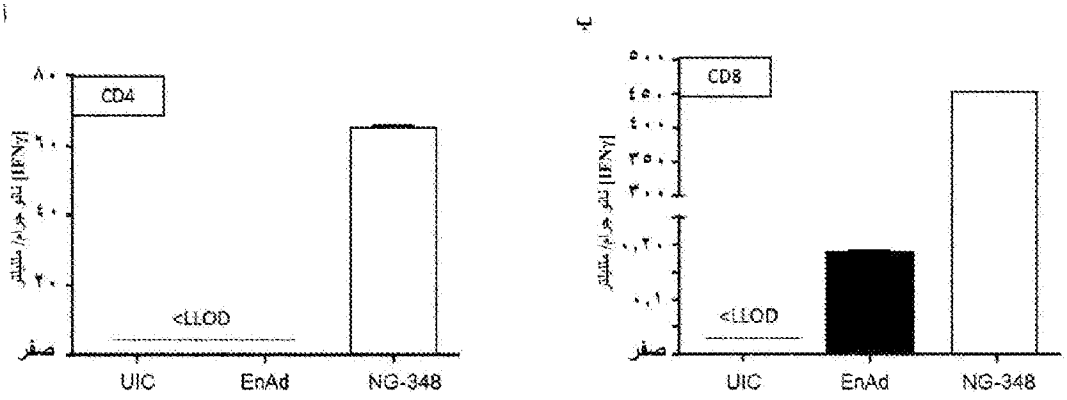
شكل ٢١جـ و د



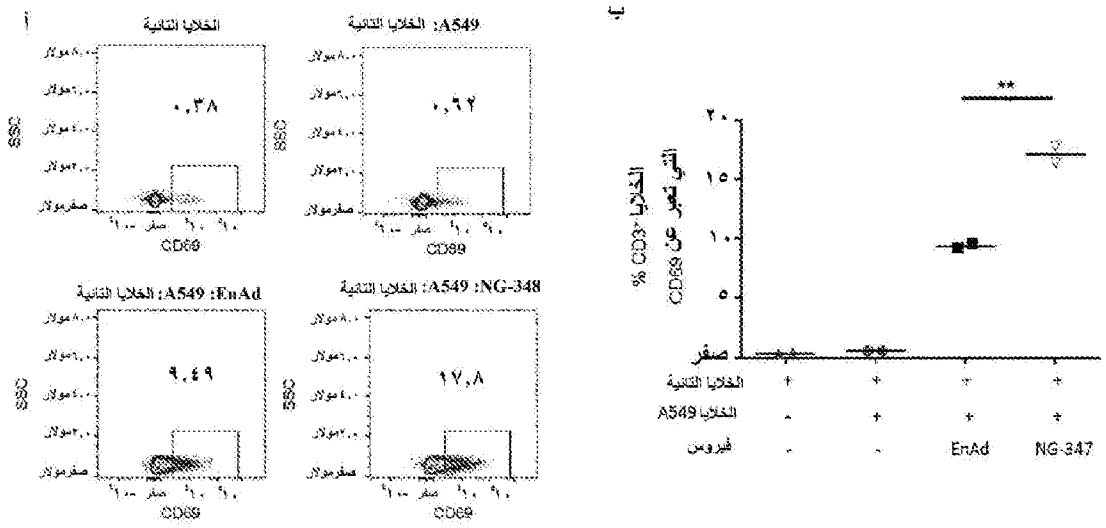
شكل ٢٢


أ
٤٠
٣٠
٢٠
١٠
صفر
[IL-2] نانو جرام/ مليلتر
<LLOD
UIC
EnAd
NG-348
ب
[IFNγ] نانو جرام/ مليلتر
<LLOD
UIC
EnAd
NG-348

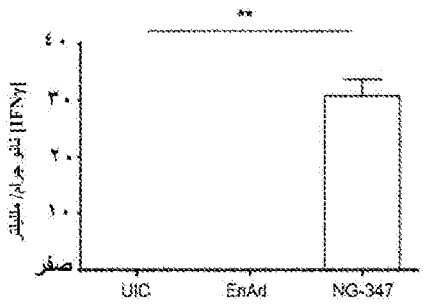
شكل ٢٣


أ
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
صفر
[IFNγ] نانو جرام/ مليلتر
CD4
<LLOD
UIC
EnAd
NG-348
ب
٥٠
٤٥
٤٠
٣٥
٣٠
٠,٣
٠,١
صفر
[IFNγ] نانو جرام/ مليلتر
CD8
<LLOD
UIC
EnAd
NG-348

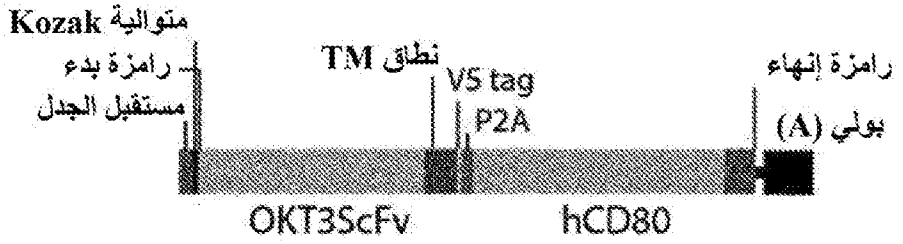
شكل ٢٤


أ
الخلايا الثانية
٠,٣٨
SSC
CD69
الخلايا الثانية :A549
٠,٦٢
الخلايا الثانية :A549 :EnAd
٩,٤٩
الخلايا الثانية :A549 :NG-348
١٧,٨
ب
% CD3+ الخلايا التي تعبر عن CD69
صفر
٥
١٠
١٥
٢٠
**
الخلايا الثانية
الخلايا A549
فيروس
EnAd
NG-347

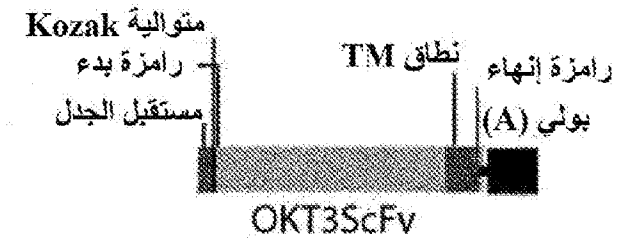
شكل ٢٥


**
٤٠
٣٠
٢٠
١٠
صفر
[IFNγ] نانو جرام/ ملليلتر
UIC
EnAd
NG-347

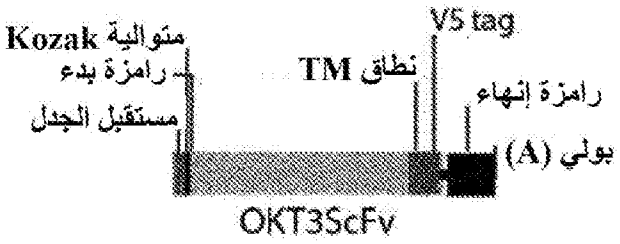
أ


متوالية Kozak
رامزة بدء
مستقبل الجدل
نطاق TM
V5 tag
P2A
رامزة إنهاء
بولي (A)
OKT3ScFv
hCD80

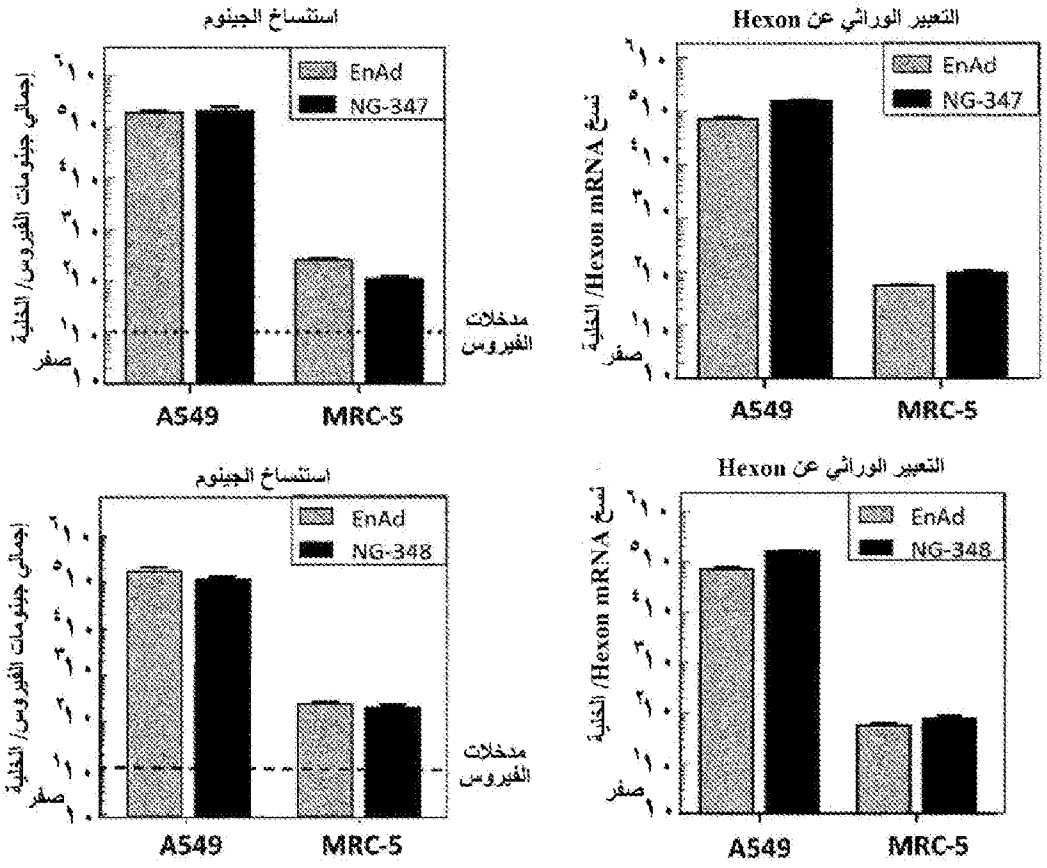
ب


متوالية Kozak
رامزة بدء
مستقبل الجدل
نطاق TM
رامزة إنهاء
بولي (A)
OKT3ScFv

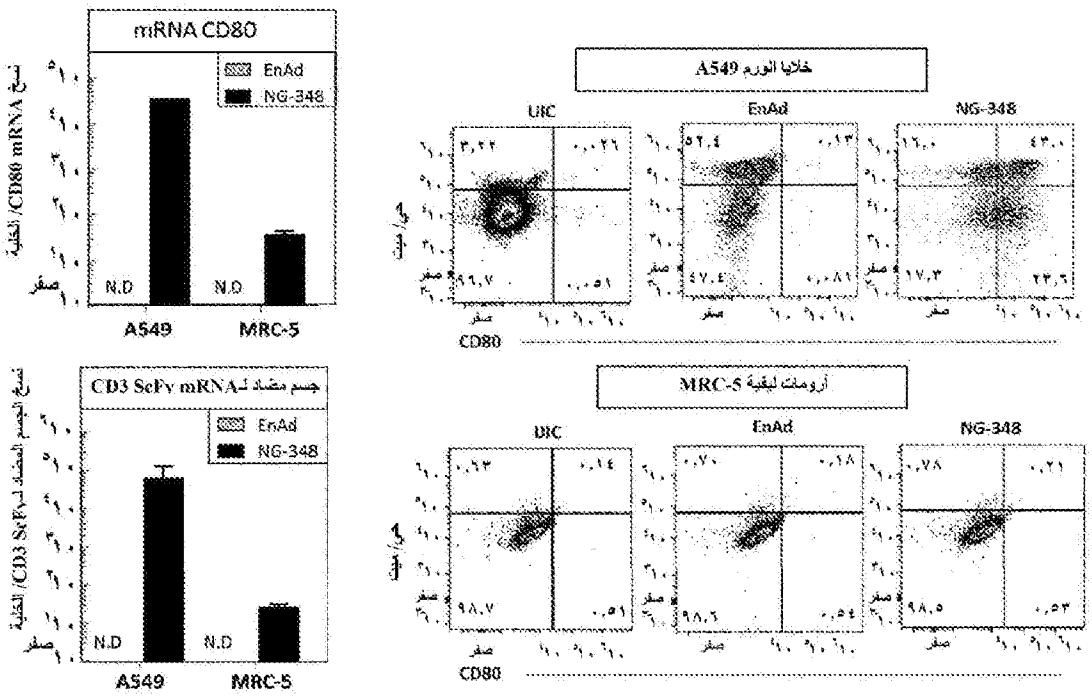
ج


متوالية Kozak
رامزة بدء
مستقبل الجدل
V5 tag
نطاق TM
رامزة إنهاء
بولي (A)
OKT3ScFv

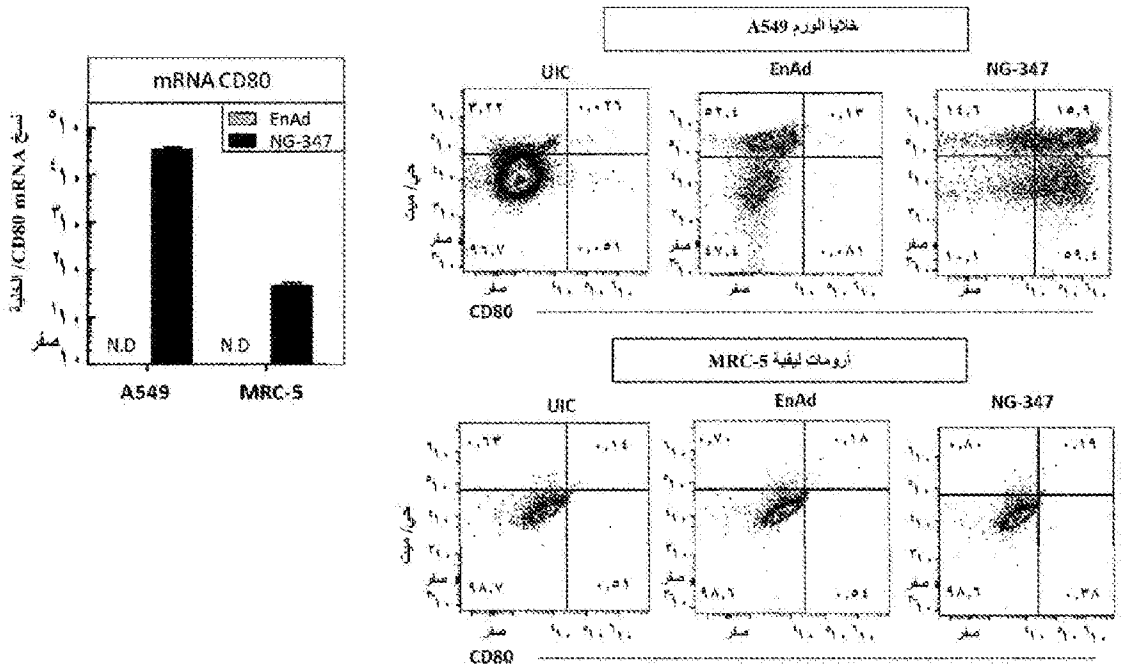
شكل ٢٦


استنساخ الجينوم
إجمالي جينومات الفيروس/ الخلية
EnAd
NG-347
مدخلات الفيروس
صفر
A549
MRC-5
التعبير الوراثي عن Hexon
نسخ Hexon mRNA/ الخلية
EnAd
NG-347
A549
MRC-5
استنساخ الجينوم
إجمالي جينومات الفيروس/ الخلية
EnAd
NG-348
مدخلات الفيروس
صفر
A549
MRC-5
التعبير الوراثي عن Hexon
نسخ Hexon mRNA/ الخلية
EnAd
NG-348
A549
MRC-5

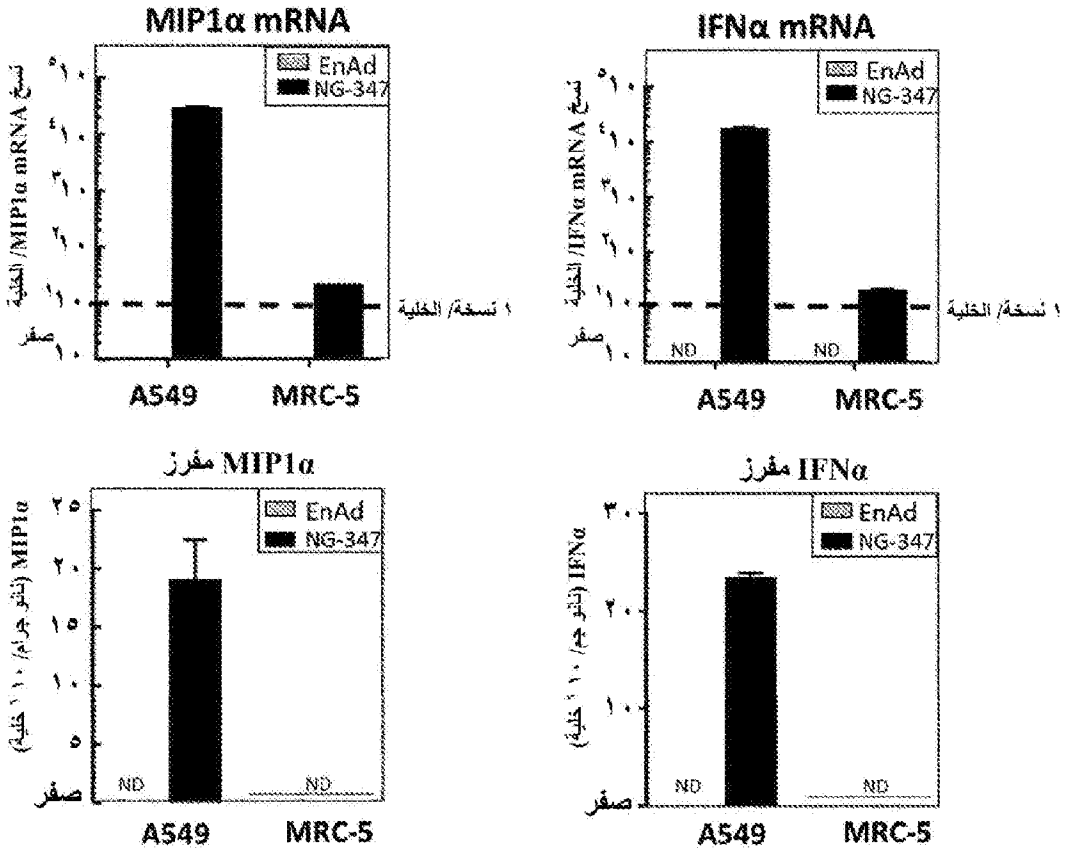
شكل ٢٧


mRNA CD80
EnAd
NG-348
نسخ CD80 mRNA/ الخلية
صفر
N.D
N.D
A549
MRC-5
CD3 ScFv mRNA جسم مضاد لـ
نسخ الجسم المضاد لـ CD3 ScFv/ الخلية
خلايا الورم A549
UIC
EnAd
NG-348
٣,٢٢
٠,٠٢٦
٩٦,٧
٠,٠٥١
٥٢,٤
٠,١٣
٤٧,٤
٠,٠٨١
١٦,٠
٤٣,٠
١٧,٣
٢٣,٩
CD80
أرومات ليفية MRC-5
٠,٦٣
٠,١٤
٩٨,٧
٠,٥١
٠,٧٠
٠,١٨
٩٨,٦
٠,٥٤
٠,٧٨
٠,٢١
٩٨,٥
٠,٥٣

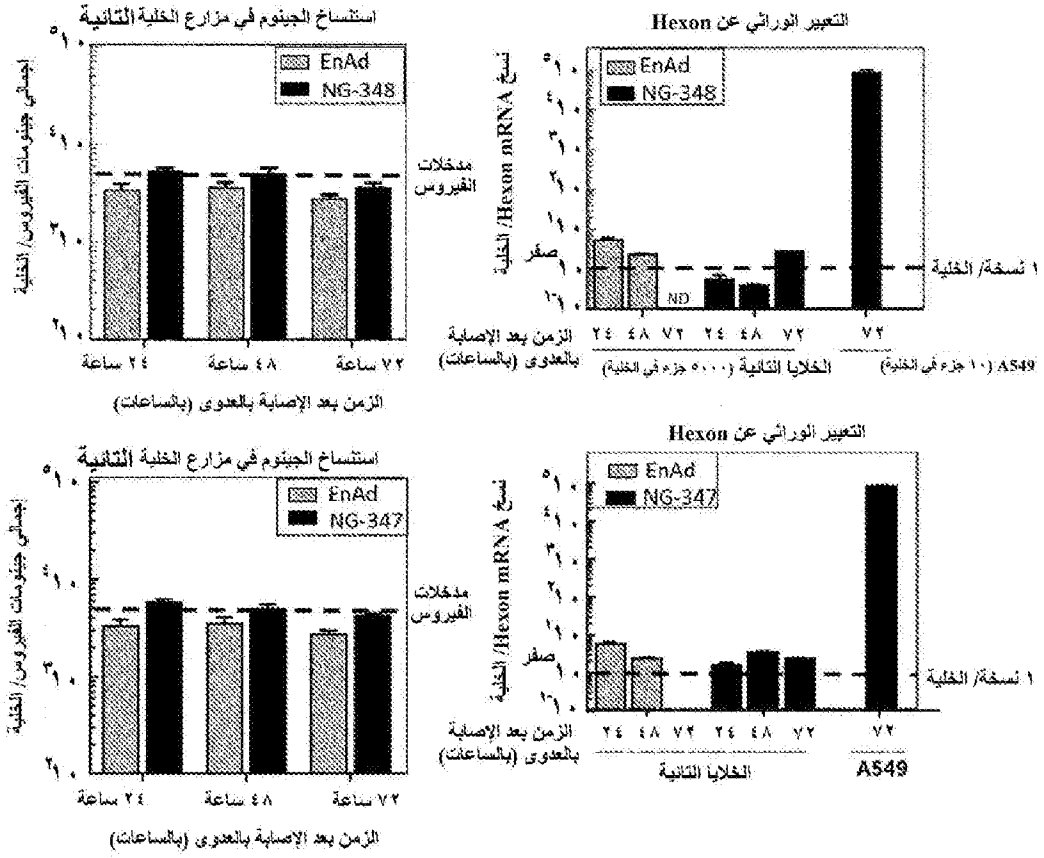
شكل ٢٨


mRNA CD80
EnAd
NG-347
N.D
N.D
A549
MRC-5
خلايا الورم A549
UIC
EnAd
NG-347
CD80
أورمات ليفية MRC-5
UIC
EnAd
NG-347
CD80

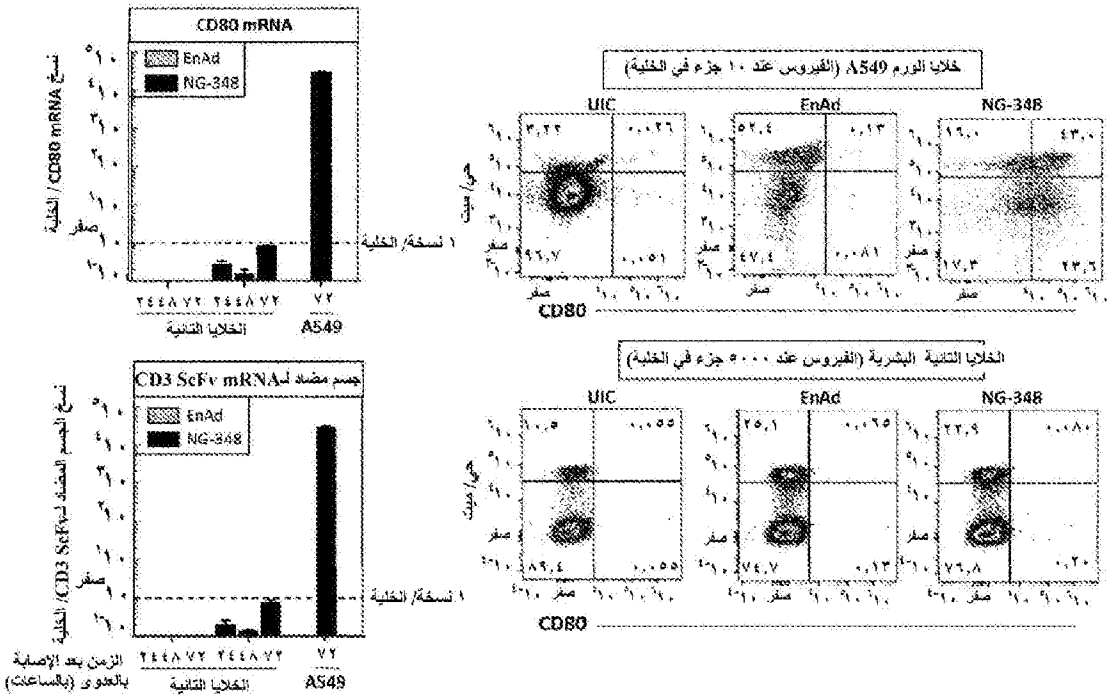
شكل ٢٩


MIP1α mRNA
IFNα mRNA
مفرز MIP1α
مفرز IFNα
EnAd
NG-347
A549
MRC-5
ND
صفر
١ نسخة/ الخلية

شكل ٣٠

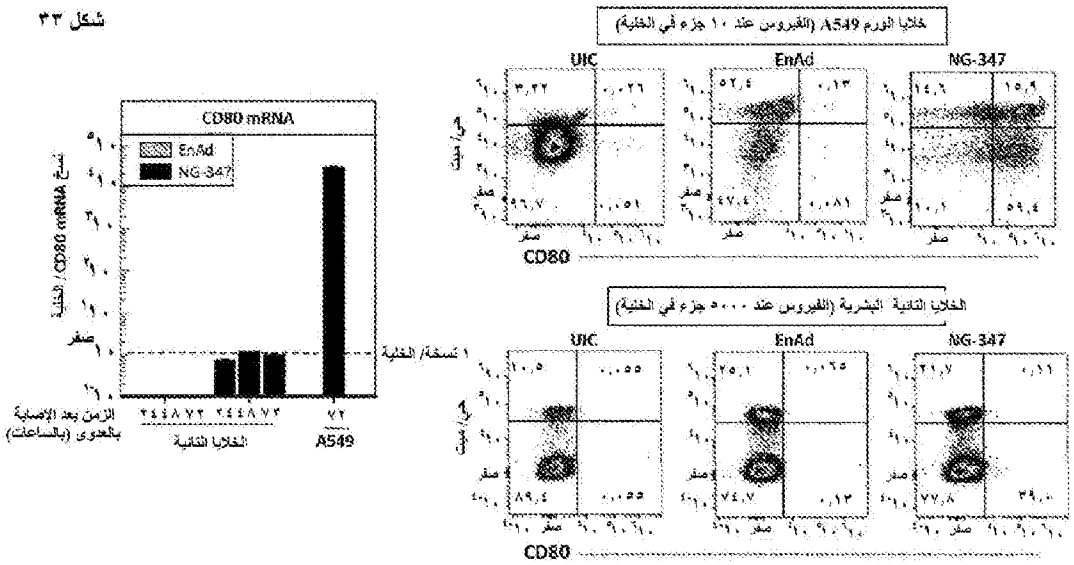

استنساخ الجينوم في مزارع الخلية الثانية
EnAd
NG-348
مدخلات الفيروس
إجمالي جينومات الفيروس/ الخلية
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
التعبير الوراثي عن Hexon
نسخ Hexon mRNA/ الخلية
١ نسخة/ الخلية
صفر
ND
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
الخلايا الثانية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)
استنساخ الجينوم في مزارع الخلية الثانية
EnAd
NG-347
مدخلات الفيروس
إجمالي جينومات الفيروس/ الخلية
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
التعبير الوراثي عن Hexon
EnAd
NG-347
نسخ Hexon mRNA/ الخلية
١ نسخة/ الخلية
صفر
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
الخلايا الثانية
A549

شكل ٣١

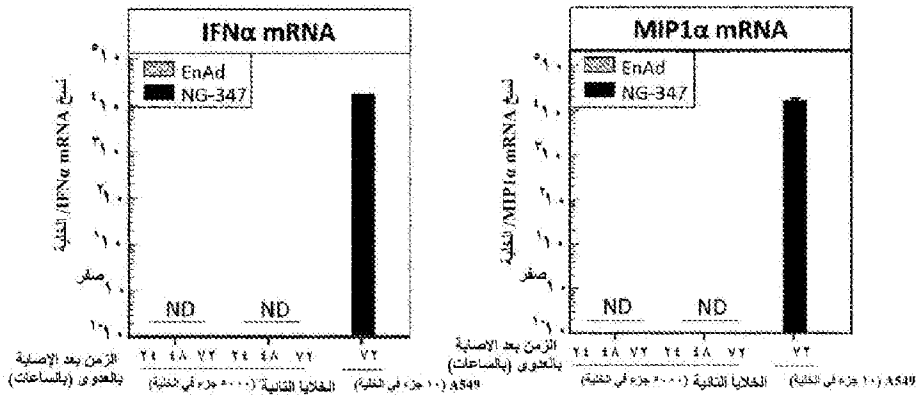

CD80 mRNA
EnAd
NG-348
نسخ CD80 mRNA / الخلية
١ نسخة/ الخلية
صفر
٢٤ ٤٨ ٧٢ ٢٤ ٤٨ ٧٢
الخلايا التائية
٧٢
A549
CD3 ScFv mRNA لـ جسم مضاد
نسخ الجسم المضاد لـ CD3 ScFv / الخلية
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
خلايا الورم A549 (الفيروس عند ١٠ جزء في الخلية)
UIC
EnAd
NG-348
٣,٢٢
٠,٠٢٦
٩٦,٧
٠,٠٥١
٥٢,٤
٠,١٣
٤٧,٤
٠,٠٨١
١٩,٠
٤٣,٠
١٧,٣
٢٣,٦
CD80
الخلايا التائية البشرية (الفيروس عند ٥٠٠٠ جزء في الخلية)
١٠,٥
٠,٠٥٥
٨٩,٤
٠,٠٥٥
٢٥,١
٠,٠٦٥
٧٤,٧
٠,١٣
٢٢,٩
٠,٠٨٠
٧٦,٨
٠,٢٠
CD80

شكل ٣٢

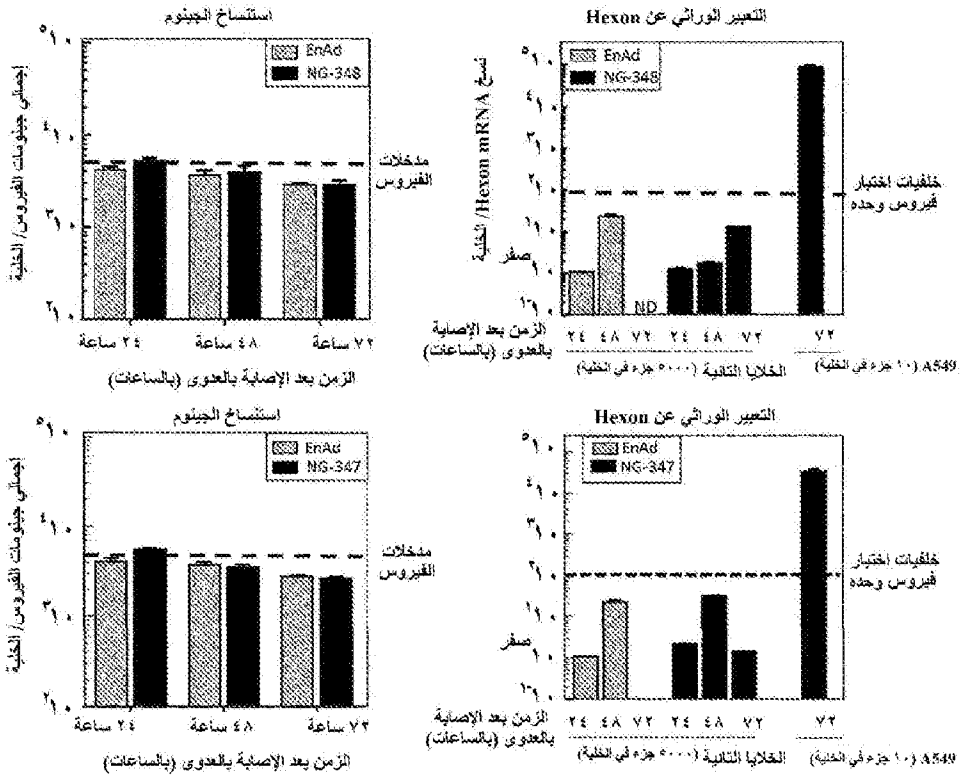
شكل ٣٣


CD80 mRNA
EnAd
NG-347
نسخ CD80 mRNA / الخلية
صفر
١ نسخة/ الخلية
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
٢٤ ٤٨ ٧٢ ٢٤ ٤٨ ٧٢ ٧٢
الخلايا الثانية
A549
خلايا الورم A549 (الفيروس عند ١٠ جزء في الخلية)
UIC
EnAd
NG-347
٣,٢٢
٠,٠٢٦
٥٢,٤
٠,١٣
١٤,٩
١٥,٩
٩٦,٧
٠,٠٥١
٤٧,٤
٠,٠٨١
٤٠,١
٥٩,٤
حر/ مبت
صفر
CD80
الخلايا الثانية البشرية (الفيروس عند ٥٠٠٠ جزء في الخلية)
UIC
EnAd
NG-347
١٠,٥
٠,٠٥٥
٢٥,١
٠,٠٦٥
٢١,٧
٠,١١
٨٩,٤
٠,٠٥٥
٧٤,٧
٠,١٣
٧٧,٨
٣٩,٠
CD80

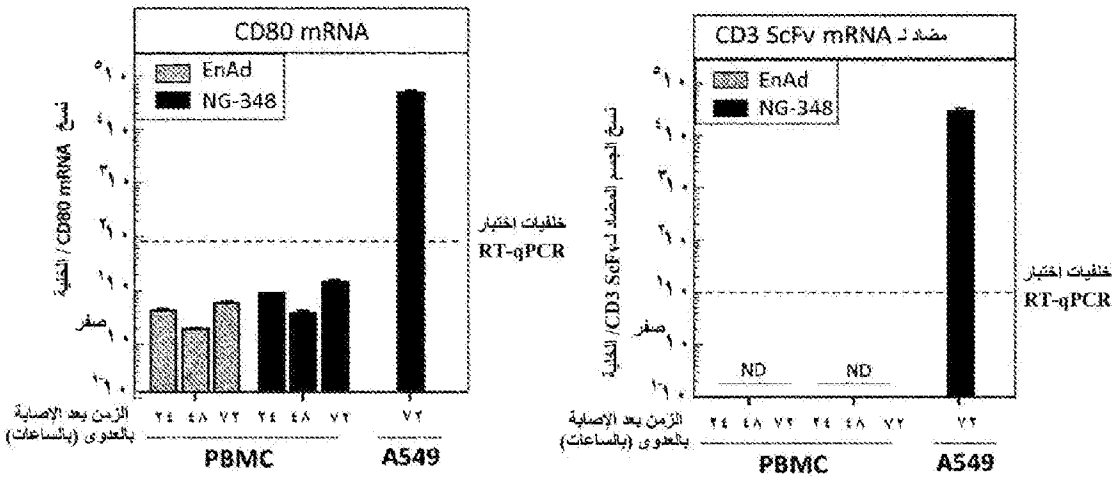
شكل ٣٤


IFNα mRNA
EnAd
NG-347
نسخ IFNα mRNA / الخلية
صفر
ND
ND
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
٢٤ ٤٨ ٧٢ ٢٤ ٤٨ ٧٢ ٧٢
الخلايا الثانية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)
MIP1α mRNA
EnAd
NG-347
نسخ MIP1α mRNA / الخلية
صفر
ND
ND
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
٢٤ ٤٨ ٧٢ ٢٤ ٤٨ ٧٢ ٧٢
الخلايا الثانية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)

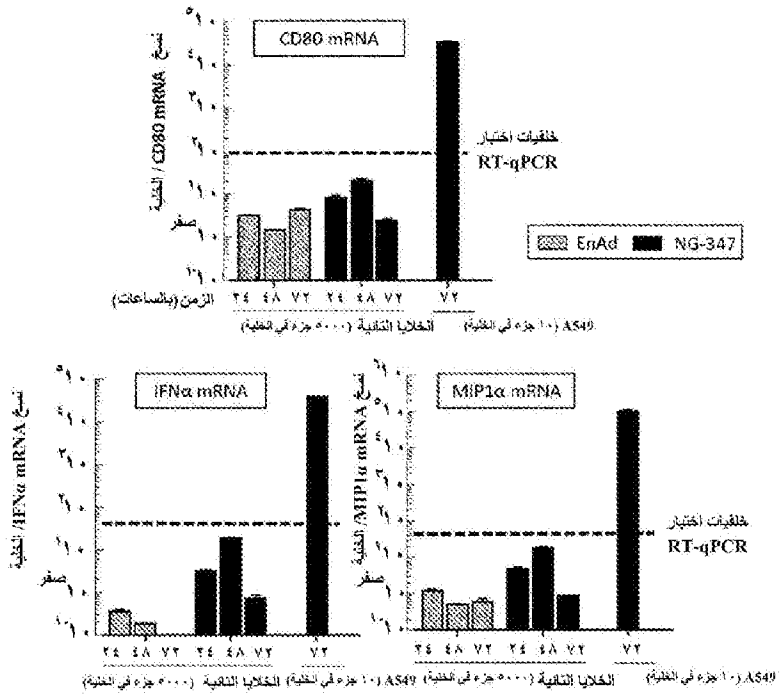
شكل ٣٥


استنساخ الجينوم
EnAd
NG-348
إجمالي جينومات الفيروس/ الخلية
مدخلات الفيروس
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
التعبير الوراثي عن Hexon
نسخ Hexon mRNA/ الخلية
صفر
ND
خلفيات اختبار فيروس وحده
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
الخلايا التالية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)
استنساخ الجينوم
EnAd
NG-347
إجمالي جينومات الفيروس/ الخلية
مدخلات الفيروس
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
التعبير الوراثي عن Hexon
EnAd
NG-347
خلفيات اختبار فيروس وحده
صفر
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
الخلايا التالية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)

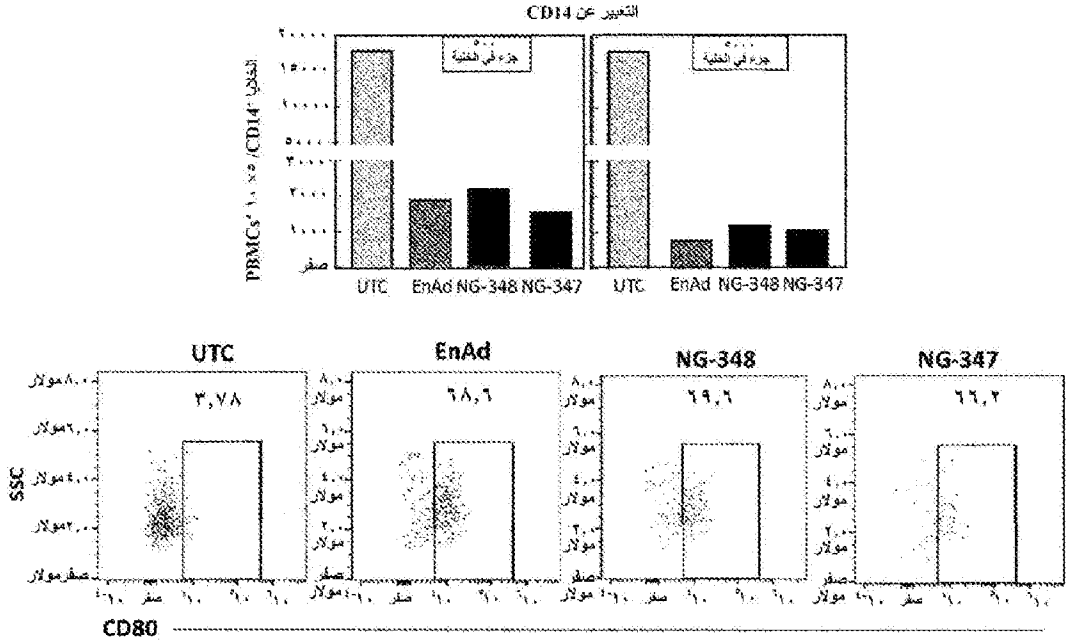
شكل ٣٦


CD80 mRNA
EnAd
NG-348
نسخ CD80 mRNA/ الخلية
خلفيات اختبار RT-qPCR
صفر
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
PBMC
A549
CD3 ScFv mRNA مضاد لـ
EnAd
NG-348
نسخ الجسم المضاد لـ CD3 ScFv/ الخلية
خلفيات اختبار RT-qPCR
ND
ND
صفر
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)
PBMC
A549

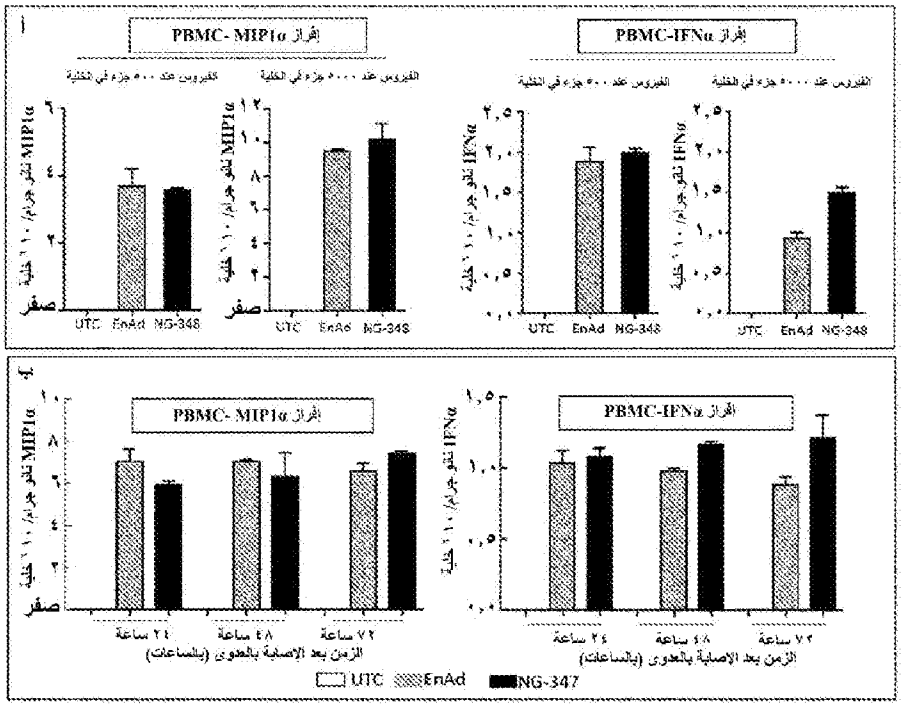
شكل ٣٧


CD80 mRNA
نسخ CD80 mRNA / الخلية
خلفيات اختبار RT-qPCR
EnAd
NG-347
صفر
الزمن (بالساعات)
٢٤ ٤٨ ٧٢ ٢٤ ٤٨ ٧٢ ٧٢
الخلايا النقية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)
IFNα mRNA
نسخ IFNα mRNA / الخلية
MIP1α mRNA
نسخ MIP1α mRNA / الخلية
خلفيات اختبار RT-qPCR
الخلايا النقية (٥٠٠٠ جزء في الخلية)
A549 (١٠ جزء في الخلية)

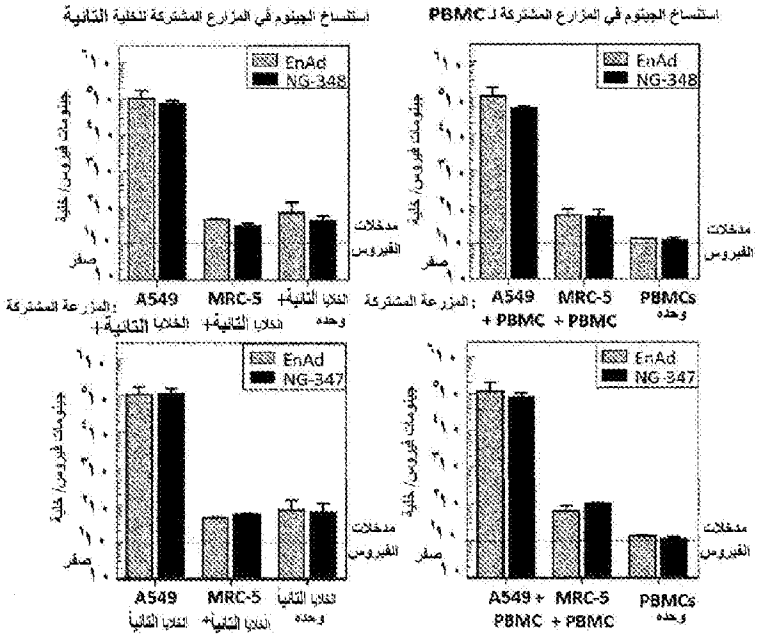
شكل ٣٨


التعبير عن CD14
PBMCs لكل ١٠٠٠٠٠ / CD14+ الخلايا
جزء في الخلية
UTC
EnAd
NG-348
NG-347
UTC
EnAd
NG-348
NG-347
٣,٧٨
٦٨,٦
٦٩,٦
٦٦,٢
SSC
CD80

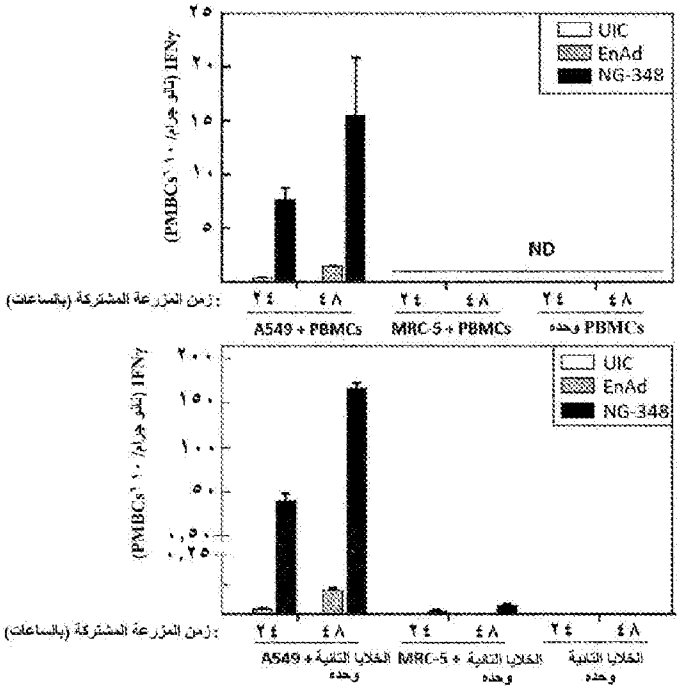
شكل ٣٩


PBMC- MIP1α إفراز
PBMC-IFNα إفراز
الفيروس عند ٥٠٠ جزء في الخلية
الفيروس عند ٥٠٠٠ جزء في الخلية
MIP1α نانو جرام/ ١٠ خلية
IFNα نانو جرام/ ١٠ خلية
صفر
UTC
EnAd
NG-348
NG-347
٢٤ ساعة
٤٨ ساعة
٧٢ ساعة
الزمن بعد الإصابة بالعدوى (بالساعات)

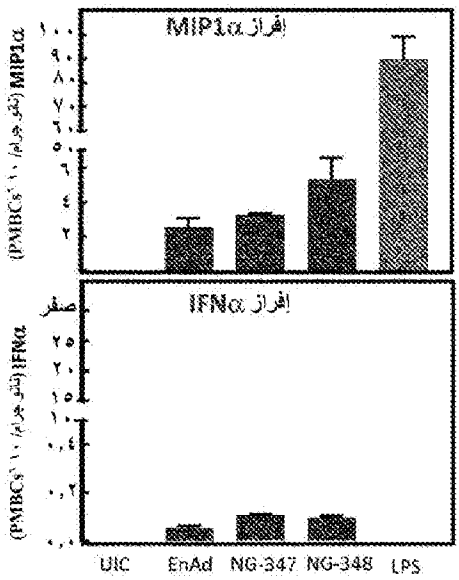
شكل ٤٠


استنساخ الجينوم في المزارع المشتركة لـ PBMC
استنساخ الجينوم في المزارع المشتركة للخلايا الثانية
EnAd
NG-348
NG-347
جينومات فيروس/ خلية
مدخلات الفيروس
صفر
A549
MRC-5
PBMCs
الخلايا الثانية
وحدة
المزرعة المشتركة:
+ PBMC

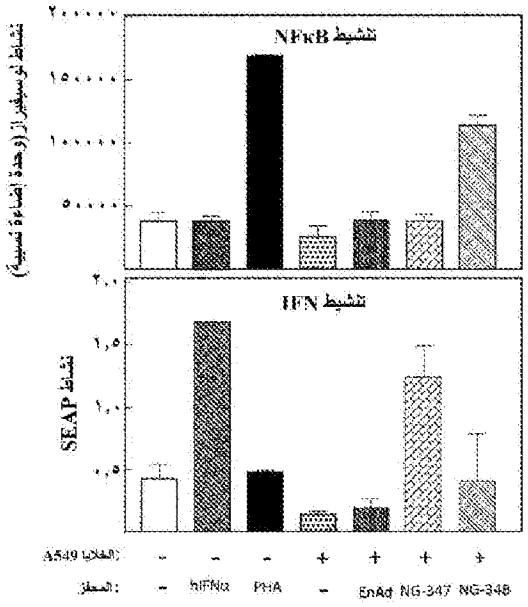
شكل ٤١


UIC
EnAd
NG-348
ND
(PMBCs^١٠ /بكتو جرام) IFNγ
زمن المزرعة المشتركة (بالساعات):
٢٤
٤٨
A549 + PBMCs
MRC-5 + PBMCs
وحده PBMCs
الخلايا الثنائية + A549 وحده
الخلايا الثنائية + MRC-5 وحده
الخلايا الثنائية وحده

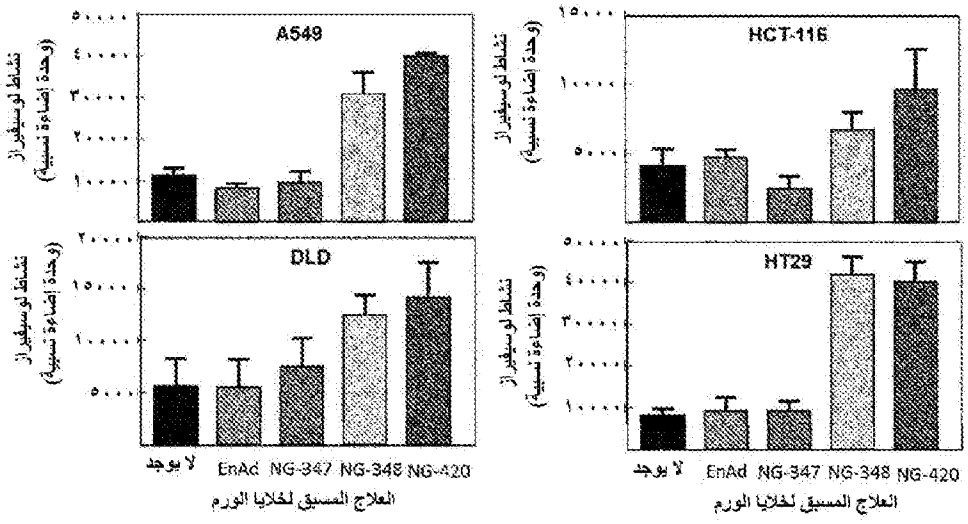
شكل ٤٢


MIP1α إفراز
(PMBCs^١٠ /بكتو جرام) MIP1α
IFNα إفراز
صفر
(PMBCs^١٠ /بكتو جرام) IFNα
UIC
EnAd
NG-347
NG-348
LPS

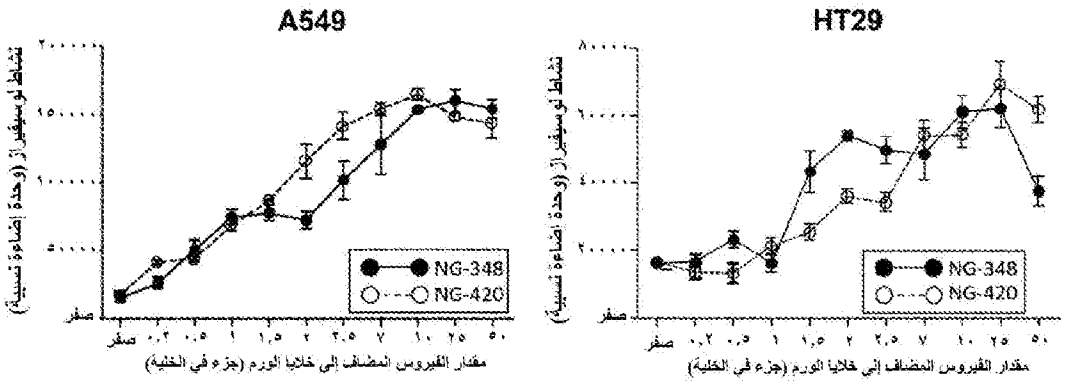
شكل ٤٣


تنشيط NFκB
نشاط لوسيفيراز (وحدة إضاءة نسبية)
تنشيط IFN
نشاط SEAP
A549 (الخلايا):
المعطِّز:
-
hIFNα
PHA
EnAd
NG-347
NG-348

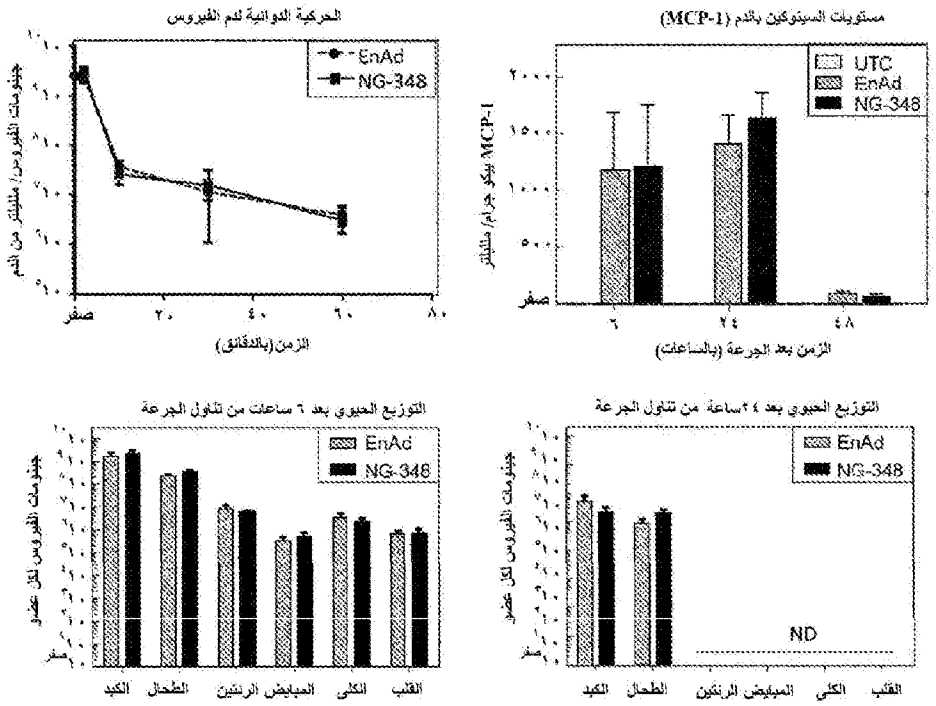
شكل ٤٤


A549
HCT-116
DLD
HT29
نشاط لوسيفيراز (وحدة إضاءة نسبية)
لا يوجد
EnAd
NG-347
NG-348
NG-420
العلاج المسبق لخلايا الورم

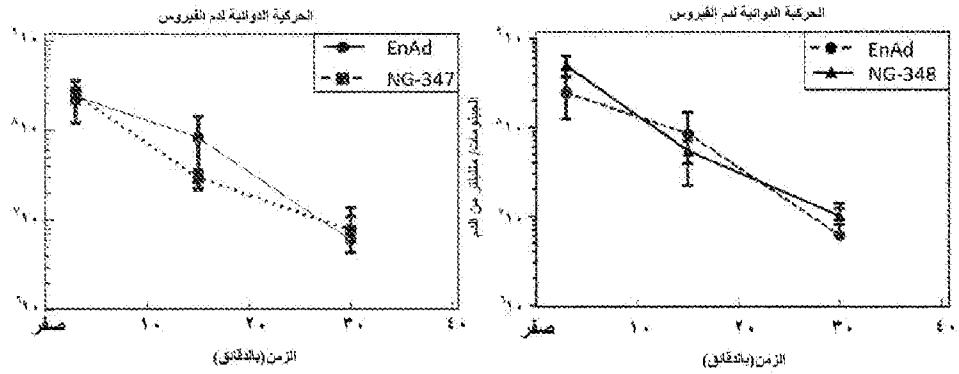
شكل ٤٥


A549
HT29
نشاط لوسيفيراز (وحدة إضاءة نسبية)
NG-348
NG-420
صفر
مقدار الفيروس المضاف إلى خلايا الورم (جزء في الخلية)

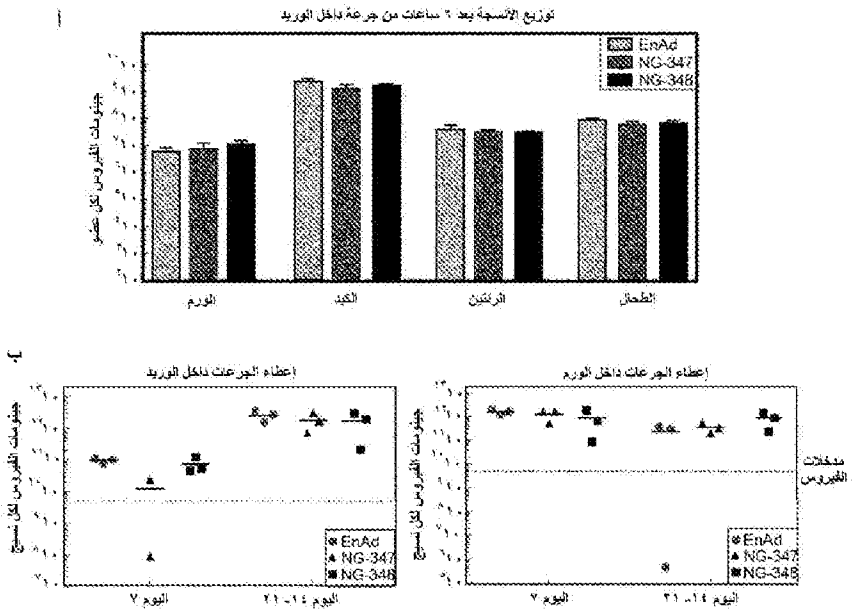
شكل ٤٦


الحركية الدوائية لدم الفيروس
EnAd
NG-348
جينومات الفيروس/ ملليلتر من الدم
الزمن (بالدقائق)
مستويات السيتوكين بالدم (MCP-1)
UTC
EnAd
NG-348
MCP-1 بيكو جرام/ ملليلتر
الزمن بعد الجرعة (بالساعات)
التوزيع الحيوي بعد ٦ ساعات من تناول الجرعة
التوزيع الحيوي بعد ٢٤ ساعة من تناول الجرعة
ND
الكبد
الطحال
المبايض الرئتين
الكلى
القلب

شكل ٤٧

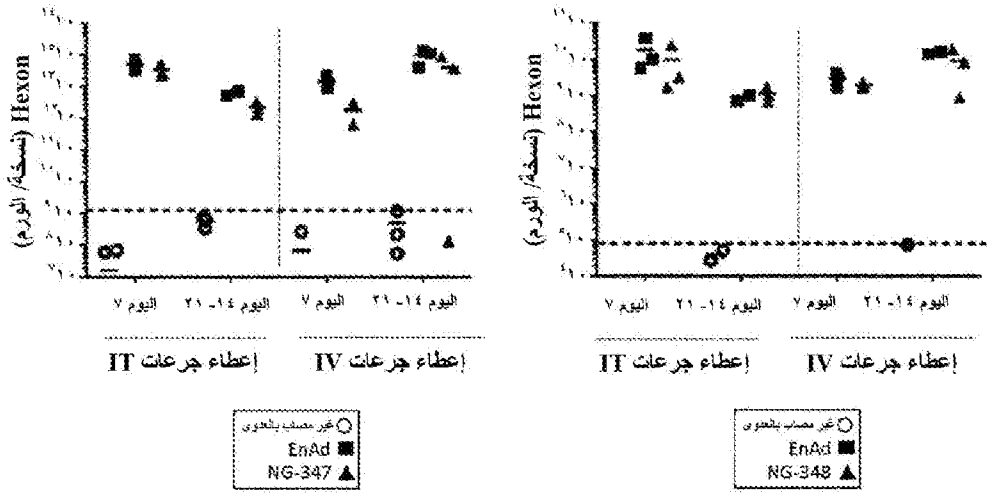

الحركية الدوائية لدم الفيروس
EnAd
NG-347
NG-348
الجينوم/ ملليلتر من الدم
صفر
١٠
٢٠
٣٠
٤٠
الزمن(بالدقائق)

شكل ٤٨


أ
توزيع الأنسجة بعد ٦ ساعات من جرعة داخل الوريد
EnAd
NG-347
NG-348
جينومات الفيروس لكل عضو
الورم
الكبد
الرئتين
الطحال
ب
إعطاء الجرعات داخل الوريد
إعطاء الجرعات داخل الورم
جينومات الفيروس لكل نسيج
مدخلات الفيروس
اليوم ٧
اليوم ١٤- ٢١

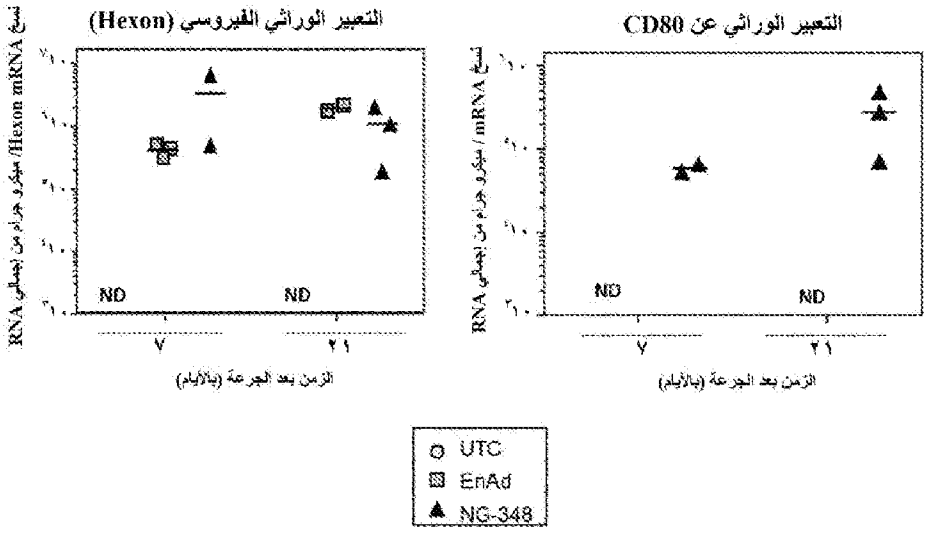
شكل ٤٩

التعبير عن hexon mRNA للفيروس في الأورام HCT-116



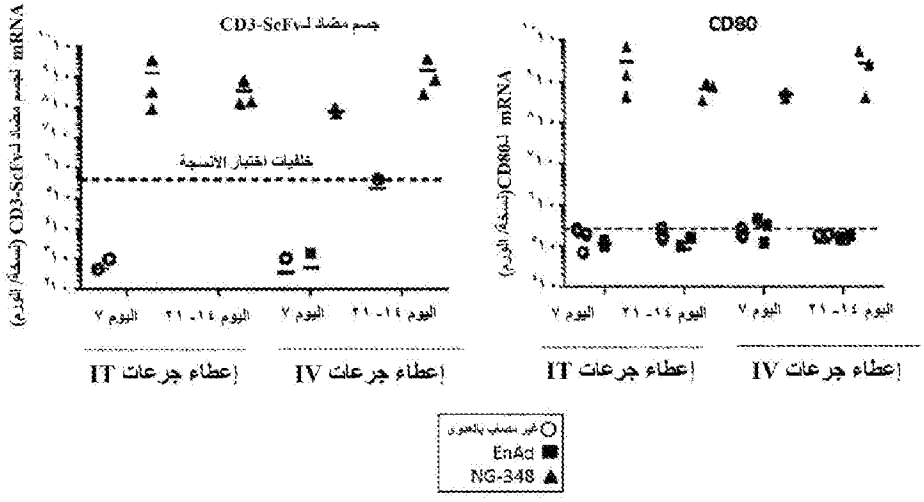
شكل ٥٠

التعبير عن mRNA للجين الناقلHexon وCD80 من خلالNG-348 في الأورام HCT-116



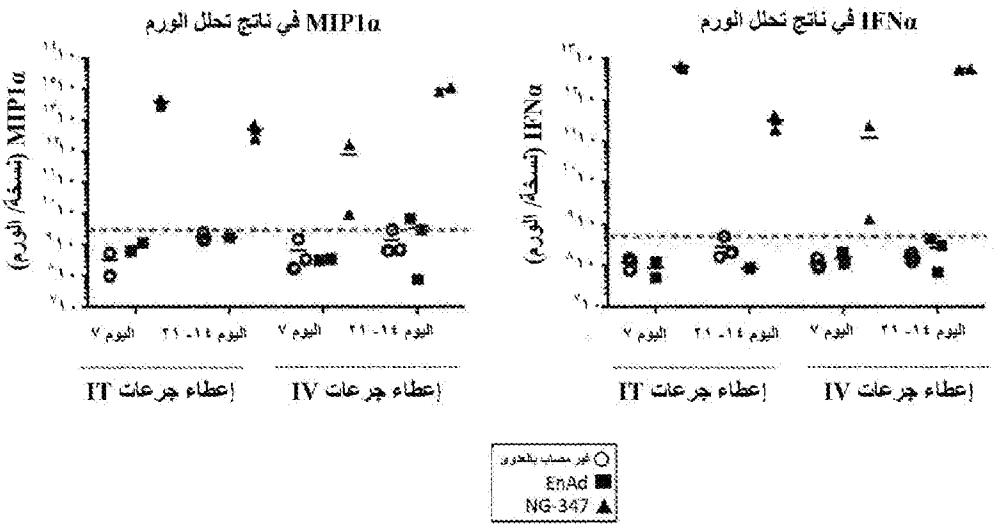
شكل ٥١

التعبير عن mRNA للجين الناقلCD80 والجسم المضاد لـCD3-ScFv من خلال NG-348 في الأورام HCT-116



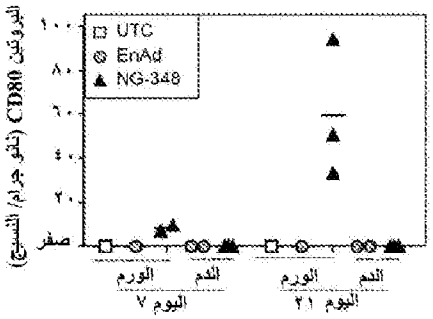
شكل ٥٢

التعبير عن mRNA للجين الناقلMIP1α وIFNα من خلال NG-347 في الأورام HCT-116

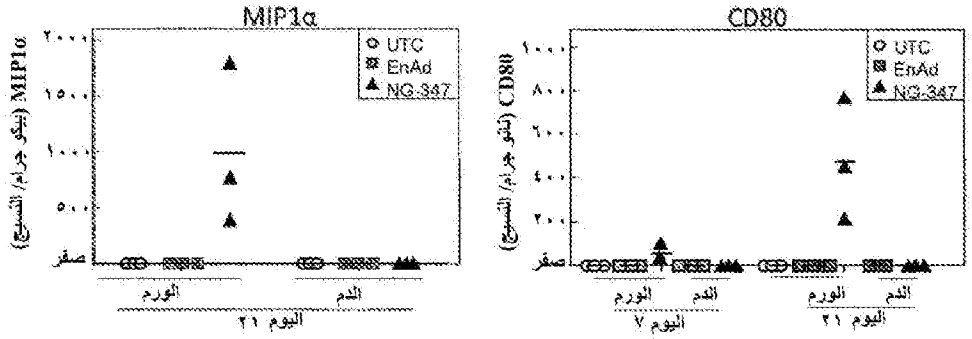


شكل ٥٣

التعبير عن البروتين CD80 من خلال NG-348 (بعد إعطاء جرعة IV مفردة من الفيروس)



التعبير عن MIP1α و CD80 من خلال NG-347 (بعد إعطاء جرعة IV مفردة من الفيروس)



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