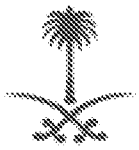
الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property



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 12471

بتاريخ : 1444/07/29 هـ
الموافق : 2023/02/20 م

عن الإختراع المسمى :

فيروس غدّي مزود بموصل خلايا تائية ثنائية النوعية

Adenovirus armed with bispecific T cell engager

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 12471 B1

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1444/07/29 هـ
الموافـــق: 2023/02/20 م

[21] رقـم الطلب: 520411426
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1441/07/03 هـ
الموافق: 2020/02/27 م
[30] بيانات الأسبقية:
1713765.4 GB 2017/08/28 م
PCT/EP2017/071655 EP 2017/08/29 م
[72] PCT/EP2017/071674 EP 2017/08/29 م
اسم المخترع: شـامبيون، براين ، برواملى، أليس، كلير، نويل
[73] مالك البراءة: بيسيوكساس ثيرابيوتكس ليميتد
عنـــــوانه: 4-10 ذي كوادرنت، بارتون لين، أبينجتون أكسفوردشاير أو أكس14 3واي أس، المملكة المتحدة
جنسيته: بريطانية
[74] الـــــوكيـــــل: مكتب المحامي/ محمد بن صالح العطيشان

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/EP2018/073160
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2018/08/28 م
[87] رقم النشر الدولي: WO/2019/043020
تاريخ النشر الدولي: 2019/03/07 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
A61K 039/395, A61P 035/000
C07K 016/028, C07K 016/040
C12N 015/861, C07K 14/715
A61K 039/039
[56] المراجع:
WO 2015155370
CARLOS ALBERTO FAJARDO ET AL, "Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy"
YU FENG ET AL, "Cancer Associated Fibroblasts-Targeted Oncolytic Virus Results in Enhanced Antitumor Activity in Mouse Model"

الفاحص: حصه بنت عمر البيز

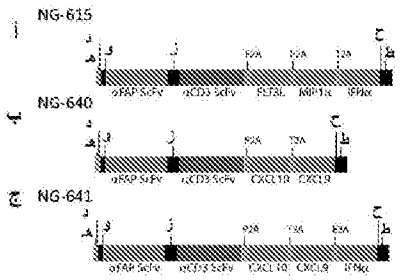
[54] اسم الاختراع: فيروس غدّي مزود بموصل خلايا تائية ثنائية النوعية

Adenovirus armed with bispecific T cell engager

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بفيروس غـدّي An adenovirus يتضـــمن متواليـة لهـا الصـــيغـة (I)

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR$$

حيث تشتمل BY على طقم متحور a transgene وراثيًا يحتوي على أربعـة جينـات متحورة، وتشـــفر الجينـات المذكورة كلا من FAP- موصـل خلايا تائية ثنائية النوعية bispecific T cell engager وCXL10 وCXL9 وIFN. كما يمتد الكشـف ليغطي تركيبة صـيدلية تتضـمن الفيروس واستخدام الفيروس أو الصيغة في العلاج. الشكل (1)



عدد عناصر الحماية (19)، عدد الأشكال (55)

فيروس غدّي مزود بموصل خلايا تائية ثنائية النوعية

Adenovirus armed with bispecific T cell engager

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بفيروس غدّي معدَّل a modified adenovirus ، وبشكل محدد فيروس Enadenotucirev المعروف اختصارًا باسم (EnAd)، مزود بـ FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية bispecific T cell activator، تركيبة، على سبيل المثال صيغة صيدلية تتضمن الفيروس الغدي، استخدام الفيروس وصيغ الفيروس في العلاج، على سبيل المثال في علاج السرطان cancer. يغطي الكشف الحالي أيضًا عمليات لتحضير الفيروس وحمض نووي DNA (Deoxyribonucleic acid) مشفِّر له. يمتد الكشف أيضا ليغطي متواليات جديدة يتم تقديمها في قائمة المتواليات جنبًا إلى جنبٍ مع الكشف التقني المبين هنا، على سبيل المثال حيث يتم استبدال الفيروس التمثيلي، على سبيل المثال، بطقم بديل أو فيروس بديل يتم تقديمه في قائمة المتواليات.

لا يزال السرطان يشكّل عبئًا اجتماعيًا كبيرًا على المجتمع من حيث المشقة والمعاناة للمرضى وأحبائهم، وكذلك من حيث التكلفة المالية العالية لعلاج المرضى ورعايتهم ودعمهم.

إن السدى The stroma التي تنتشر حول الخلايا السرطانية بمثابة حماية جسدية حيث يمكن أن تتسم بوظيفة تتمثل في محاصرة الخلايا المناعية immune cells المرسَلة لمحاربة الورم the tumour. بالإضافة إلى ذلك، تحمي السدى البيئة الدقيقة لنقص أكسجين الورم the hypoxic microenviroment of the tumour ، الشحمية من نقص الورم الأكسجيني للورم، وهو ما يساعد على نمو الورم ويطوره. هناك بعض النظريات أن الخلايا في السدى هي مصدر للطاقة في الورم.

تشكّل الخلايا الليفية الأولية fibroblasts مكونًا كبيرًا من سدى الورم، والتي تم تلفها لخدمة الغرض من السرطان. أما الخلايا الأخرى التي تتسرب إلى السدى فهي الخلايا الملتهمة الكبيرة

المصاحبة للورم tumour associated macrophages (TAMs)، والتي تكون خلايا ملتهمة كبيرة من النوع 2 (M2)، والتي يمكن أن تعزز نمو الورم عن طريق إفراز السيتوكينات cytokines والكيموكينات chemokines ، مثل IL-10 الذي يقمع الاستجابات المناعية.

من الصعب بشكل خاص استهداف سدى الورم لأن الخلايا التي تشكّل البيئة هي خلايا مناعية "أصلية" أو خلايا نسيج ضام، موجودة في جميع أنحاء الجسم. وبالتالي فإن استهداف هذه الخلايا بالعوامل العلاجية يمكن أن يؤدي إلى تأثيرات خطيرة بعيدًا عن الهدف.

وبالتالي، هناك حاجة إلى طريقة محسّنة لإيصال منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مباشرة إلى الخلايا الورمية حيث يمكنها توفير فائدة علاجية قصوى، وبشكل محدد التوصيل إلى الخلايا الورمية التي تحيط بها الخلايا الليفية السدوية stromal fibroblasts.

إن الوثيقتين للبرائتين الدولتين 2018/041838 و 2018/041827، ويتم تضمين كليهما هنا كمرجعين، تكشفان عن فيروسات غدية معينة تشفر منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية. ومع ذلك، سيكون من المفيد زيادة نشاط منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المشفر في الفيروس عن طريق تضمين سيتوكينات تنشيطية. إن تضمين اثنين من السيتوكينات في موقع تواجد منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكن تحقيقه بدون صعوبات كثيرة. ومع ذلك، عندما يتم وضع ثلاث سيتوكينات في موقع منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، فإن طبيعة الجينات تبدأ في التأثير على التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. وقد أنشأ المخترعون الحاليون الفيروس NG-615 مزودًا بأربع جينات متحورة، مبينة في الشكل 1. ومع ذلك، تم تقليل التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. وبشكل مدهش فإن الفيروس NG-641 حيث حدث تغير في اثنين من السيتوكينات (مقارنةً بـ NG-615) كان له نشاط جيد، بما في ذلك التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. من هنا، يبدو أن الجينات المتحورة الأربع معًا متوافقة مع تواجدها في الفيروس.

يتعلق الاختراع الحالي المطلوب حمايته بفيروس يتضمن الجينات الأربع المتحورة المذكورة الموجودة بين الليفة L5 والمنطقة E4.

الوصف العام للاختراع

تُعد الفقرات التالية ملخصًا للكشف عن الاختراع الحالي:

1. فيروس غدي يتضمن متوالية لها الصيغة (I) التالية:

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \quad (I)$$

حيث:

B1 تكون عبارة عن رابطة أو تشتمل على: E1A، E1B أو E1A–E1B؛

BA تشتمل على –E2B–L1–L2–L3–E2A–L4؛

B2 تكون عبارة عن رابطة أو تشتمل على: E3؛

BX تكون عبارة عن رابطة أو متوالية حمض نووي DNA حيث تشتمل على: موقع تقييد، واحد أو أكثر من الجينات المتحورة أو كليهما؛

BB تشتمل على L5؛

BY تشتمل على طقم جينات متحورة يتضمن أربع جينات متحورة، وتشفر الجينات المذكورة FAP– منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، CXL10، CXL9، وIFN؛

B3 تكون عبارة عن رابطة وتشتمل على : E4.

2. فيروس غدي وفقًا للفقرة 1، حيث يشتمل FAB–منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المشفر على مضاد لـ CD3 المبين في رقم تعليف المتوالية: 5 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل معها، على سبيل المثال رقم تعليف المتوالية: 5.

3. فيروس غدي وفقًا للفقرة 1 أو 2 حيث يشتمل FAP– منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على مضاد لـ FAP المبين في رقم تعليف المتوالية: 9 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل معها، على سبيل المثال رقم تعليف المتوالية: 9

4. فيروس غدي وفقًا للفقرة 1، حيث يشتمل FAB–منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المشفر على متوالية يتم اختيارها من رقم تعليف المتوالية: 75، رقم تعليف المتوالية: 76 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% مع أي منها.

5. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 4، حيث يشفر طقم الجين المتحور CXL10 المبين في رقم تعليف المتوالية: 100 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل معها، على سبيل المثال رقم تعليف المتوالية: 100.

6. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 5، حيث يشفر طقم الجين المتحور CXCL9 المبين في رقم تعليف المتوالية: 99 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل معها، على سبيل المثال رقم تعليف المتوالية: 99.

7. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 6، حيث يشفر طقم الجين المتحور IFNα المبين في رقم تعليف المتوالية: 98 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل معها، على سبيل المثال رقم تعليف المتوالية: 98.

8. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 7، حيث يتم ربط الجينات المتحورة وظيفيًا.

9. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 8، حيث يتم فصل الجينات المتحورة بثلاث ببتيدات شطر ذاتي self-cleavage peptides مختلفة عالية الفعالية.

10. فيروس غدي وفقًا للفقرة 9، حيث يتم اختيار ببتيدات الشطر الذاتي بشكل مستقل من E2A، F2A، P2A وT2A.

11. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 10، حيث يكون الترتيب النسبي للجينات المتحورة من L5 إلى E4 عبارة عن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، CXL10، CXL9 وIFNα، على سبيل المثال كما هو مبين لـ NG-641 في الشكل 1.

12. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 11، حيث يتضمن طقم الجينات المتحورة متوالية بولي نوكليوتيد polynucleotide المبين في رقم تعليف المتوالية: 95 أو بولي نوكليوتيد يشفر نفس متوالية الحمض الأميني، بشكل محدد رقم تعليف المتوالية: 95.

13. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 12، حيث يشتمل الفيروس الغدي رقم تعليف المتوالية: 84.

14. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 13، حيث يُعد الفيروس الغدي مؤهلا للانتساخ replication competent.

15. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 14، حيث يُعد الفيروس الغدي حالّ للورم.

16. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 15، حيث يشتمل الفيروس على هكسون hexon وإحدى الألياف من Ad11.

17. تركيبة صيدلية تشتمل على فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 16 وسواغ، مادة مخففة أو مادة حاملة.

18. فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 16، أو تركيبة صيدلية وفقًا للفقرة 17، للاستخدام في العلاج، على سبيل المثال، للاستخدام في علاج السرطان.

19. طريقة لعلاج مريض حيث تتضمن إعطاء فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 16 أو تركيبة صيدلية وفقًا للفقرة 17.

20. استخدام فيروس غدي وفقًا لأي من الفقرات 1 إلى 16، أو تركيبة صيدلية وفقًا للفقرة 17، لتصنيع دواء لعلاج السرطان.

في أحد التجسيدات، لا يشتمل منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو لا تشتمل منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية وفقًا للكشف الحالي على نطاق عبر غشائي وبالتالي لا يتم التعبير عنه على سطح الخلية السرطانية وإنما يتضمن متوالية إشارة لتسهيل إطلاق جزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من الخلية السرطانية المصابة بالفيروس.

في أحد التجسيدات، يكون الطقم المتحور وراثيًا تحت سيطرة معزز داخلي المنشأ مثل المعزز اللاحق الكبير.

على نحو مفيد، اكتشف المخترعون الحاليون أن تزويد فيروس غدّي بجزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يسمح لجزيء شظية مولد ضد ثنائي النوعية بجزيء محمول "piggyback" على

الفيروس الغدّي لإصابة الخلايا السرطانية بعدوى بشكل انتقائي، وبالتالي تمكين التوصيل المستهدف لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية إلى الخلايا السرطانية.

على نحو مفيد، تكون الجزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية صغيرة الحجم ويمكن تكوينها في خلايا الثدييات. ومن ثم، فعندما تصاب الجزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية بالعدوى في الكشف الحالي، يتم تكوين جزيئات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بواسطة خلايا الورم، وتُفرز ويمكن أن تتصرف موضعيا، منتشرةً خارج نطاق الموقع المباشر للفيروس. وهذا يسمح لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية بالانتشار إلى أبعد من الموقع المباشر للعدوى ولكن في نفس الوقت يحد من انتشار الفيروس أكثر بكثير من موقع الخلايا الورمية المصابة. يقلل هذا من خطر الآثار غير المرغوبة بعيدًا عن الهدف.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي عبارة عن EnAd. وقد تبين أن EnAd له نشاط محسّن حال للورم مقارنة بمنصات فيروسات غدية أخرى، على سبيل المثال بناء على Ad5. وقد تبين أيضًا أن EnAd له انتقائية عالية لخلايا كارسينوما carcinoma بشرية مشتقة من ظهارة، مثل خلايا السرطان في القولون، الرئة، المثانة، والكلى. وهذا يجعلها ناقل توصيل مثالي لجزيئات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لأن الخلايا التائية يمكن تنشيطها بواسطة جزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لمهاجمة الخلايا المستهدفة في حين أن EnAd يصيب الخلايا السرطانية ويحللها في وقت واحد. هذا يؤدي إلى هجوم ذي شقين على الورم له تأثير تآزري حال للورم.

في أحد التجسيدات، يكون المكون المضاد لـ CD3 لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية انتقائيا تجاه مولد ضد يتم اختياره من CD3ε وCD3γ وCD3δ، بشكل محدد CD3ε.

يُعد FAP عبارة عن مولد ضد سدوي ورمي. من المفيد أن الخلايا السدوية (الخلايا غير المحولة وراثيًا) التي تعبر عن مولدات الضد هذه لا تخضع لنفس المستوى من عملية تطفير-مقاومة-انتقاء مثل الخلايا المحولة. لذلك، يسهل استهداف هذه الخلايا لعلاج السرطان لأنها ليست "هدفًا متحركًا". وعلاوة على ذلك، فإن أنواع المستقبلات الموجودة في الخلايا السدوية غالبًا ما تكون شائعة عبر أنواع مختلفة من السرطان. وبالتالي، من المرجح أن يكون FAP فعالًا لأنواع السرطان المتعددة.

على نحو مفيد، يتم زيادة FAP زيادة مقننة على الخلايا الليفية الأولية المرتبطة الورم tumour associated fibroblasts. والخلايا الليفية الأولية عنصر حيوي في الكارسينوما الصلبة التي تدعم النمو والغزو والتعافي من التدخلات. وعادة ما تشكل 40-60% من الخلايا في أنواع الكارسينوما المتقدمة. من المفيد أن الخلايا الليفية الأولية خلايا مستقرة وراثيًا وذات احتمالات تجنب علاج أقل من الخلايا السرطانية. إن الخلايا الليفية الأولية النشطة نسبيًا متشابهة نسبيا عبر مجموعة متنوعة من أنواع الأورام. ومن هنا، من خلال تنشيط الخلايا التائية لاستهداف وقتل الخلايا الليفية الأولية المصاحبة للورم المعبرة عن FAP، يمكن أن تساعد الفيروسات الغدّية للكشف الحالي في تقليل طيف المسارات الكابتة المناعية، مثل تلك التي يشارك فيها IL-10، TGFβ وIDO.

في أحد التجسيدات، لا تشكّل BX عن رابطة.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي خيمري chimeric. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي حالّ للورم. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي خيمري وحال للورم. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي قابلًا للانتساخ. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي خيمري، حال للورم وقادر على الانتساخ. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي مؤهلًا للانتساخ. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي خيمري، حال للورم ومؤهل للانتساخ. في أحد التجسيدات، يعاني الفيروس الغدّي من نقص في الانتساخ، على سبيل المثال يكون عبارة عن ناقل.

في أحد التجسيدات، تشتمل BX على جين متحور أو طقم جينات متحورة، بشكل محدد طقم جينات متحورة يشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. في أحد التجسيدات، يكون الجين المتحور الإضافي تحت سيطرة معزز خارجي المنشأ، مثل معزز CMV. قد يكون استخدام المعزز الخارجي مفيدًا في بعض التجسيدات لأنه يمكن أن يعبر عن الجسم المضاد أو شظية بشكل قوي وبنيوي، حيث يمكن أن يكون مفيدا بوجه خاص في بعض المواقف، على سبيل المثال حيثما يعاني المريض من سرطان شديد الانتشار. وعلى نحو مفيد، يؤدي استخدام معزز خارجي بنيوي في الانتساخ المستمر للجين المتحور الذي يكون مرغوبا في مواقف معينة.

في أحد التجسيدات، يشتمل طقم الجينات المتحورة على متوالية كوزاك Kozak، على سبيل المثال، بدء متوالية التشفير، بشكل محدد عند نهاية L5 لطقم الجينات المتحورة.

في أحد التجسيدات، يشتمل طقم الجينات المتحورة أيضا على متوالية تذييل بعديد الأدينيلات polyadenylation ، على سبيل المثال، عند نهاية المتوالية، بشكل محدد عند نهاية منطقة E4 لطقم الجينات المتحورة.

في أحد التجسيدات، يتضمن طقم الجينات المتحورة الترتيبة المبينة في الشكل 1، على سبيل المثال الفيروس NG-641.

في أحد التجسيدات، يتضمن جزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية عمر نصف قصير، على سبيل المثال 48 ساعة أو أقل.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدّي على جزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية واحد فقط.

في تجسيد آخر، يشتمل الفيروس الغدّي على اثنين من جزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية.

في أحد التجسيدات، يشتمل FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على نطاق VH يتضمن متوالية حمض أميني كما هو مبين في المتوالية رقم: 11، أو متوالية حمض أميني متطابقة معها بنسبة 95% على الأقل.

في أحد التجسيدات، يشتمل FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على نطاق VL يتضمن متوالية حمض أميني كما هو مبين في رقم تعريف المتواليات: 10، أو متوالية حمض أميني متطابقة معها بنسبة 95% على الأقل.

في أحد التجسيدات، يشتمل جزء مضاد لـ CD3 لـ FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على نطاق VH يتضمن متوالية حمض أميني كما هو مبين في المتوالية رقم: 6، أو متوالية حمض أميني متطابقة معها بنسبة 95% على الأقل.

في أحد التجسيدات، يشتمل جزء مضاد لـ CD3 من FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على نطاق VL يشتمل على متوالية حمض أميني كما هو مبين في رقم تعريف المتوالية: 7، أو متوالية حمض أميني متطابقة معها بنسبة 95% على الأقل.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي على متوالية حمض نووي كما هو مذكور في أي من رقم تعريف المتوالية: 34 أو 35، أو بولي نوكليوتيد يشفر متوالية الحمض الأميني scFv نفسها، بشكل محدد المتوالية رقم: 34.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي على متوالية حمض نووي كما هو مذكور في المتوالية رقم: 68، المتوالية رقم: 69، أو متوالية بولي نوكليوتيد تشفر نفس متوالية الحمض الأميني.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي على متوالية مبينة في المتوالية رقم: 90 أو متوالية بولي نوكليوتيد تشفر نفس متوالية الحمض الأميني.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي على متوالية مبينة في المتوالية رقم: 91 أو متوالية بولي نوكليوتيد تشفر نفس متوالية الحمض الأميني.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي على متوالية مبينة في المتوالية رقم: 92 أو متوالية بولي نوكليوتيد تشفر نفس متوالية الحمض الأميني.

يدرك الشخص الماهر أن هناك تكرار في شفرة الحمض النووي، وبالتالي فإن الكشف الحالي يمتد إلى EnAd أو Ad11 الذي يشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بحمض أميني تم الكشف عنه هنا.

إن علامة ألفة His عند الطرف C (على سبيل المثال علامة ديكا deca أو هكسا hexa -His) مفيدة لتنقية منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو الفيروس الغدّي. مع ذلك، فهي اختيارية ويمكن استبعادها على سبيل المثال في المنتج النهائي. سيدرك المهرة في المجال أن من الممكن استخدام علامات ألفة أخرى خلاف ديكا-His ويمكن استبعادها بالمثل بدون التأثير على الوظيفية الحيوية لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو الفيروس الغدّي.

بناء على ذلك، في أحد التجسيدات، يشتمل منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على متوالية حمض أميني كما هو مبين في رقم تعريف المتوالية: 1 أو 2، ولكنه يستبعد علامة ألف His عند نهاية الطرف C للمتوالية، على سبيل المثال رقم تعريف المتوالية: 61 أو 62.

ويمتد استبعاد علامة ألفة ديكا-His أيضًا إلى جميع المتواليات الأخرى التي تم الكشف عنها هنا والتي تشتمل على علامة ألفة ديكا-His، أي أن الكشف الحالي يتضمن نفس الأحماض الأمينية أو متواليات الحمض النووي التي تفتقر إلى علامة ألف His عند الطرف C.

في أحد الجوانب، يتم تقديم تركيبة تشتمل على فيروس غدّي كما هو مبين هنا ومادة مخففة أو مادة حاملة.

في أحد الجوانب، يتم تقديم طريقة لعلاج مريض يتشمل على إعطاء كمية فعالة علاجيًا لفيروس غدّي أو تركيبة موصوفة هنا.

في أحد التجسيدات، تكون الطريقة لعلاج السرطان، على سبيل المثال سرطان ظهاري، وبشكل محدد ورم صلب.

في إحدى التجسيدات، يتم تقديم طريقة علاجية تشتمل على إعطاء فيروس وفقًا للكشف الحالي بالاقتران مع مثبط نقطة مراقبة مناعية (مثل مثبط PD-1 أو PDL1)، على وجه الخصوص حيث يتم تشفير مثبط نقطة الضبط في الفيروس.

في إحدى التجسيدات، يتم تقديم طريقة للعلاج تشتمل على إعطاء فيروس وفقًا للكشف الحالي الذي لا يكون في توليفة مع مثبط نقطة مراقبة مناعية (على سبيل المثال كما هو موضح في مكان آخر هنا مثل مثبط PD-1 أو PDL1)، على وجه الخصوص حيث لا يتم تشفير مثبط نقطة الضبط في الفيروس.

إن جزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية المشفرة بالفيروس وفقًا للكشف الحالي تتمتع بالقدرة على تحفيز السمية الخلوية للفيروس.

والمثير للدهشة أن جزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية المشفرة بفيروس وفقًا للكشف الحالي يمكن أن تنشط خلايا CD4+ و/أو خلايا CD8+، على سبيل المثال حتى الخلايا في البيئة الكابتة للورم، بما في ذلك الخلايا التائية في البيئة السائلة للورم، مثل الاستسقاء.

من المفيد أن تقوم منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية المشفرة بفيروس وفقًا للكشف الحالي بتنشيط الخلايا التائية السامة للخلايا، على سبيل المثال حتى الخلايا التائية في البيئة الكابتة للورم، بما في ذلك الخلايا التائية في البيئة السائلة للورم، مثل الاستسقاء.

والأغرب من ذلك أن الـ منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية المشفرة بفيروس وفقًا للكشف الحالي قادرة على تحفيز (تنشيط) تكاثر الخلايا التائية.

يبدو أن الفيروسات المشفرة للمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية وفقًا للكشف الحالي قادرة على تجاوز، أو التغلب على، أو إبطال، البيئة الدقيقة المناعية الكابتة للورم.

في أحد التجسيدات، ينتج عن تنشيط الخلايا التائية زيادة في واسم الخلية التائية، على سبيل المثال CD25.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

يتم وصف الاختراع الحالي على سبيل التمثيل والشرح فحسب في الأمثلة التالية، والتي تشير إلى الأشكال المصاحبة، وفيها:

الشكل 1 يبين رسومات تخطيطية لأطقم الجينات المتحورة NG-615، NG-640 و NG-641.

الشكل 2: انتساخ جينومي فيروسي في سلالات خلايا كارسينوما الرئة، الصدر، والمثانة.

تم معالجة سلالات خلايا A549 (أ)، MDA-MB-453 (ب) و RT4 (ج) بـ NG-617، NG-615، NG-640، NG-641 أو جسيمات فيروس إنادنوتوسيريف enadenotucirev حتى 7 أيام. تم تقدير كمية الجينوم الفيروسي المكتشف بواسطة qPCR عند اليوم 2 و3 و4 و7 بعد المعالجة.

الشكل 3: الانحلال الورمي الذي يشارك فيه الفيروس لخلايا كارسينوما الرئة. تم معالجة خلايا A549 باستخدام NG-617، NG-615، NG-640، NG-641 أو جسيمات فيروس إنادنوتوسيريف حتى 4 أيام. تم تقدير عيوشية الخلايا خلال المستنبت بأكمله باستخدام نظام xCelligence (أ). تم تحديد الزمن الذي تم فيه ملاحظة 50% من قتل الخلايا لكل معالجة فيروس (ب).

الشكل 4: التعبير عن الجين المتحور NG-615 في خلايا كارسينوما الرئة والمثانة. وتم معالجة خلايا A549 (اللوحات اليسرى) وRT4 (اللوحات اليمنى) باستخدام NG-615 أو جسيمات فيروس إنادنوتوسيريف أو تركها بدون تحور حتى 7 أيام. تم تقدير إفراز المركب الترابطي Flt3 (أ)، MIP1α (ب) وIFNα (ج) في المواد الطافية الخلوية بواسطة ELISA. لم يُلاحظ تعبير عن جينات متحورة في عينات المقارنة المعالجة أو غير المعالجة بفيروس إنادنوتوسيريف (البيانات غير مبينة).

الشكل 5: التعبير عن الجين المتحور NG-641 في خلايا كارسينوما الرئة والمثانة. وتم معالجة خلايا A549 (اللوحات اليسرى) وRT4 (اللوحات اليمنى) باستخدام NG-641 أو جسيمات فيروس إنادنوتوسيريف أو تركها بدون تحور حتى 7 أيام. تم تقدير إفراز CXCL9 (أ)، CXCL10 (ب) أو IFNα (ج) في المواد الطافية الخلوية بواسطة ELISA. لم يُلاحظ تعبير عن جينات متحورة في عينات المقارنة المعالجة أو غير المعالجة بفيروس إنادنوتوسيريف (البيانات غير مبينة).

الشكل 6: التعبير عن الجينات المتحورة الوظيفية في خلايا كارسينوما الرئة. تم معالجة A549 باستخدام NG-615، NG-641 أو جسيمات فيروس إنادنوتوسيريف حتى 4 أيام. تم عند اليوم 4 بعد المعالجة تقدير مستوى الجينات المتحورة الوظيفية IFNα (أ) أو MIP1α (ب) المنتجة باستخدام اختبارات مرشدة قائمة على الخلايا.

الشكل 7: التعبير عن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الوظيفي في خلايا كارسينوما الرئة. تم معالجة A549 باستخدام NG-615، NG-615، NG-641 أو جسيمات فيروس إنادنوتوسيريف حتى 4 أيام. تم عند اليوم 2(أ)، و3(ب) و4 (ج) بعد المعالجة تقدير مستوى

FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الوظيفي في المواد الطافية الخلوية بقياس تنشيط سلالة خلايا تائية جوركات Jurkat باستخدام سلالة خلوية ليفية أولية تعبر عن FAP، وهي MRC-5.

الشكل 8أ: IFNα مشفرة بجين متحور في مادة طافية من خلايا A549 مصابة بـ NG-641 تحدث إنتاج SEAP بواسطة خلايا مرشدة جوركات. تم معالجة الخلايا المشتركة مزدوجة جوركات بمادة طافية من سلالة خلايا سرطانية A549 إما غير مصابة (UIC) أو مصابة بفيروس إنادنوتوسيريف (EnAd) أو NG-641 وقياس مستوى المرشد الجنيني المفرز فوسفاتاز (SEAP) القلوي.

الشكل 8ب: CXCL9/10 مشفرة بجين متحور في مادة طافية من خلايا A549 مصابة بـ NG-641 تنشط مسار GPCR في خلايا PathHunter β-Arrestin. تم معالجة خلايا PathHunter β-Arrestin بمادة طافية من سلالة خلايا سرطانية A549 إما غير مصابة (UIC) أو مصابة بفيروس إنادنوتوسيريف (EnAd) أو NG-641 وتم الكشف عن الحث النوعي CXCL9/10 لمسار مستقبل GPCR مقترن بالبروتين G عبر التألق الكيميائي.

الشكل 9: CXCL9/10 مشفرة بجين متحور في مادة طافية من خلايا A549 مصابة بـ NG-641 تحدث تقليل مقنن لـ CXCR3 على سطح الخلايا التائية المنشطة. تم معالجة خلايا تائية بشرية منشطة بمضاد CD3/CD28 بمادة طافية من سلالة خلايا سرطانية A549 إما غير مصابة (UIC) أو مصابة بفيروس إنادنوتوسيريف (EnAd) أو NG-641 وتم قياس التقليل النوعي المستحث بالجين المتحور CXCL9/10 عبر قياس تعداد الخلايا بالتدفق.

الشكل 10: تنشيط الورم الداخلي المتغلغل للخلايا التائية في مستنبتات خارج الخلايا الحية لعينات من أورام بشرية رئيسية تم تلقيحها باستخدام EnAd، NG-615، NG-617، NG-640 أو NG-641، مضاد-CD3/28 أو تُركت غير مصابة (UIC) ويتم عرض مستويات منتجات الجين المتحور الفيروسي IFNa وFlt3L في (أ) ومستويات IFNγ، TNFα، IL-17A، جرانزيم B وIL-13 في (ب).

الشكل 11: تنشيط التعبير عن الواسط السطحي والسيتوكينات بين الخلايا في الورم داخلي المنشأ المتغلغل للخلايا التائية فيي مستنبتات خارج الخلية الحية لعينة ورم NSCLC أولي معالجة بـ

EnAd، NG-617، NG-640 أو NG-641 أو تُركت غير مصابة (UIC) ويتم عرض مستويات الخلايا التائية CD4 وCD8 التي تعبر عن CD25، CD69 وCD107a في (أ) و(ب) على التوالي. ويتم التعبير عن مستويات IFN وTNF بين الخلايا المعبر عنها بواسطة الخلايا التائية CD4 وCD8 في (ج) و(د).

الشكل 12: تمثيل رسومي للجسم المضاد وفقًا للكشف الحالي الذي يشتمل على أو يفتقر إلى علامة ألفة ديكاهيستادين اختيارية Ig SP : ببتيد إشاري؛ His10: علامة ألفة ديكاهيستادين؛ L: رابط؛ VL:نطاق خفيف متغير؛ VH: نطاق ثقيل متغير.

الشكل 13 (أ) بقعة نقطة تبين القياس الكمي لمنشطات خلايا تائية ثنائية النوعية الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني. (ب) رسم بياني لنتائج ELISA لـ FAP.

الشكل 14 رسم بياني لمستويات التعبير عن CD69 (أ) وCD25 (ب) للخلايا التائية المستنبتة بشكل فردي أو مع خلايا NHDF في وجود FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وعينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المقاسة باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق. (ج) رسم بياني لمستويات IFN γ للتعبير عن الخلايا التائية التي يتم استنباتها بمفردها أو مع خلايا NHDF في وجود FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وعينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المقاسة بواسطة صبغ بالسيتوكين بين الخلايا.

الشكل 15 (أ) رسم بياني لنتائج اختبار LDH الذي يبين السمية الخلوية لخلايا NHDF التي تم استنباتها مع الخلايا التائية وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. (ب) رسم بياني لنتائج اختبار LDH الذي يبين السمية الخلوية لخلايا BTC100 التي تم استنباتها مع الخلايا التائية وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. (ج) صور لخلايا NHDF بعد استنباتها مع الخلايا التائية وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مقابل عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

الشكل 16 يُظهر الرسم البياني النسبة المئوية للخلايا التي تعبر عن EpCAM وFAP عبر عدة خلايا وسلالات خلوية.

الشكل 17 (أ) رسم بياني يوضح استجابة NHDF للجرعة بـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مع زيادة تركيز منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. الرسم البياني (ب) و(ج) يبين نتائج اختبار LDH بما يبين السمية الخلوية للخلايا DLD التي تم استنباتها مع الخلايا التائية وEpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

الشكل 18 (أ) رسم بياني يوضح التعبير عن FAP في خلايا CHO المحددة بواسطة FAP أو جسم مضاد مقارن من النوع المتماثل وتحليله بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. (ب) رسم بياني يوضح نتائج اختبار LDH الذي يوضح السمية الخلوية لخلايا CHO أو CHO–FAP التي تم استنباتها مع الخلايا التائية وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

الشكل 19 رسم بياني يوضح تنشيط الخلية التائية (بناءً على مستويات التعبير عن CCD وCD25) بواسطة خلايا CHO مقابل CHO–FAP، ويتم تحليلها باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق.

الشكل 20 (أ) رسم بياني يوضح قدرة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على تنشيط الخلايا التائية CD4+ أو CD8+ (على أساس مستويات التعبير عن CD69 وCD25)، وتحليلها باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق. (ب) رسم بياني يوضح نتائج اختبار LDH الذي يوضح السمية الخلوية لخلايا NHDF التي تم استنباتها مع الخلايا التائية CD4+ أو CD8+ وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

الشكل 21 (أ) رسم بياني يوضح عدد الخلايا التائية CD3+ من استسقاء مستنبت مع عينة مقارنة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية . (ب) رسم بياني يوضح مستويات التعبير عن CD25 للخلايا التائية من مستنبت مع عينة مقارنة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية . (ج) رسم بياني يوضح عدد خلايا FAP+ من استسقاء مستنبت مع عينة مقارنة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية .

الشكل 22 (أ) رسم بياني للقياس الكمي لعدد جينومات الفيروس المكتشف في كل خلية من أجل NG–601 وNG–602 وNG–603 وNG–604 وNG–605 وNG–606 وEnAd. (ب)

رسوم بيانية تبين النشاط الحالّ للورم لـ NG-601، NG-602، NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 أو EnAd بتقييم العدوى من الخلايا A549.

الشكل 23 رسوم بيانية تبين تنشيط الخلايا التائية (على أساس مستويات التعبير عن CD69 وCD25) بواسطة NG-601، NG-602، NG-605 وNG-606 عند استنباتها مع CHO-FAP، وتحليلها باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق.

الشكل 24 يوضح رسومًا بيانيةً تبين نتائج التجارب لتحديد كمية FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المنتجة من NG-605 وNG-606.

الشكل 25 يوضح صورًا مجهريةً لخلايا Ad293 المصابة بـ NG-607 وNG-608 وNG-609 وNG-610.

الشكل 26 (أ) رسم بياني يوضح قدرة NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 وEnAd لقتل خلايا NHDF، وتحليلها باستخدام XCELLigence. (ب) رسم بياني يوضح قدرة NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 وEnAd لقتل خلايا NHDF، وتحليلها باستخدام اختبار LDH.

الشكل 27 يوضح رسومًا بيانيةً تبين تنشيط الخلايا التائية (على أساس مستويات التعبير عن CD69 وCD25) بواسطة NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 المستنبتة مع خلايا NHDF، خلايا SKOV وT، التي تم تحليلها باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق.

الشكل 28 (أ) رسم بياني يوضح تنشيط الخلايا التائية (على أساس مستويات التعبير عن CD69 وCD25) بواسطة NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 المستنبتة مع NHDF وخلايا SKOV مقابل SKOV وحدها، التي تم تحليلها باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق. (ب) رسم بياني يوضح السمية الخلوية لخلايا NHDF المصابة بـ NG-605 وNG-606، وتحليلها باستخدام اختبار LDH.

الشكل 29 يوضح صور إطارية ثابتة من مقاطع فيديو متتابعة لتحلل خلايا NHDF عن طريق FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو EnAd أو NG-603 أو NG-605 ناتجة عن عودة الاتحاد الجيني.

الشكل 30 يوضح صور إطارية ثابتة لمقاطع فيديو متتابعة لتحلل خلايا NHDF بواسطة NG-607 أو NG-608 أو NG-609 أو NG-610.

الشكل 31 يوضح رسمًا بيانيًا للسمية الخلوية لخلايا DLD المصابة بـ EnAd، و NG-601، و NG-602، و NG-603 و NG-604 في وجود الخلايا التائية أو غياب الخلايا التائية، وتحليلها باستخدام XCELLigence.

الشكل 32 (أ) رسم بياني يبين مستويات التعبير عن CD25 على الخلايا التائية CD3+ في عينات خلايا استسقاء التي كانت مصابة بفيروسات الكشف الحالي. (ب) رسم بياني يبين عدد خلايا FAP+ في عينات استسقاء المصابة بفيروسات الكشف الحالي.

الشكل 33 يوضح رسمًا بيانيًا يبين عدد الخلايا التائية CD3+ في عينات استسقاء تم الحصول عليها من مريض سرطان ومصاب بفيروسات الكشف الحالي.

الشكل 34 يوضح رسمًا بيانيًا يبين مستويات التعبير عن CD25 على الخلايا التائية CD3+ في عينات استسقاء تم الحصول عليها من مريض سرطان مصاب بفيروسات الكشف الحالي.

الشكل 35 يوضح رسمًا بيانيًا يبين عدد خلايا FAP+ في عينات الاستسقاء التي تم الحصول عليها من مريض سرطان ومصاب بفيروسات الكشف الحالي.

الشكل 36 يوضح مقارنة بين تنشيط إنتاج السيتوكين للخلايا التائية بواسطة بروتين FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ناتج عن عود الاتحاد الجيني في وجود الخلايا الليفية الأولية البشرية وبالتنشيط متعدد النسائل لخرز مضاد لـ CD3/CD28. (أ) قياس مستويات IFNγ بواسطة ELISA. (ب) قياس مستويات السيتوكين بواسطة مصفوفة خرز السيتوكين.

الشكل رقم 37 يحث منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المستهدَف من FAP على إزالة تحبيب الخلايا التائية والسمية الخلوية النوعية لخلايا FAP+

(أ) إزالة تحبيب الخلايا التائية في المستنبت باستخدام خلايا NHDF (بنسبة 5: 1) و(ب) مواد طافية تحتوي على منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. تم تقييم عملية إزالة التحبيب عن طريق تخارج CD107a بعد استنبات لمدة 6 ساعات باستخدام جسم مضاد خاص بـ CD107a محدد وقياسه بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. تم استخدام خرز ديناميكي كعينة مقارنة موجبة. (ج) تم تقييم السمية الخلوية للخلايا NHDF بعد 24 ساعة في مستنبت مشترك مع الخلايا التائية (بنسبة 5 : 1) وتخفيفات تسلسلية لـ 10 أضعاف من المواد الطافية التي تحتوي على منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. تم تقييم السمية الخلوية بإطلاق LDH في مواد طافية للمستنبت. (د) تم تقييم تحلل NHDF عبر إطلاق LDH (يسار) وحث CD25 على الخلايا التائية (يمين) بعد 24 ساعة من الاستنبات المشترك مع خلايا تائية مشتقة من PBMC (1: 5) من ستة مانحين أصحاء ومواد طافية تحتوي على منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

الشكل 38: يقوم EnAd الذي يعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بالقتل الانتقائي للخلايا الليفية الأولية FAP+ وتقليل TGFb في عينات الاستسقاء البريتوني

(أ، ب) عدد الخلايا الليفية الأولية FAP+ (أ) خلايا الورم EpCAM+ (ب) بعد استنبات لمدة 72 ساعة مع خلايا تائية مشتقة من PBMC و EnAd أو فيروسات ناتجة عن عودة الاتحاد الجيني. تم عزل خلايا الاستسقاء لأول مرة من استسقاء ثلاثة مرضى وتمديدها خارج الجسم الحي. تم قياس عدد الخلايا بعد 72 ساعة من الإصابة بالفيروس بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. (ج) تم قياس حث علامة التنشيط CD25 على خلايا CD3 المشتقة من PBMC من (أ) بعد 72 ساعة من الإصابة بالفيروس. (د) تم قياس مستويات TGFb بواسطة ELISA باستخدام مواد طافية تُحصد من (أ).

الشكل 39 يبين تنشيط الورم الداخلي المرتبط بالخلايا التائية وما يرتبط به من قتل خلايا FAP+ في عينات خزعة استسقاء خبيثة من المريض بواسطة بروتين FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وفيروسات EnAd-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. (أ) تنشيط خلية تائية مقاسة بالتعبير عن CD25. (ب) العدد المتبقي من خلايا FAP+ المقاسة بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق.

الشكل رقم 40 تأثير الأجسام المضادة المعيقة لـ PD-L1 على تنشيط الخلايا التائية التي يشارك فيها منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في عينة المريض

(أ) تم تقييم التعبير عن PD1 بواسطة الخلايا التائية الداخلية و PD-L1 على خلايا FAP+ بعد عزلها الأولي من استسقاء بريتوني بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. (ب) تم تحضين إجمالي الخلايا غير المنقاة من الاستسقاء البريتوني في سائل 50% من نفس الإفراز في وجود منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، أو EnAd، أو فيروس ناتج عن عودة الاتحاد الجيني، مع أو بدون جسم مضاد معيق لـ PD-L1. بعد يومين، تم حصاد إجمالي عدد الخلايا، وتم تحديد عدد الخلايا التائية CD25+ من خلال عدّ الخلايا بالتدفق. (ج) تم قياس كمية الإنترفيرون جاما في مواد طافية لمستنبت من (ب، د) تم القياس بواسطة ELISA. (د) تم قياس عدد الخلايا FAP+ المتبقية في (ب) باستخدام عدّ الخلايا بالتدفق.

الشكل 41: ينشط EnAd الذي يعبر عن منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية الخلايا التائية ويعيد توجيهها من عينات خزعة للمريض لتحليل الخلايا الليفية الأولية NHDF

(أ) التعبير عن PD-1 بواسطة الخلايا التائية الداخلية بعد العزل من متبرعين أصحاء أو عينات خزعة سرطان إفراز خبيث. تم قياس التعبيرعن PD-1 بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. (ب) تم قياس نسبة الخلايا CD3+ داخل مجموعة الخلايا غير المنقاة لـ PBMC وعينات الخزعة السرطانية حسب قياسها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. (ج) تم قياس مستويات الإنترفيرون جاما بواسطة ELISA في مواد طافية لمستنبت تم حصدها من (ب) بعد 120 ساعة من المعالجة. (د) تمت مراقبة الخلايا الليفية الأولية NHDF في الوقت الحقيقي على مدى 130 ساعة بواسطة اختبار السمية الخلوية في مستنبت مشترك مع PBMC أو إجمالي خلايا خزعة للسرطان (1: 5) ومادة طافية تحتوي على منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

الشكل 42 يوضح تأثير عينات سائل الاستسقاء الكابتة مناعيا على تنشيط بمشاركة خرز FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وخرز مضاد لـ CD3/CD28 للخلايا التائية PBMC. (أ) تم تنشيط الخلايا التائية PBMC باستخدام الخرز الديناميكي المضاد لـ CD3/Cd28. (ب) يتم

تنشيط الخلايا التائية PBMC باستخدام العينة المقارنة أو FAP منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية في وجود خلايا NHDF. NS: مصل عادي، A: استسقاء بريتوني.

الشكل 43 يقوم EnAd الذي يعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية باستقطاب الخلايا الملتهمة الكبيرة CD11b+ في استسقاء لمريض إلى نمط ظاهري أكثر التهابًا

(أ) تم تحضين إجمالي الخلايا غير المنقاة من عينة استسقاء في 50% من سائل استسقاء في ظل وجود منشط خلايا تائية ثنائية النوعية حر أو منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يعبر عن الفيروس. تم استخدام علاج إنترفيرون جاما كعينة مقارنة موجبة. بعد 3 أيام، تم حصاد إجمالي عدد الخلايا وتم قياس حث علامة التنشيط CD25 على الخلايا CD3+ بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. (ب) تم قياس مستويات الإنترفيرون جاما في المواد الطافية للمستنبت من (أ) بواسطة ELISA. (ج) في اليوم 3، تم قياس مستويات التعبير عن CD68، CD86، CD206 وCD163 على خلايا CD11b+ من (أ) بواسطة عد الخلايا بالتدفق. يتم عرض أطياف تمثيلية لعد الخلايا بالتدفق من ثلاثيات جنبًا إلى جنبٍ مع مجموعة البيانات الكاملة.

الشكل 44 تحديد خصائص البنية والتركيبة الخلوية لورم البروستاتا الصلب

(أ) صبغ EpCAM، (ب) صبغ CD8، (ج) صبغ FAP، (د) صور كيمياء نسيجية مناعية تمثيلية لحث CD25 بداخل شرائح ورم بروستاتا بعد العلاج بخلايا تائية ثنائية النوعية تعبر عن الفيروسات. تم تقطيع قلوب الورم بواسطة جهاز تقطيع هزاز إلى سمك 300 ميكرو متر واستنباتها واصابتها بمدخلات وحصدها بعد 7 أيام من المعالجة. (هـ) مستويات IFNg في وسط مستنبت تضفير نسيج تقاس بواسطة ELISA. تم حصاد مواد طافية من مستنبتات شرائح من الأنسجة الخبيثة والحميدة عند نقطة زمنية محددة. (و) قياس مستويات IL-2 في وسط مستنبت الأنسجة الخبيثة والحميدة تم قياسها بواسطة ELISA.

الشكل 45 يوضح تمثيلًا تخطيطيًا لأطقم الجينات المتحورة.

الشكل 46 يوضح رسمًا بيانيًا يشير إلى عدد الجينومات الفيروسية المكتشفة لكل خلية في الخلايا السرطانية المعالجة NG-611 وNG-612 وNG-617.

الشكل 47 يوضح النسبة المئوية للخلايا التائية التي تعبر عن CD69 (أ)، CD25 (ب) HLA-DR (ج)، CD40L (د) أو CD107a عند سطح الخلية (هـ) عقب الاستنبات المشترك مع خلايا SKOV التي تعبر عن EpCam ومواد طافية محصودة من الخلايا A549 بعد المعالجة بـ 24 أو 48 أو 72 ساعة بواسطة جزيئات فيروسية NG-611 بالمقارنة مع NG-612 أو enadenotucirev أو مواد طافية لعينة غير معالجة.

الشكل 48 يوضح النسبة المئوية للخلايا التائية التي تعبر عن CD69 (أ)، CD25 (ب) HLA-DR (ج)، CD40L (د) أو CD107a عند سطح الخلية (هـ) بعد مستنبت مشترك مع خلايا MRC-5 التي تعبر عن FAP ومواد طافية تم حصادها من خلايا A549 بعد 24 أو 48 أو 72 ساعة من المعالجة بجزيئات NG-612 مقارنة بـ NG-611 أو enadenotucirev أو مواد طافية لعينة غير معالجة.

الشكل 49 يوضح النسبة المئوية لخلايا MRC-5 التي تعبر عن EpCAM وFAP.

الشكل 50 يوضح التعبير IFNγ في المواد الطافية لمستنبتات الخلايا التائية مع خلايا SKOV (أ) أو خلايا MRC-5 (ب) المحتضنة بمواد طافية تم حصادها من خلايا A549 بعد 24 أو 48 أو 72 ساعة من المعالجة مع NG-611 أو NG-612 أو جزيئات الفيروس enadenotucirev أو مواد طافية لعينة غير معالجة.

الشكل 51 يوضح فعالية مكافحة للورم والتنشيط المناعي لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية يعبر عن الفيروسات في داخل جسم الكائن الحي. (أ) حجم الورم في الفئران المعالجة بالمحلول الملحي، enadenotucirev أو NG-611. (ب) نسبة CD8 الخلايا التائية من النوع CD8 إلى CD4 في الأورام المعالجة بـ NG-611 بالمقارنة مع العينات المعالجة بـ enadenotucirev أو عينات المقارنة غير المعالجة.

الشكل 52 يوضح رسمًا بيانيًا يشير إلى عدد الجينومات الفيروسية المكتشفة لكل خلية في الخلايا السرطانية المعالجة بـ NG-612 وNG-615.

الشكل 53 يوضح لتعبير عن IFNα وMIP1α وFlt3 L في المادة الطافية الخلوية لـ NG-615 المادة الطافية لفيروس enadenotucirev وخلايا ورم عينة مقارنة غير معالجة.

الشكل 54 يوضح عدد الخلايا التائية التي تعبر عن CD69 (أ)، CD25 (ب) HLA-DR (ج)، CD40L (د) أو CD107a عند سطح الخلية (هـ) بعد مستنبت مشترك مع خلايا MRC-5 التي تعبر عن FAP ومواد طافية تم حصادها من خلايا A549 بعد 24 أو 48 أو 72 ساعة من المعالجة مع جسيمات فيروس NG-615 مقارنة بـ NG-612 أو enadenotucirev أو مواد طافية لعينة مقارنة غير معالجة.

الشكل 55 يوضح التعبير عن IFNγ في مواد طافية لمستنبتات الخلايا التائية المشتركة مع خلايا MRC-5 المحتضنة بمواد طافية تم حصادها من خلايا A549 بعد 24 أو 48 أو 72 ساعة من المعالجة مع NG-612، NG-615 أو جزيئات فيروس enadenotucirev، أو مواد طافية لعينة مقارنة غير معالجة.

الوصف التفصيلي:

إن الخلية المناعية وفقًا لاستخدامها هنا خلية لها دور وظيفي في الجهاز المناعي، بما في ذلك (على سبيل المثال لا الحصر)، الخلايا الملتهمة الكبيرة macrophages ، العَدِلات neutrophils ، الخلايا التغصنية dendritic، خلايا NK، الخلايا اللمفاوية lymphocytes، مثل الخلايا اللمفاوية التائية (على وجه الخصوص الخلايا التائية والخلايا NKT).

يشير موقع ربط مولد ضد كما هو مستخدم هنا إلى جزء من الجزيء، الذي يشتمل على زوج من المناطق المتغيرة، وعلى وجه الخصوص زوج متشابه يتفاعل تحديدًا مع مولد الضد المستهدف.

على وجه التحديد، كما هو مستخدم هنا، يُقصد بذلك المصطلح الإشارة إلى موقع ربط لا يتعرف إلا على مولد الضد الذي يكون محددًا أو موقع ربط له ألفة ارتباط أعلى بشكل ملحوظ نحو مولد الضد الذي يختص به مقارنة بالألفة نحو مولدات ضد لا يختص بها، على سبيل المثال ألفة ارتباط أعلى بمقدار 5، 6، 7، 8، 9، 10 مرات. يمكن قياس ألفة الارتباط بتقنيات مثل BIAcore.

يشير جزيء الجسم المضاد ثنائي النوعية كما هو مستخدم هنا إلى جزيء يحتوي على نطاقي ربط مولد ضد، مما قد يربط مولدات ضد متشابهة أو مختلفة. ويُعتبر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية فئة فرعية من جزيئات الأجسام المضادة ثنائية النوعية.

يشير منشط خلايا تائية ثنائية النوعية كما هو مبين هنا إلى موصل خلايا تائية ثنائية النوعية، بشكل محدد يتضمن نطاق ربط مضاد لـ CD3 ونطاق ارتباط إضافي، في هذه الحالة نطاق ارتباط مضاد لـ FAP. بصفة عامة، تكون نطاقات الارتباط في صورة scFv. ويتم عرض تمثيل تخطيطي لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية في الشكل 12.

يشير موصل خلايا تائية ثنائية النوعية (منشط خلايا تائية ثنائية النوعية) كما هو مستخدم في هذه الوثيقة إلى فئة من الأجسام المضادة الاصطناعية أحادية النسيلة ثنائية النوعية التي تشتمل على اثنين من أجسام مضادة scFvs مختلفة أو متواليات أحماض أمينية من 4 جينات مختلفة على سلسلة ببتيد واحدة بوزن حوالي 55 كيلو دالتون kilodalton. يختص واحد من scFvs بخلية مناعية، مثل مولد ضد خلية تائية، مثل مستقبل CD3، معبرًا عنه على سطح الخلايا التائية. يرتبط scFv الآخر، في تقنيات الفن السابق، عادةً بخلية ورم عن طريق جزيء خاص بالورم. وبناءً على ذلك، تستطيع جزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية تكوين رابطة بين الخلايا التائية والخلايا الورمية بحكم خصائصها النوعية لمولد ضد على الخلية التائية ومولد ضد على الخلية الورمية. ويؤدي هذا إلى تنشيط الخلايا التائية وحثها على إعطاء تأثيرات سامة للخلايا على الخلايا الورمية، بمعزل عن MHC I أو الجزيئات المحفزة المشتركة.

في أحد التجسيدات، يتم ترتيب موصل الخلية التائية T بصيغة VL1-رابط-VH1-1 رابط-2 VH2- رابط3-VL2 ، على سبيل المثال، مستخدمًا الروابط التي تم اختيارها بشكل مستقل من المتواليات الرابطة التي تم الكشف عنها هنا.

في أحد التجسيدات، يقع الرابط منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بين 10 و30 حمضًا أمينيًا، مثل 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 21، 22، 23، 24، 25 أو 26 أو 27 أو 28 أو 29 أو 30، على سبيل المثال، رابط تم الكشف عنه هنا.

يشير مصطلح مولد ضد سدوي أو مولد ضد سدى كما هو مستخدم هنا إلى هدف علاجي مولد للضد في السدى، بما في ذلك معبرًا عنه في البنية الجزيئية لمصفوفة السدى، مثل جزيئات النسيج الضام أو الجزيئات المرتبطة بهذه المصفوفة أو مولدات الحماية المرتبطة بالمكونات الخلوية للسدى، على سبيل المثال معبرًا عنها على الخلايا الليفية الأولية، الخلايا الملتهمة الكبيرة المرتبطة بالورم، الخلايا التغصنية، خلايا NK و/أو الخلايا التائية التي تسللت إلى السدى. تتضمن أمثلة لمولدات ضد سدويى على سبيل المثال وليس الحصر FAP، TGFβ، TREM1، IGFBP7، FSP-1، مولد الضد المرتبط بالخلايا الليفية الأولية، NG2، إندوسيالين endosialin (CD248)، مستقبل عامل-ألفا للنمو المشتق من الصفيحات platelet-derived growth factor-α receptor (PDGFR-α)، مستقبل عامل-بيتا للنمو المشتق من الصفيحات platelet-derived growth factor-β receptor (PDGFR-β) وثيمِنتين. بصفة عامة لا يتم التعبير عن مولدات الضد السدوية على خلايا سرطان، بمعنى أكثر تحديدا، لا يتم التعبير عنها على الخلايا السدوية.

يمكن استهداف الخلايا الليفية الأولية عن طريق استخدام مولد ضد بروتين تنشيط خلايا ليفية أولية fibroblast activation protein (FAP)، على وجه الخصوص الجسم المضاد الخاص بـ FAP والذي لا يربط CD26، (أنظر US2012/0258119 التي يتم تضمينها هنا كمرجع).

تم تعريف FAP أصلًا باعتباره بروتياز سيرين على الخلايا الليفية الأولية السدوية التفاعلية. كشف إنشاء نسائل جزيئية لاحقة عن أن FAP مماثل للنشر، جيلاتيناز gelatinase مرتبط بالغشاء بوزن 170 كيلو دالتون الذي يتم التعبير عنه بواسطة خلايا سلالة نخاعية. شفر cDNA كامل الطول بروتياز عبر غشائي من النوع H بطول 760 حمض أميني (aa) متجانس بشكل كبير مع داي ببتيديل ببتيداز dipeptidyl peptidase IV IV اختصارًا (DPPIV) بتطابق aa قدره 52% على السلسلة الكاملة وتطابق حوالي 70% في النطاق الحفزي. تصف US5,587,299، المتضمنة هنا كمرجع، جزيئات الحمض النووي المشفرة لـ FAP وتطبيقاتها.

وبإيجاز، يتم التعرف على FAP كبروتين protein متعدد الوظائف ينفذ وظائفه الحيوية بطريقة متوقفة على الخلايا من خلال توليفة من نشاط البروتياز protease الخاص به وقدرته على تكوين معقدات ذات جزيئات أخرى عند سطح الخلية. إن التعبير المفرط عن FAP في سلالات

الخلايا الظهارية والخلايا الليفية الأولية يعزز السلوك الخبيث، بما يشير إلى الوضع السريري، حيث يتم ربط مستويات التعبير الخلوية لـ FAP بنتائج سريرية سيئة.

من خلال إشارات جزيئات النظير الصماوي، تقوم الخلايا السرطانية بتنشيط الخلايا الليفية الأولية السدوية وتحفز التعبير عن FAP، والذي بدوره يؤثر على انتشار الخلايا السرطانية وغزوها وارتحالها. وقد أظهرت الدراسات الحديثة أن TGF-β هو العامل المهيمن في تعزيز التعبير عن البروتين FAP (Chen, H et al (2009) Exp and Molec Pathology, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001). يتم التعبير عن FAP بشكل كبير على الخلايا الليفية الأولية السدوية التفاعلية بنسبة 90% من أنواع الكارسينوما الظهارية البشرية، بما في ذلك سرطان الثدي والرئة وسرطان القولون والمبيض (Garin-Chesa, P et al (1990) PNAS USA 87: 7236-7239). أظهر Chen et al مؤخرًا أن FAPα يؤثر على غزو وانتشار وارتحال خلايا سرطان المبيض HO-8910PM (Chen, H et al (2009) Exp and Molec Pathology, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001).

يمكن استهداف FAP من خلال ربط مولد الضد المذكور ويثبط تفاعله مع الجزيئات ذات الصلة حيويًا. كبديل لذلك، أو بالإضافة إلى ذلك، فإن الربط التبادلي لجزيء FAP بجزيء FAP آخر أو جزيء مختلف، على سبيل المثال، بخلايا تائية. وقد أدى هذا الارتباط التبادلي إلى زيادة وضوح الخلايا التي تحمل FAP إلى أجهزة المناعة، والتي يمكن تنشيطها بعد ذلك لتعادلها أو تدميرها.

يكون لدى الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي القدرة على إصابة خلايا الورم بعدوى، وعلى وجه الخصوص يتم اختياره لإصابة الخلايا الورمية بشكل تفضيلي. تؤدي الإصابة بفيروس حال للورم إلى موت وتحلل الخلايا السرطانية مع إطلاق جسيمات فيروسات جديدة. إن الجينات المتحورة المتضمَّنة مثل منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية والسيتوكينات يتم تخليقها في الخلايا وإفرازها بنشاط بالخلايا السرطانية المذكورة قبل موتها. وسوف تُطلق بعض الجزيئات أيضًا عند انحلال الخلية.

قد يمكن أن تكون جزيئات الجسم المضاد- مثل منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية- ذات عمر نصف قصير مناسب بشكل خاص للاستخدام في الكشف الحالي لأن هذا يقلل من التأثيرات خارج الهدف لأن الجسم يزيل الجزيئات بسرعة إذا أصبحت متوفرة بشكل منتظم.

من هنا، فإن الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي يتضمن 2 أو 3 آليات على الأقل لمهاجمة الورم، بما في ذلك الآليات غير المباشرة التي تقوّض سدى الورم.

يشير مصطلح الجين المتحور كما هو مستخدم هنا إلى جين تم إدخاله في متوالية الجينوم genome، وهي جين غير طبيعي للفيروس (خارجي المنشأ) أو لا يوجد عادة في ذلك الموقع المحدد في الفيروس. وهناك أمثلة من الجينات المتحورة معروفة في المجال ويتم مناقشتها هنا. يحتوي الجين المتحور كما هو مستخدم هنا على شظية وظيفية للجين تُعد جزء من الجين الذي عندما يتم إدخاله يكون مناسبًا لأداء الوظيفة أو معظم وظيفة الجين الكامل الطول.

يتم استخدام الجين المتحور ومتوالية التشفير بالتبادل هنا في سياق التضمينات في الجينوم الفيروسي، ما لم يدل السياق على خلاف ذلك. إن مصطلح متوالية التشفير كما هو مستخدم هنا يعني، على سبيل المثال، متوالية حمض نووي تشفر رنا RNA وظيفي، ببتيد peptide ، بولي ببتيد polypeptide أو بروتين protein. عادة ما تكون متوالية التشفير عبارة عن cDNA للجين المتحور الذي يشفر RNA الوظيفي، الببتيد، البولي ببتيد أو البروتين محل الاهتمام. يوصف أدناه الحمض النووي الريبي RNA الوظيفي، والببتيدات، والببتيد، والبروتينات محل الاهتمام.

من الواضح أن جينوم الفيروس يحتوي على متواليات تشفير الحمض النووي. لا تُعتبر الجينات داخلية المنشأ (المتواجدة طبيعيًا) في المتوالية الجينومية للفيروس جينات متحورة، في سياق الوصف الحالي إلا إذا تم تعديلها بواسطة تقنيات إعادة الاتحاد الجيني مثل أنها في موقع غير طبيعي أو في بيئة غير طبيعية.

في أحد التجسيدات يشير مصطلح الجين المتحور، كما هو مستخدم هنا، إلى جزء من الحمض النووي الذي يحتوي على جين أو متوالية cDNA تم عزلها من كائن حي واحد وإدخالها في كائن حي مختلف، أي فيروس الكشف الحالي. في أحد التجسيدات، قد يحتفظ هذا الجزء غير الأصلي من الـ DNA بالقدرة على إنتاج RNA الوظيفي أو الببتيد أو بولي الببتيد أو البروتين.

من هنا، في أحد التجسيدات، يشفر الجين المُدخل المتحور بروتينًا بشريًا أو متوافقًا مع البشر، أو بولي ببتيد أو ببتيد.

يشير مصطلح "مرتبط وظيفيًا" كما هو مستخدم هنا إلى جينات متحورة يتم ربطها بالعناصر التنظيمية الضرورية بالجينات الخيفية لتكون عاملة، بمعنى أكثر تحديدًا للسماح بالتعبير عن الجينات باستخدام آليات خلوية بمجرد وجود الفيروس في الخلية.

في تجسيد واحد أو أكثر، يتم ترتيب الطقم كما هو موضح في واحد أو أكثر من الأشكال أو الأمثلة.

يشير طقم الجينات المتحورة طبقًا لاستخدامه هنا إلى متوالية حمض نووي تشفر واحد أو أكثر من الجينات المتحورة في صورة واحدة أو أكثر من جينات التشفير وواحد أو أكثر من العناصر التنظيمية.

يمكن لطقم جينات متحورة أن يشفر واحدة أو أكثر من متواليات mRNA أحادي السيسترون monocistronic و/أو متعدد السيسترونات polycistronic.

في أحد التجسيدات، يشفر الجين المتحور أو طقم الجينات المتحورة mRNA أحادي السيسترون و/أو متعدد السيسترونات، وعلى سبيل المثال يكون الطقم مناسبا للإدخال في جينوم الفيروس الغدّي بموقع تحت سيطرة معزز داخلي أو خارجي المنشأ أو توليفة منهما.

يشير mRNA أحادي السيسترون إلى جزيء mRNA يشفر RNA وظيفي، ببتيد، بولي ببتيد، أو بروتين مفرد.

في أحد التجسيدات، يشفر طقم الجينات المتحورة mRNA أحادي السيسترون.

في أحد التجسيدات، يشير مصطلح طقم الجينات المتحورة في سياق طقم يشفر mRNA أحادي السيسترون إلى جزء من الحمض النووي يحتوي اختياريًا على معزز خارجي (عبارة عن متوالية تنظيمية تحدد موقع ووقت نشاط الجين المتحور) أو موضع التضفير (عبارة عن متوالية تنظيمية تحدد متى سيتم شطر mRNA بجسم تضفير)، متوالية تشفير (بمعنى الجين المتحور)، المشتق

عادةً من cDNA للبروتين محل الاهتمام، اختياريًا يحتوي على متوالية إشارة بولي A ومتوالية إنهاء.

في أحد التجسيدات، يمكن لطقم الجينات المتحورة أن تشفر واحدة أو أكثر من متواليات mRNA متعدد السيسترونات.

يشير مصطلح mRNA متعدد السيسترونات طبقًا لاستخدامه هنا إلى جزيء mRNA يشفر اثنين أو أكثر من RNA، ببتيدات أو بروتينات وظيفية أو توليفة منها. في أحد التجسيدات، يشفر طقم الجينات المتحورة mRNA متعدد السيسترونات.

في أحد التجسيدات، يشتمل طقم جينات متحورة في سياق طقم يشفر mRNA متعدد السيسترونات على جزء من الحمض النووي الذي يحتوي اختياريًا على معزز خارجي (وهو متوالية تنظيمية ستحدد أين ومتى يكون الجين نشطًا) أو موضع التضفير (وهو متوالية تنظيمية ستحدد متى ينشطر جزيء mRNA بواسطة جسيم التضفير)، اثنين أو أكثر من متواليات التشفير (أي الجينات المتحورة)، المشتقة عادة من cDNA للبروتين أو الببتيد محل الاهتمام، على سبيل المثال حيث يتم فصل كل متوالية تشفير IRES أو ببتيد 2A. بعد نسخ متوالية التشفير الاخيرة، يمكن أن يحتوي الطقم اختياريًا على متوالية بولي A ومتوالية إنهاء.

في أحد التجسيدات، يشفر طقم الجينات المتحورة على mRNA أحادي السيسترون متبوعا بـ mRNA متعدد السيسترونات. في تجسيد آخر، يكون طقم الجينات المتحورة عبارة عن mRNA متعدد السيسترونات متبوعًا بـ mRNA أحادي السيسترون.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي عبارة عن فيروس غدّي بشري. ويشير مصطلح "فيروس غدّي"، "نمط مصلي" أو "نمط مصلي فيروسي غدّي" طبقًا للاستخدام هنا إلى اي فيروس غدّي يمكن تعيينه لأي من الأكثر من 50 نمط مصلي فيروسي غدّي معروف حاليا، التي يتم تصنيفها إلى أنواع فرعية أ–و وتمتد أيضًا لتغطي أيا من الأنماط المصلية الفيروسية الغدّية غير المحددة أو غير المصنفة بعد. انظر، على سبيل المثال، المراجع The Adenoviruses, Ginsberg, Shenk, و ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984) "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," in Fields Virology,

Vol.2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265-2267 (2001)، كما هو مبين في الجدول 1.

الجدول 1

المجموعة الفرعية	الأنماط المصلية الفيروسية الغدّية
A	12، 18، 31
B	3، 7، 11، 14، 16، 21، 34، 35، 51
C	1، 2، 5، 6
D	8-10، 13، 15، 17، 19، 20، 22-30، 32، 33، 36-39، 42-49، 50
E	4
F	40، 41

في أحد التجسيدات، تعد الفيروسات الغدّية وفقًا للكشف الحالي عبارة عن مجموعة فرعية من الفيروسات B، بمعنى AD11، وبشكل محدد Ad11p (سلالة Slobitski) ومشتقاتها، مثل EnAd.

يتم تعيين الفيروسات الغدّية إلى مجموعاتها/أنماطها المصلية على أساس القفيصة، مثل الهِكسون و/أو الألياف.

في أحد التجسيدات، إن الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي لا يمثل مجموعة فيروس A، C، D، E أو F. لا تشتمل فيروسات الكشف الحالي على بروتين وفاة فيروس غدّي.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي للكشف الحالي خيمري. عندما يكون الفيروس الغدّي خيمريًا، يتم استخدام خصائص القفيصة الخارجية لتحديد النمط المصلي. يشير مصطلح "خيمري" كما هو مستخدم هنا إلى فيروس يحتوي على حمض نووي من نمطين مصليين مختلفين للفيروس على الأقل، بما في ذلك أنماط مصلية مختلفة داخل نفس المجموعة.

في أحد التجسيدات، يتضمن الفيروس الحال للورم ألياف the oncolytic virus has a fibre ، هكسون ، وبروتينات بنتون penton proteins من نفس النمط المصلي، على سبيل المثال

Ad11، على وجه الخصوص Ad11p، على سبيل المثال الموجودة في المواضع 30812-31789، 18254-21100 و13682-15367 للمتوالية الجينومية للأخيرة حيث تُعزى مواضع النوكليوتيد the nucleotide إلى رقم تعريف بنك الجينات 217307399 (رقم القيد: GC689208).

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الغدّي عبارة عن Enadenotucirev (المعروف أيضًا باسم EnAd وكان سابقًا EnAd). يشير Enadenotucirev على النحو المستخدم هنا إلى الفيروس الغدّي الخيمري الذي له المتوالية رقم: 28. وهو فيروس غدّي خيمري حال للورم مؤهل للنسخ الذي يتضمن خصائص علاجية محسنة مقارنة بالفيروسات الغدّية من النوع غير المعالج (انظر البراءة الدولية 2005/118825). يتضمن EnAd منطقة E2B خيمرية، والتي تحتوي على الحمض النووي من Ad11p و Ad3، وصيغ الحذف في E3/E4. تنتج التغييرات البنيوية في enadenotucirev في الجينوم الذي يكون أصغر بحوالي 3.5 كيلو بايت من Ad11p وبالتالي توفير "مساحة" إضافية لإدخال الجينات المتحورة.

يتم حذف كل منطقة E3 وجزء من منطقة E4 تقريبًا في EnAd. لذلك، يتضمن مساحة كبيرة في الجينوم لاستيعاب مواد وراثية إضافية بينما يبقى قابلة للحياة. علاوة على ذلك، نظرًا لأن EnAd عبارة عن فيروس غدّي من الفئة الفرعية B، فإن المناعة الموجودة مسبقًا في البشر أقل شيوعًا من، على سبيل المثال، Ad5. وتشمل الأمثلة الأخرى على الفيروسات الخيميرية الحالة للورم مع الألياف AD11، بنتون وهكسون OvAd1 و OvAd2 (انظر البراءة الدولية 2008/080003 التي يتم تضمينها كمرجع). من هنا، في أحد التجسيدات، يُستخدم الفيروس الغدي في OvAd1 و OvAd2.

يبدو أن EnAd يصيب الخلايا الورمية بشكل تفضيلي، وينسخ بسرعة في هذه الخلايا ويسبب تحلل الخلية. هذا، بدوره، يمكّن من تولد استجابة مناعية التهابية وبالتالي تحفيز الجسم لمحاربة السرطان. يُفترض أن يرتبط جزء من نجاح EnAd بالتكرار السريع للفيروس في داخل جسم الكائن الحي.

إن التزويد الانتقائي لفيروس بالحمض النووي الذي يشفر بعض البروتينات، مثل منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، والذي يمكن التعبير عنه داخل الخلية السرطانية، قد يمكّن من استخدام دفاعات الجسم الخاصة لمكافحة الخلايا الورمية بشكل أكثر فعالية، على سبيل المثال عن طريق جعل الخلايا أكثر وضوحا للجهاز المناعي أو عن طريق توصيل الجين العلاجي/البروتين بشكل تفضيلي للخلايا الورمية المستهدفة.

من المهم ألا يؤثر التعبير عن الجينات المتحورة تأثيرًا سلبيًا على النسخ أو الخواص المفيدة الأخرى للفيروس. وبالتالي، يجب إدخال الجين أو الجينات في مكان لا يؤثر على كفاءة النسخ والخصائص المفيدة الأخرى للفيروس. بالإضافة إلى ذلك، يتم حزم جينوم الفيروس الدي بإحكام وبالتالي قد يكون من الصعب إيجاد موقع مناسب لإدخال الجينات المتحورة. يحد هذا أيضًا من حجم الجينات المتحورة التي يمكن استيعابها.

يشير الفيروس الغدّي الحال للورم كما هو مستخدم هنا إلى فيروس غدّي يقتل الخلايا السرطانية بشكل تفضيلي مقارنة بالخلايا غير السرطانية. في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الحال للورم مسبب للوفاة المبرمجة. بمعنى أكثر تحديدًا، فإنه يسرع الموت المبرمج للخلية.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الحال للورم حال للخلايا. يمكن تحديد النشاط الحال للخلايا للفيروسات الغدّية وفقًا للكشف في سلالات الخلايا الورمية التمثيلية والبيانات المحولة لقياس الفعالية، على سبيل المثال مع فيروس غدّي ينتمي إلى الفئة الفرعية C، مثل Ad5، المستخدَم كمعيار (أي قوة من 1). إن الطريقة المناسبة لتحديد النشاط الحال للخلايا عبارة عن اختبار MTS (انظر المثال 4، الشكل 2 من البراءة الدولية 2005/118825 المدرجة هنا كمرجع).

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الحال للورم حالًّا للنخر؛ أي أنه يسبب أو يعجل بنخر الخلية أو موت الخلايا المناعي. في أحد التجسيدات، فإن موت الخلية النخروي مفيد لأنه يسبب استجابات مناعية للمريض (المضيف).

ما لم يدل السياق على خلاف ذلك، يشير الفيروس الغدّي المستخدم هنا إلى فيروس قادر على النسخ (مثل فيروس مؤهل للنسخ) وأيضًا نواقل فيروسية تعاني من نقص النسخ.

تشير عبارة القدرة على النسخ طبقًا للاستخدام هنا إلى فيروس مؤهل للنسخ أو فيروس يتوقف النسخ الخاص به على عامل في الخلايا السرطانية، على سبيل المثال عامل منظم، مثل p53 أو ما شابه ذلك.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس مؤهل للنسخ. وتشير عبارة مؤهل للنسخ في سياق الوصف الحالي إلى فيروس يمتلك كل الأجهزة الضرورية للنسخ في الخلايا في المعمل وفي داخل جسم الكائن الحي، أي بدون مساعدة من سلالة خلوية تعبوية. إن الناقل الفيروسي، على سبيل المثال المحذوف في المنطقة E1، القادر على النسخ في سلالة خلوية تعبوية مكملة ليس فيروسًا مؤهلًا للنسخ في السياق الحالي.

تعتبر النواقل الفيروسية ناقصة النسخ وتتطلب خلية تعبوية لتوفير جين تكميلي للسماح بالنسخ.

يشر جينوم الفيروس الغدّي كما هو مستخدم هنا إلى متوالية الحمض النووي التي تشفر البروتينات والعناصر البنيوية ذات الصلة بوظيفة/دورة عمر فيروس غدّي.

إن جميع جينومات الفيروس الغدّية البشرية التي تم فحصها حتى الآن لها نفس التنظيم العام، أي يتم وضع الجينات التي تشفر الوظائف المحددة في نفس المكان في الجينوم الفيروسي (يشار إليه هنا باسم العناصر البنيوية). كل طرف من الجينوم الفيروسي له متوالية قصيرة معروفة كتكرار طرفي معكوس inverted terminal repeat (أو ITR)، وهو مطلوب للنسخ الفيروسي. يحتوي الجينوم الفيروسي على خمس وحدات نسخ مبكرة (E1A وE1B وE2 وE3 وE4) وثلاث وحدات متأخرة (IX وIVa2 وE2 متأخرة) ووحدة متأخرة واحدة (متأخرة رئيسية) تتم معالجتها لتوليد خمس عائلات متأخرة mRNAs (L1-L5). تشارك البروتينات المشفرة بواسطة الجينات المبكرة بشكل رئيسي في نسخ وتعديل استجابة الخلية المضيفة للإصابة بالفيروس، في حين تشفر الجينات المتأخرة البروتينات البنيوية الفيروسية. يسبق الجينات المبكرة الحرف E ويسبق الجينات المتأخرة الحرف L.

يتم تعبئة جينوم الفيروسات الغدّية بإحكام، أي أن هناك القليل من متواليات غير المشفرة، وبالتالي قد يكون من الصعب العثور على موقع مناسب لإدخال الجينات المتحورة.

في أحد التجسيدات، يمكن أن يكون الفيروس الحال للورم أو الحال جزئيًا للورم وفقًا للكشف نتيجة للحذف في منطقة E4 و/أو E3، على سبيل المثال التي تم حذفها في جزء من المنطقة E4 أو تم حذفها بالكامل في المنطقة E3، أو كبديل لذلك تم حذفها في جزء من المنطقة E4 (مثل E4orf4) وتم حذفها بالكامل في المنطقة E3، على سبيل المثال كما هو موضح في المتواليات التي تم الكشف عنها هنا.

في أحد التجسيدات، يكون الفيروس الحال للورم هو EnAd أو مشتق نشط منه الذي يحتفظ بالخصائص الأساسية المفيدة للفيروس. تم الكشف عن EnAd في البراءة الدولية 2005/118825 (المضمنة هنا كمرجع) ويتم توفير المتوالية الكاملة للفيروس هنا بالمتوالية رقم: 28. تم الكشف عن منطقة E2B الخيمرية في هذه الوثيقة على أنها المتوالية رقم: 60.

من المفيد أن يعرض الفيروس الغدّي وفقًا للكشف الحالي نشاط فيروس مشابه، أو على سبيل المثال نسخ و/أو عدوى، لمحات إلى EnAd بعد العدوى الفيروسية لمجموعة متنوعة من سلالات خلايا سرطان القولون المختلفة في المعمل.

العناصر البنيوية للفيروسات الغدّية: بما أن بنية الفيروسات الغدّية تتشابه بشكل عام، فإن العناصر المذكورة أدناه تتم مناقشتها من حيث العناصر البنيوية ومصطلحات التسمية التي تشير إليها المستخدمة بشكل شائع والتي يعرفها المهرة في المجال. عند الإشارة لعنصر ما هنا، فإننا نشير إلى متوالية الحمض النووي المشفرة للعنصر أو متوالية حمض نووي المشفرة لنفس البروتين البنيوي للعنصر في الفيروس الغدّي. وهذا الأخير ذو صلة بسبب تكرار شفرة الحمض النووي. يمكن أن يُراعى تفضيل الفيروس لاستخدام الكودون للحصول على نتائج محسنة.

يمكن أن يشتمل أي عنصر بنيوي من الفيروس الغدّي المستخدَم في فيروسات الكشف الحالي على أو يتكون من متوالية طبيعية أو يمكن أن يتضمن تشابها على طول معين لا يقل عن 95%، على سبيل المثال 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 الشخص الماهر أنه عند إجراء التغييرات، يجب ألا تتعطل إطارات القراءة للفيروس بحيث يتعطل التعبير عن البروتينات البنيوية.

في أحد التجسيدات، يشير العنصر المحدد إلى متوالية كاملة الطول، بمعنى أكثر تحديدًا الجين الكامل الطول.

في أحد التجسيدات، يشير العنصر المحدد إلى متوالية كاملة الطول ويحتفظ بالوظيفة نفسها أو الوظيفة المقابلة لها مثل المتوالية كاملة الطول.

في أحد التجسيدات، بالنسبة لعنصر محدد اختياري في الأجزاء المنشأة الواردة في الكشف الحالي، قد تكون متوالية الحمض النووي DNA أقل من الطول الكامل وليس لها وظيفة.

وترتبط الجينات البنيوية التي تقوم بتشفير البروتينات البنيوية أو الوظيفية للفيروس الغدّي بشكل عام بالمناطق غير المشفرة للحمض النووي. وبالتالي هناك بعض المرونة حول أين يمكن "قطع" المتوالية الجينومية للعنصر البنيوي محل الاهتمام (خاصة المناطق غير المشفرة منه) لغرض إدخال جين متحور في فيروسات الكشف الحالي. وبالتالي، لأغراض هذا الوصف، يُعتبر العنصر عنصرًا بنيويًا إلى المدى الذي يكون فيه مناسبًا للغرض ولا يشفر مواد غريبة. ومن هنا، إذا اقتضى الأمر، سيرتبط الجين بمناطق مناسبة لغير التشفير، على سبيل المثال كما هو موجود في البنية الطبيعية للفيروس.

من هنا، يتم، في أحد التجسيدات، إدخال غرس، على سبيل المثال حمض نووي مشفر لموقع تقييد و/أو جين متحور، في منطقة لغير التشفير من الحمض النووي للفيروس الجينومي، على سبيل المثال إنترون أو متوالية بين الجينات. بعد قول هذا، قد يكون لبعض المناطق غير المشفِّرة للفيروس الغدّي وظيفة، على سبيل المثال في التضفير البديل، تنظيم النسخ أو تنظيم الترجمة الوراثية، وقد يحتاج هذا إلى أن يُؤخذ بعين الاعتبار.

إن المواقع المحددة هنا، المرتبطة بمنطقة L5 (على سبيل المثال بين L5 ومنطقة E4)، مناسبة لاستيعاب مجموعة متنوعة من متواليات الحمض النووي المشفرة لكيانات معقدة على سبيل المثال RNAi، السيتوكينات، البروتينات وحيدة السلسلة أو متعددة الوحدات، على سبيل المثال الأجسام المضادة، على سبيل المثال منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

يشير الجين كما هو مستخدم هنا إلى متواليات مشفِّرة واختياريًا غير مشفِّرة مرتبطة بها، على سبيل المثال إنترونات وإكسونات ذات صلة. في أحد التجسيدات، يشتمل جين أو يتكون من مكونات بنيوية جوهرية فحسب، على سبيل المثال منطقة مشفِّرة.

يتم ادناه تقديم مناقشة تتعلق بعناصر بنيوية محددة للفيروسات الغدّية.

إن متواليات تكرار الطرف المعكوس (ITR) شائعة في جميع الفيروسات الغدّية المعروفة وتم تسميتها على هذا النحو بسبب تشابهها، وهي أصول الكروموسومات الفيروسية للنسخ. هناك خاصية أخرى لهذه المتواليات هي قدرتها على تشكيل بنية دبوسية.

يشير 5'ITR كما هو مستخدم هنا إلى جزء أو كل من ITR من الطرف 5' للفيروس الغدّي، والذي يحتفظ بوظيفة الـ ITR عند دمجه في الفيروس الغدّي في مكان مناسب. في أحد التجسيدات، يشتمل 5'ITR أو يتكون من المتوالية التي تتكون من 1 إلى 138 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28 أو متوالية متطابقة معها بنسبة 90 أو 95 أو 96 أو 97 أو 98 أو 99% على امتداد طولها الكامل، على وجه الخصوص متوالية تتكون من يتكون من 1 إلى 138 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

يشير الرقم 3'ITR حسب استخدامه هنا إلى جزء أو كل من ITR من الطرف 3' للفيروس الغدّي، والذي يحتفظ بوظيفة الـ ITR عند دمجه في الفيروس الغدّي في مكان مناسب. في أحد التجسيدات، يشتمل 3'ITR أو يتكون من المتوالية التي تتكون من حوالي 32189 زوج قاعدة إلى 32326 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28 أو متوالية متطابقة معها بنسبة 90 أو 95 أو 96 أو 97 أو 98 أو 99% على امتداد طولها الكامل، على وجه الخصوص متوالية تتكون من يتكون من 32189 زوج قاعدة إلى 32326 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

يشير B1 كما هو مستخدم هنا إلى متوالية حمض نووي تشفر: جزء أو كل من E1A من فيروس غدّي، جزء أو كل منطقة E1B من فيروس غدّي، وبشكل مستقل جزء أو كل من المنطقة E1A وE1B من فيروس غدّي.

عندما تكون B1 عبارة عن رابطة، سيتم حذف متواليات E1A وE1B من الفيروس. في أحد التجسيدات، تكون B1 عبارة عن رابطة وبالتالي يكون الفيروس عبارة عن ناقل.

في أحد التجسيدات، تشتمل B1 أيضًا على جين متحور. من المعروف في المجال أن منطقة E1 يمكن أن تستوعب جين متحور والتي يمكن إدخالها بطريقة معطلة في المنطقة E1 (أي في "وسط" المتوالية) أو يمكن حذف جزء أو كل من المنطقة E1 لتوفير مساحة أكبر لاستيعاب المواد الجينية.

يشير E1A كما هو مستخدم هنا إلى متوالية حمض نووي تشفر جزء أو كل منطقة E1A للفيروس الغدّي. ويشير الأخير إلى بولي ببتيد/بروتين E1A. قد يتم تطفيره بحيث أن البروتين المشفر بواسطة جين E1A يتضمن تغيرات في الأحماض الأمينية المحافظة أو غير المحافظة، بحيث يكون لديه: نفس وظيفة نوع غير معالج (أي البروتين غير الطافر المقابل)؛ وظيفة أكبر مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج؛ وظيفة أقل، على سبيل المثال وظيفة منعدمة، مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج؛ أو لديه وظيفة جديدة مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج أو توليفة منها كما هو مناسب.

يشير E1B كما هو مستخدم هنا إلى متوالية حمض نووي تشفر جزء أو كل منطقة E1B للفيروس الغدّي (بمعنى بولي ببتيد أو بروتين)، وقد يتم تطفيره بحيث أن البروتين المشفر بواسطة جين/منطقة E1B يتضمن تغيرات في الأحماض الأمينية المحافظة أو غير المحافظة، بحيث يكون لديه: نفس وظيفة نوع غير معالج (أي البروتين غير الطافر المقابل)؛ وظيفة أكبر مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج؛ وظيفة أقل، على سبيل المثال وظيفة منعدمة، مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج؛ أو لديه وظيفة جديدة مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج أو توليفة منها كما هو مناسب.

من هنا، يمكن تعديل B1 أو تعديله بالنسبة إلى منطقة E1 من النوع غير المعالج، على سبيل المثال E1A و/أو E1B من النوع غير المعالج. يمكن للشخص الماهر أن يحدد بسهولة ما إذا كانت E1A و/أو E1B موجودة أو (جزئيًا) محذوفة أو طافرة.

يشير النوع غير المعالج كما هو مستخدم هنا إلى فيروس معروف غدّي معروف. يتمثل أحد الفيروسات المعروفة في فيروس تم تحديده وتسميته، بغض النظر عما إذا كانت المتوالية متوفرة.

في أحد التجسيدات، تتضمن B1 المتوالية التي تتكون من 139 زوج قاعدة إلى 3932 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

يشير مصطلح BA المستخدم هنا إلى متوالية DNA التي تشفر مناطق E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 بما في ذلك أي متواليات غير مشفِّرة، حسب الحاجة. بشكل عام، لن تشتمل هذه المتوالية على جين متحور. في أحد التجسيدات، تتشابه المتوالية أو تتشابه إلى حد كبير مع متوالية مجاورة من فيروس غدّي معروف، على سبيل المثال النوع المصلي الموضح في الجدول 1، وعلى وجه الخصوص فيروس بالمجموعة ب، على سبيل المثال Ad3، Ad7، Ad11، Ad14، Ad16 أو Ad21 أو Ad34 أو Ad35 أو Ad51 أو توليفة من ذلك، على سبيل المثال Ad3 أو Ad11 أو توليفة من ذلك. في أحد التجسيدات، يشير E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 إلى هذه العناصر والعناصر البنيوية الأخرى المرتبطة بالمنطقة، على سبيل المثال، يتضمن BA بشكل عام متوالية تشفر البروتين IV2a، على سبيل المثال كما يلي: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4

في أحد التجسيدات، تعتبر منطقة E2B خيمرية. بمعنى أكثر تحديدا، تشتمل على متواليات حمض نووي من اثنين أو أكثر من الأنماط المصلية المختلفة للفيروس الغدّي، على سبيل المثال من Ad3 و Ad11، على سبيل المثال Ad11p. في أحد التجسيدات، تتضمن المنطقة E2B متوالية تتكون من 5068 زوج قاعدة إلى 10355 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28 أو متوالية متطابقة معها بنسبة تبلغ 95%، 96%، 97%، 98% أو 99% على كامل طولها.

في أحد التجسيدات يتضمن العنصر E2B في مكون BA المتواليات المبينة في المتوالية رقم: 60 (والتي تقابل المتوالية رقم: 3 المبين في WO2005/118825).

في أحد التجسيدات، يتضمن BA المتوالية التي تتكون من 3933 زوج قاعدة إلى 27184 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

يشير E3 كما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفر جزء أو كل من منطقة فيروس غدّي E3 (أي بروتين/بولي ببتيد)، ويمكن تطفيره بحيث أن البروتين المشفَّر بالجين E3 له تغيرات حمضية أمينية محافظة أو غير محافظة، بحيث يكون له نفس وظيفة النوع غير المعالج (البروتين غير

الطافر المقابل)؛ له وظيفة أكبر مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج؛ له وظيفة أقل، على سبيل المثال انعدامها، مقارنة بالبروتين من النوع غير المعالج أو له وظيفة جديدة مقارنة بالبروتين من النوع غير المعالج أو توليفة منها، حسب الحاجة.

في أحد التجسيدات، تُشكل المنطقة E3 نوعًا مصليًا لفيروس غدّي مبينًا في الجدول 1 أو توليفة منه، على وجه الخصوص نوع مصلي بالمجموعة B، على سبيل المثال Ad3، Ad7، Ad11 (على وجه الخصوص Ad11p)، Ad14، Ad16، Ad21، Ad34، Ad35، Ad51 أو توليفة منها، على سبيل المثال Ad3، Ad11 (على وجه الخصوص Ad11p) أو توليفة من ذلك.

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

في أحد التجسيدات، تكون B2 عبارة عن رابطة، حيث يغيب الحمض النووي المشفر لمنطقة E3.

في أحد التجسيدات، يمكن استبدال الحمض النووي المشفر لمنطقة E3 أو مقاطعته بواسطة جين متحور. كما هو مستخدم هنا، يشتمل التعبير "منطقة E3 بها استبدال بجين متحور كما هو مستخدم هنا" على جزء أو كل من المنطقة E3 المستبدَلة بجين متحور.

في أحد التجسيدات، تشتمل المنطقة B2 على المتوالية المكونة من 27185 زوج قاعدة إلى 28165 زوج قاعدة تعريف المتوالية: 28.

في أحد التجسيدات، تشتمل المنطقة B2 على المتوالية المكونة من 27185 زوج قاعدة إلى 28165 زوج قاعدة تعريف المتوالية: 28.

يشير BX كما هو مستخدم هنا إلى متوالية حمض نووي في المنطقة المجاورة للطرف 5’ للجين L5 في BB. التعبير "في المنطقة المجاورة أو القريبة من الطرف 5’ للجين L5 كما هو مستخدم هنا" يشير إلى: بجوار الطرف 5’ للجين L5 أو منطقة غير مشفِّرة مرتبطة بطبيعتها، أي متاخمة أو مجاورة لطرف البدء 5’ للجين L5 أو منطقة غير مشفرة مرتبطة بها بطبيعتها. كبديل لذلك،

يمكن أن يشير التعبير "في المنطقة المجاورة أو القريبة" إلى القرب من الجين L5، بحيث لا توجد متواليات غير مشفِّرة بين منطقة BX والطرف 5' للجين L5.

من هنا، في أحد التجسيدات، يرتبط BX مباشرة بقاعدة L5 تمثل، على سبيل المثال، بداية متوالية تشفير للجين L5.

من هنا، في أحد التجسيدات، يرتبط BX مباشرة بقاعدة L5 تمثل، على سبيل المثال، بداية متوالية غير مشفِّرة أو مرتبطة مباشرة بمنطقة غير مشفِّرة ترتبط بشكل طبيعي بـ L5. يشير مصطلح منطقة غير مشفِّرة مرتبطة بشكل طبيعي بـ L5 على النحو المستخدم هنا إلى جزء من جميع المناطق غير المشفِّرة التي تعد جزءًا من الجين L5 أو مجاورة له ولكنها ليست جزءًا من جين آخر.

في أحد التجسيدات، تشتمل BX على المتوالية رقم: 29. هذه المتوالية عبارة عن متوالية اصطناعية غير مشفِّرة، حيث يمكن أن يتم بها إدخال متوالية حمض نووي تشتمل على جين متحور (أو طقم جينات متحورة)، موقع تقييد أو توليفة منها. هذه المتوالية مفيدة لأنها تحمل كعامل منظم يسمح ببعض المرونة في الموقع الدقيق للجين المتحور مع تقليل التأثيرات المعطّلة على ثبات الفيروس وقابليته للبقاء حيًّا.

يمكن أن يحدث الإدخال (الإدخالات) في أي مكان داخل المتوالية رقم: 29 من الطرف 5'، الطرف 3' أو أي نقطة بين 1 إلى 201 زوج قاعدة. في أحد التجسيدات، تشتمل BX على المتوالية رقم: 29 مع متوالية حمض نووي يتم إدخالها بين زوج قاعدة 27 وزوج قاعدة 28 أو مكان مقابل بين الموضعين 28192 زوج قاعدة و28193 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

في أحد التجسيدات، يكون الغرس عبارة عن غرس بموقع تقييد. في أحد التجسيدات، يشتمل غرس موقع التقييد على موقع أو موقعين للتقييد. في أحد التجسيدات، يُعد موقع التقييد عبارة عن غرس بموقع تقييد لزوج القاعدة 19 يشتمل على موقعين للتقييد. في أحد التجسيدات، يُعد موقع التقييد عبارة عن غرس بموقع تقييد لزوج القاعدة 9 يتضمن موقعًا واحدًا للتقييد. في أحد التجسيدات، يشتمل غرس موقع التقييد على موقع أو موقعين للتقييد وجين متحور واحد على الأقل، على سبيل المثال واحد أو اثنين من الجينات المتحورة. في أحد التجسيدات، يكون غرس موقع التقييد عبارة

عن غرس بموقع تقييد لزوج القاعدة 19 يتضمن موقعين للتقييد وجين متحور واحد على الأقل، على سبيل المثال واحد أو اثنين من الجينات المتحورة. في أحد التجسيدات، يكون غرس موقع التقييد عبارة عن غرس بموقع تقييد لزوج القاعدة 9 يتضمن موقعًا واحدًا للتقييد وجين متحور واحد على الأقل، مثل 1 أو 2 أو 3 جينات متحورة، مثل 1 أو 2 من الجينات المتحورة. في أحد التجسيدات، يقحم موقعي تقييد واحدا أو اثنين، على سبيل المثال اثنين، من الجينات المتحورة (على سبيل المثال في طقم جينات متحورة). في أحد التجسيدات، عندما تشتمل BX على موقعي تقييد، فإنهما يختلفان عن بعضهما البعض. في أحد التجسيدات، فإن الواحد أو الاثنين من مواقع التقييد المذكورة في BX لا تحدث بشكل طبيعي في جينوم الفيروس الغدّي الذي تم إدخالها فيه. في أحد التجسيدات، فإن الواحد أو الاثنين من مواقع التقييد المذكورة في BX تختلف عن مواقع التقييد الأخرى الموجودة في مكان آخر في جينوم الفيروس الغدّي، على سبيل المثال تختلف عن مواقع التقييد الطبيعية و/أو مواقع التقييد التي تدخل في أجزاء أخرى من الجينوم، على سبيل المثال موقع تقييد تم إدخاله في BY. ومن هنا، في أحد التجسيدات، يسمح موقع التقييد أو تسمح مواقع التقييد بتقطيع الحمض النووي في المقطع بشكل محدد.

تشير متوالية الحمض النووي فيما يتعلق بـ BY كما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA في المنطقة المجاورة الطرف 3' للجين L5 من BB. التعبير "في المنطقة المجاورة أو القريبة من الطرف 3' للجين L5 كما هو مستخدم هنا" يشير إلى: بجوار الطرف 3' للجين L5 أو منطقة غير مشفِّرة مرتبطة بطبيعتها، أي متاخمة أو مجاورة لطرف البدء 3' للجين L5 أو منطقة غير مشفرة مرتبطة بها بطبيعتها. كبديل لذلك، يمكن أن يشير التعبير "في المنطقة المجاورة أو القريبة" إلى القرب من الجين L5، بحيث لا توجد متواليات غير مشفِّرة بين منطقة BY والطرف 3' للجين L5.

من هنا، في أحد التجسيدات، يتم ربط BY مباشرة بقاعدة L5 تمثل "طرف" متوالية مشفِّرة.

من هنا، في أحد التجسيدات، يتم ربط BY مباشرة بقاعدة L5 تمثل " طرف " متوالية غير مشفِّرة، أو يرتبط مباشرة بمنطقة غير مشفِّرة مرتبطة بشكل طبيعي بـ L5.

يتم استخدام التعبيرين بشكل متأصل وبشكل طبيعي بالتبادل هنا. في أحد التجسيدات، تشتمل BY على المتوالية رقم: 30. هذه المتوالية عبارة عن متوالية غير مشفِّرة، حيث يمكن أن يتم بها إدخال

متوالية حمض نووي تشتمل على جين متحور (أو طقم جينات متحورة)، موقع تقييد أو توليفة منها. هذه المتوالية مفيدة لأنها تحمل كعامل منظم يسمح ببعض المرونة في الموقع الدقيق للجين المتحور مع تقليل التأثيرات المعطّلة على ثبات الفيروس وقابليته للبقاء حيًّا.

يمكن أن يحدث الإدخال (الإدخالات) في أي مكان داخل المتوالية رقم: 30 من الطرف 5'، الطرف 3' أو أي نقطة بين 1 إلى 35 زوج قاعدة، 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 أو 30/29 أو 31/30 أو 32/31 أو 33/32 أو 34/33 أو 35/34.

يشير E4 كما هو مستخدم هنا إلى متوالية DNA تشفر جزء أو كل من منطقة فيروس غدّي E4 (أي بروتين/بولي ببتيد)، ويمكن تطفيره بحيث أن البروتين المشفَّر بالجين E4 له تغيرات حمضية أمينية محافظة أو غير محافظة، بحيث يكون له نفس وظيفة النوع غير المعالج (البروتين غير الطافر المقابل)؛ له وظيفة أكبر مقارنةً بالبروتين من النوع غير المعالج؛ له وظيفة أقل، على سبيل المثال انعدامها، مقارنة بالبروتين من النوع غير المعالج أو له وظيفة جديدة مقارنة بالبروتين من النوع غير المعالج أو توليفة منها، حسب الحاجة. في أحد التجسيدات، تتضمن منطقة E4 حذف E4orf4.

في أحد التجسيدات، يتم حذف المنطقة E4 جزئيًا، على سبيل المثال يتم حذف 95%، 90%، 85%، 80%، 75%، 70%، 65%، 60%، 55%، 50%، 45%، 40%، 35%، 30%، 25%، 20%، 15%، 10% أو 5%. في أحد التجسيدات، تتضمن المنطقة E4 المتوالية من 32188 زوج قاعدة إلى 29380 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

في أحد التجسيدات، تكون B3 عبارة عن رابطة، بمعنى أكثر تحديدًا حيث تكون E4 غائبة.

في أحد التجسيدات، B3 تتضمن متوالية تتكون من 32188 زوج قاعدة إلى 29380 زوج قاعدة للمتوالية رقم: 28.

طبقًا لما هو مستخدم هنا، فإن النطاقات الرقمية تتضمن نقاط النهاية.

سيقدر الشخص الماهر أن العناصر الواردة في الصيغ الواردة هنا، على سبيل المثال الصيغة (I) متجاورة ويمكن أن تجسد متواليات DNA غير مشفرّةٍ وكذلك جينات ومتواليات حمض DNA مشفّرة (السمات البنيوية) المذكورة هنا. في تجسيد واحد أو أكثر، تحاول صيغ الكشف الحالي وصف متوالية طبيعية تحدث في جينوم الفيروس الغدّي. في هذا السياق، سيكون من الواضح للشخص الماهر أن الصيغة تشير إلى العناصر الرئيسية التي تميز المقطع ذي الصلة من الجينوم ولا يُقصد بها أن تشكّل وصفًا شاملًا للتمديد الجينومي للحمض النووي.

تشير كل من E1A وE1B وE3 وE4، كما هو مستخدم هنا، بشكل مستقل إلى النوع غير المعالج وما يكافئه، أو الأشكال المتحولة أو المحذوفة جزئيًا لكل منطقة كما هو موصوف هنا، خاصة متوالية من النوع غير المعالج من فيروس غدّي معروف.

يشير "غرس" على النحو المستخدم هنا إلى متوالية حمض نووي تم إدخالها إما عند الطفر 5' أو الطرف 3' أو داخل مقطع مرجعي لمتوالية حمض نووي معينة بحيث يتقاطع مع المتوالية المرجعية. والمتوالية المرجعية عبارة عن متوالية مرجعية تعمل كنقطة مرجعية بالنسبة لموضع الغرس. في سياق الكشف الحالي، تحدث أنواع الغرس عادةً داخل المتوالية رقم: 29 أو المتوالية رقم: 30. يمكن أن يكون الغرس عبارة عن غرس موقع تقييد، أو طقم جينات متحورة أو كليهما. عندما يتم مقاطعة المتوالية فإن الفيروس سيظل يشتمل على المتوالية الأصلية، ولكنه سيكون بشكل عام على هيئة شظيتين تحيطان بالغرس.

في أحد التجسيدات، لا يشتمل الجين المتحور أو طقم الجينات المتحورة على عنصر ناقل غرسي غير منحاز، على سبيل المثال عنصر ناقل TN7 أو جزء منه. يشير عنصر ناقل Tn7 كما هو مستخدم هنا إلى عنصر ناقل غرسي غير منحاز كما هو موضح في WO2006/060314.

في أحد التجسيدات، يتم اختيار واحد أو أكثر من المواقع المقيدة في BX وBY بشكل مستقل من موقع تقييد معين خاص بإنزيم موصوف هنا، على سبيل المثال NotI، FseI، AsiSI، SgfI وSbfI، وعلى وجه الخصوص فإن مواقع التقييد المدرجة كلها مختلفة، على مواقع سبيل المثال المواقع الخاصة بـ NotI والمواقع الخاصة بـ FseI الموجود في BX وSgfI وSbfI الموجود في BY.

كما نوقش أعلاه في أحد التجسيدات، لا تشتمل المنطقة BX و/أو BY على موقع تقييد. من المفيد أنه يمكن إعداد الفيروسات والأجزاء المنشأة وفقًا للكشف الحالي دون مواقع تقييد، على سبيل المثال باستخدام تقنيات تخليقية. تسمح هذه التقنيات بمرونة كبيرة في إنشاء الفيروسات والأجزاء المنشأة. علاوة على ذلك، أثبت المخترعون الحاليون أن خصائص الفيروسات والأجزاء المنشأة لا تقل عند إعدادها بواسطة تقنيات تخليقية.

المتواليات التنظيمية الأخرى: يشير مصطلح "منظم تعبير جيني" (أو عنصر منظم/تنظيمي) كما هو مستخدم هنا إلى خاصية وراثية، على سبيل المثال، معزز، محسن أو متوالية مستقبل جديلة تلعب دورًا في التعبير الجيني، عادة عن طريق بدء أو تحسين النسخ أو الترجمة الوراثية.

"يشير مصطلح "متوالية مستقبل التضفير"، "مستقبل التضفير" أو "موضع التضفير" كما هو مستخدم هنا يشير إلى متوالية تنظيمية تحدد متى سيتم التعرف على جزيء mRNA بواسطة بروتينات نووية صغيرة لمعقد جسم التضفير. وبمجرد تجميعها، يقوم جسم التضفير بتحفيز التضفير بين موقع مستقبل التضفير لجزيء mRNA وموقع مانح تضفير قبلي ينتج جزيء mRNA ناضج يمكن ترجمته وراثيًا لإنتاج بولي ببتيد أو بروتين واحد.

يمكن استخدام متواليات مستقبل التضفير بحجم معين مختلفة في الاختراع الحالي ويمكن وصفها بأنها مستقبل تضفير قصير (صغير)، مستقبل تضفير (متوسط) ومستقبل تضفير متفرع (كبير).

إن الاختصار SSA كما هو مستخدم هنا يعني مستقبِل تضفير قصير، والذي يشتمل عادةً على موقع التضفير فقط، 4 أزواج قاعدة سبيل المثال. ويشير الاختصار SA كما هو مستخدم هنا إلى مستقبِل تضفير، والذي يشتمل عادةً على مستقبِل التضفير القصير ومسار البولي بيريميدين، على سبيل المثال 16 زوج قاعدة. ويشير الاختصار bSA كما هو مستخدم هنا إلى مستقبل تضفير متفرع، والذي يتكون عادة من مستقبِل التضفير القصير، ومسار البولي بيريميدين ونقطة التفرع، على سبيل المثال 26 زوج قاعدة.

في أحد التجسيدات، يتم عرض مستقبل التضفير SA و bSA المستخدم في الأجزاء المنشأة الواردة في الكشف الحالي في المتوالية رقم: 45 إلى 46 على التوالي. في أحد التجسيدات، يتم استخدام SSA في طقم يتضمن الكشف الحالي ويتضمن متوالية CAGG.

في أحد التجسيدات، يتم استخدام SA في الطقم. في أحد التجسيدات، يتم استخدام وbSA في الطقم.

في أحد التجسيدات، يتم استمرار موقع التضفير مباشرةً (بمعنى أكثر تحديدًا يُتبَع في الاتجاه 5' إلى 3') بمتوالية كوزاك التوافقية. في موقع التجسيدات، يتم فصل موقع التضفير ومتوالية كوزاك بما يصل إلى 100 زوج أو أقل. في أحد التجسيدات، تتضمن متوالية كوزاك متوالية النوكليوتيد لرقم تعريف المتوالية: 47.

عادة، عندما تكون المتوالية المشفِّرة تحت سيطرة معزز داخلي أو معزز خارجي (على سبيل المثال معزز داخلي)، فإنها تُسبق مباشرة بمتوالية كوزاك. يُشار إلى بداية منطقة التشفير بكودون البدء (AUG)، على سبيل المثال في سياق المتوالية gccRccAUGg(gcc) [المتوالية رقم: 48]. ويدل على بدء "بداية" المتوالية المشفِّرة القواعد المكتوبة بخط غليظ. يشير الحرف الصغير إلى القواعد المشتركة في هذا الموضع (والتي يمكن أن تتنوع برغم ذلك)، وتشير الأحرف الكبيرة إلى قواعد محافظة بدرجة عالية، بمعنى أكثر تحديدًا تكون المتوالية "AUGG" ثابتة أو نادرًا ما تتغير، إن حدث ذلك؛ وتشير "R" إلى أنه يتم ملاحظة بورين (أدِنين أو جوانين) عادةً في هذا الموضع وأن المتوالية بين قوسين (gcc) ذات أهمية غير مؤكدة. من هنا، في أحد التجسيدات، يتم تضمين كود البدء AUG في متوالية كوزاك.

يشير مصطلح متوالية حمض نووي لدخول ريبوسوم داخلي كما هو مستخدم هنا إلى متوالية حمض نووي تشفر متوالية دخول ريبوسوم داخلي Internal Ribosome Entry Sequence (IRES). ويشير IRES كما هو مستخدم هنا إلى متوالية نوكليوتيد تسمح ببدء ترجمة متوالية RNA (mRNA)، بما في ذلك البدء في داخل متوالية mRNA. هذا مفيد بشكل خاص عندما يقوم الطقم بتشفير mrNA متعدد السيسترونات. باستخدام نتائج IRES في mRNA متعدد السيسترونات الذي يتم ترجمته وراثيًا إلى بروتينات أو ببتيدات فردية متعددة. في أحد التجسيدات، تتضمن متوالية الحمض النووي لدول الريبوسوم الداخلي متوالية النوكليوتيد للمتوالية رقم: 49. في أحد التجسيدات، يتم استخدام IRES محدد لمرة واحدة في الجينوم. يمكن أن يتضمن ذلك فوائد بالنسبة لثبات الجينوم.

يشير مصطلح "ببتيد 2A ذو كفاءة شطر ذاتي عالية" أو "ببتيد 2A" طبقًا لاستخدامه هنا إلى ببتيد يتم شطره بكفاءة عقب الترجمة الوراثية. تتضمن ببتيدات 2A مناسبة P2A، F2A، E2A وT2A. لاحظ المخترعون الحاليون أنه بمجرد أن يتم استخدام متوالية حمض نووي محددة تشفر ببتيد 2A معين، فربما لا يتم استخدام نفس متوالية الحمض النووي المعينة نفسها مرة ثانية. ومع ذلك، فإن التكرار في شفرة الحمض النووي يمكن استخدامها لتوليد متوالية الحمض النووي التي يتم ترجمتها وراثيًا إلى نفس الببتيد 2A. إن استخدام ببتيدات 2A مفيد بشكل خاص عندما يشفر الطقم mRNA متعددة السيسترونات. يؤدي استخدام ببتيدات 2A إلى سلسلة بولي ببتيد مفردة يتم ترجمتها وراثيًا حيث يتم تعديلها بعد الترجمة الوراثية لتوليد بروتينات أو ببتيدات فردية.

في أحد التجسيدات، يحتوي الببتيد المشفَّر P2A المستخدم على متوالية الأحماض الأمينية للمتوالية رقم: 50. في أحد التجسيدات، يحتوي الببتيد المشفَّر F2A المستخدم على متوالية الأحماض الأمينية للمتوالية رقم: 51. في أحد التجسيدات، يحتوي الببتيد المشفَّر E2A المستخدم على متوالية الأحماض الأمينية للمتوالية رقم: 52. في أحد التجسيدات، يحتوي الببتيد المشفَّر T2A المستخدم على متوالية الأحماض الأمينية للمتوالية رقم: 53.

في أحد التجسيدات، يشتمل mRNA أو كل mRNA مشفر بواسطة جين (جينات) متحورة على متوالية إشارة تذييل بعديد أدينيلات، على سبيل المثال عادة في نهاية متوالية mRNA، على سبيل المثال كما هو موضح في المتوالية رقم: 54. من هنا، يشتمل الجين المتحور أو طقم الجينات المتحورة على متوالية واحدة على الأقل تشفر متوالية إشارة تذييل بعديد أدينيلات.

إن مصطلح "بولي A"، "إشارة تذييل بعديد أدينيلات" أو "متوالية تذييل بعديد أدينيلات" كما هو مستخدم هنا يشير إلى متوالية حمض نووي، عادةً ما تحتوي على موقع AATAAA، الذي يمكن التعرف عليه بمجرد نسخه بواسطة معقد عديد البروتينات الذي يشطر ويعزز تذييل بعديد أدينيلات لجزيء mRNA حديث التكوين.

في أحد التجسيدات، تتضمن متوالية تذييل بعديد أدينيلات متوالية النوكليوتيد للمتوالية رقم: 54.

في أحد التجسيدات، لا يتضمن الجزأ المنشأ متوالية تذييل بعديد أدينيلات. في أحد التجسيدات، يكون منظم التعبير الجيني عبارة عن متوالية مستقبل جديلة.

من المفيد أن تعبر الفيروسات الغذّية للكشف الحالي عن أشكال الأجسام المضادة (على سبيل المثال منشط خلايا تائية ثنائية النوعية) والبروتينات الأخرى وتطلقها، على سبيل المثال السيتوكينات، المشفرة بواسطة جين متحور فيها في مادة طافية لمستنبت في المعمل أو في سدى الأنسجة الورمية في داخل جسم الكائن الحي. يمكن أن تساعد المتواليات القيادية البروتينات/البولي ببتيدات أو الببتيدات المشفَّرة التي تخرج من الخلية السرطانية. لذلك، في أحد التجسيدات، يشتمل "البروتين" المشفَّر على متوالية قيادية. وتشير المتوالية القيادية المستخدَمة هنا كما هو مستخدم هنا إلى متوالية بولي نوكليوتيد تقع بين متوالية معززة ومنطقة تشفير يمكن أن تنظم التعبير الجيني على مستوى النسخ أو الترجمة.

في أحد التجسيدات، يشتمل الفيروس الغدي وفقًا للكشف الحالي على جين متحور والذي يكون عبارة عن جين مرشد يشفر، على سبيل المثال، عامل تصوير يتضمن مادة متألقة حيوية، عوامل تصوير فلوري (بما في ذلك عوامل تصوير فلوري قابلة للتنشيط)، على سبيل المثال لوسيفيراز، GFP أو EGFP أو بروتين فلوري أحمر.

يشير مصطلح الجين المرشد أو المتوالية المرشدة كما هو مستخدم هنا إلى جين أو متوالية DNA تنتج منتجًا يسهل التعرف عليه في الخلايا حقيقية النواة ويمكن استخدامها كعلامة لتحديد نشاط جين آخر يرتبط ارتباطًا وثيقًا بحمضه النووي. تضفي الجينات المرشدة خصائص على الخلايا أو الكائنات الحية التي تعبر عنها والتي يمكن تحديدها وقياسها بسهولة، أو علامات قابلة للاختيار. وكثيرًا ما تُستخدم الجينات المرشدة كمؤشر على ما إذا كان قد تم امتصاصها أو التعبير عنها في الخلية أو الكائن الحي. تتضمن الأمثلة على الجينات المرشدة المشتركة، على سبيل المثال لا الحصر، LacZ، luciferase، GFP، eGFP، نيومايسين فسفوتانفرايز، كلورامفينيكول أسيتيلترانسفيراز، ناقل يوديد الصوديوم (NIS)، نيتروريدوكتاز (على سبيل المثال NfsA، NfsB) مركبات ميتالينية داخل الخلايا، HSV1-tk أو مستقبلات هرمون الاستروجين.

في أحد التجسيدات، لا تقوم المادة الجينية (بشكل محدد الجين المتحور) بتشفير أو التعبير عن جين مرشد مثل عامل تصوير أو لوسيفيراز أو GFP أو eGFP.

يمكن التحقق من فيروسات الكشف الحالي كشفا عن تفضيلها لنوع ورم معين عن طريق فحص إمكاناتها الحالّة في مجموعة من الخلايا السرطانية، على سبيل المثال فإن سلالات الخلايا الورمية في القولون تشمل HT-29، DLD-1، LS174T، LS1034، SW403، HCT116 و SW48 و Colo320DM. وأي سلالات خلايا ورم في القولون متاحة ستكون مفيدة بنفس القدر لمثل هذا التقييم.

تتضمن سلالات الخلايا البروستاتية خلايا DU145 و PC-3. تتضمن سلالات الخلايا البنكرياسية خلايا Panc-1. تتضمن سلالات خلايا الورم الثديي سلالة خلية MDA231 وتشمل سلالات الخلايا المبيضية سلالة الخلية OVCAR-3. تتضمن سلالات الخلايا المكونة للدم، على سبيل المثال لا الحصر، الخلايا اللمفاوية البائية Raji و Daudi، والخلايا الأرومية الحمراء K562، والخلايا النخاعية U937، والخلايا اللمفاوية التائية HSB2. إن سلالات الخلايا السرطانية الأخرى المتاحة مفيدة على حد سواء.

كما يمتد الكشف الحالي إلى المتواليات الجديدة التي يتم الكشف عنها هنا. في أحد التجسيدات، يتم إظهار الفيروس في أي من المتواليات التي تم الكشف عنها هنا.

الصيغ: يمتد الكشف الحالي أيضًا ليغطي صيغة صيدلية لفيروس كما هو موصوف هنا.

في أحد التجسيدات، يتم تقديم صيغة حقن سائل، على سبيل المثال للتسريب أو الحقن، قادرة على حلّ الورم وفقًا للكشف الحالي حيث توفر الصيغة جرعة في نطاق 1×1010 إلى 1×1410 من الجسيمات الفيروسية لكل حجم من الجرعة.

إن صيغة الحقن عبارة عن صيغة مصممة بحيث لا يتم توصيلها عبر الجهاز الهضمي. تتضمن طرق التوصيل بغير الجهاز الهضمي النموذجية : الحقن، الغرس أو التسريب. في أحد التجسيدات، يتم توفير صيغة في شكل توصيل البلعة.

في أحد التجسيدات، تكون الصيغة بالحقن في شكل حقنة. يتضمن الحقن: الحقن الوريدي أو تحت الجلد أو داخل الأوعية أو الحقن العضلي. ويشير مصطلح الحقن كما هو مستخدم هنا إلى إدخال سائل إلى الجسم عن طريق حقنة. في أحد التجسيدات، لا تنطوي طريقة الكشف الحالي على الحقن داخل الأورام.

في أحد التجسيدات، تكون الصيغة للحقن بغير طريق الجهاز الهضمي في صورة حقن بالتسريب.

ويشير مصطلح التسريب كما هو مستخدم هنا إلى إعطاء السوائل بمعدل أبطأ بواسطة التنقيط، مضخة تسريب، محرك محاقن أو جهاز مكافئ. في أحد التجسيدات، يتم إعطاء التسريب خلال فترة تتراوح من 1.5 دقيقة إلى 120 دقيقة، على سبيل المثال حوالي 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14 15، 16 أو 17 أو 18 أو 19 20 أو 25 أو 30 أو 35 أو 40 أو 45 أو 50 أو 55 أو 60 أو 65 أو 70 أو 65 أو 80 أو 85 أو 90 أو 95 أو 100 أو 105 أو 110 أو 115 دقيقة.

في أحد التجسيدات، تكون جرعة واحدة من الصيغة أقل من 100 ملليلتر، على سبيل المثال 30 ملليلتر، على سبيل المثال تُعطى بواسطة مشغل محقنة. في أحد التجسيدات، تكون جرعة واحدة من الصيغة أقل من 10 ملليلتر، على سبيل المثال 9، 8، 7، 6، 5، 4، 3، 2 أو 1 ملليلتر. في أحد التجسيدات، تكون جرعة واحدة من الصيغة أقل من 1 ملليلتر، على سبيل المثال 0.9، 0.8، 0.7، 0.6، 0.5، 0.4، 0.3، 0.2 أو 0.1 ملليلتر.

في أحد التجسيدات، يتم إعطاء الحقنة على شكل حقن بطيئة، على سبيل المثال خلال فترة من 1.5 إلى 30 دقيقة.

في أحد التجسيدات، تكون الصيغة للإعطاء الوريدي (i.v.). هذا الطريقة فعالة بشكل خاص لتوصيل فيروس حالّ للورم لأنه يسمح بالوصول السريع إلى غالبية الأعضاء والأنسجة وهذا مفيد بشكل خاص لعلاج النقائل، على سبيل المثال النقائل المؤكدة خصوصًا تلك الواقعة في مناطق عالية الأوعية الدموية على سبيل المثال الكبد والرئتين.

تكون المستحضرات العلاجية عادة معقمة ومستقرة في ظروف التصنيع والتخزين. يمكن صياغة التركيبة كمحلول، أو مستحلب دقيق، أو ليبوسوم liposome ، أو صيغة أخرى للحقن مناسبة للإعطاء إلى إنسان ويمكن أن تصاغ كجهاز مملوء مسبقًا على سبيل المثال حقنة أو قارورة، خاصة كجرعة وحيدة.

وتشمل الصيغة عمومًا مادة مخففة أو حاملة مقبولة صيدليًا، على سبيل المثال حامل غير سام متساوي التوتر متوافق مع الفيروس، ويكون فيه الفيروس مستقرًا لفترة زمنية كافية.

يمكن أن تكون المادة الحاملة عبارة عن مذيب أو وسط تشتت يحتوي على سبيل المثال على ماء، إيثانول ethanol ، بوليول polyol (على سبيل المثال، جليسيرول glycerol ، بروبيلين جليكول propylene glycol ، بولي إيثيلين جليكول سائل liquid polyethylene glycol ، وما شابه)، وخلائط مناسبة منه. يمكن الحفاظ على السيولة المناسبة، على سبيل المثال، عن طريق استخدام مادة مشتتة أو خافضة للتوتر السطحي على سبيل المثال الليسيثين lecithin أو مادة خافضة للتوتر السطحي غير أيونية على سبيل المثال بولي سوربات polysorbate 80 أو 40. في حالات المشتتات، يمكن المساعدة في الحفاظ على حجم الجسيم المطلوب من خلال وجود مادة خافضة للتوتر السطحي. وتشتمل أمثلة للعوامل متساوية التوتر على السكريات، أو كحولات متعددة على سبيل المثال المانيتول mannitol ، أو السوربيتول sorbitol ، أو كلوريد الصوديوم sodium chloride في التركيبة.

في أحد التجسيدات، يمكن أن تشتمل الصيغ الوعائية للحقن على واحد أو أكثر من عوامل التنظيم التالية، على سبيل المثال حمض 4- (2-هيدروكسي إيثيل) -1-بيبرازين إيثان سلفونيك -2)-4 hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid ، وعامل تنظيم فوسفات phosphate buffer و/أو عامل تنظيم Tris، سكر على سبيل المثال ديكستروز dextrose ، مانوز mannose ، سكروز sucrose أو ما شابه، ملح على سبيل المثال كلوريد الصوديوم sodium chloride ، كلوريد المجنيسيوم magnesium chloride أو كلوريد البوتاسيوم potassium chloride ، مطهر على سبيل المثال مادة خافضة للتوتر السطحي غير أيونية على سبيل المثال briji، PS-80، PS-40 أو ما شابه ذلك. وقد تشتمل الصيغة أيضًا على مادة حافظة على سبيل المثال EDTA أو إيثانول ethanol أو توليفة من EDTA والإيثانول، والتي يُعتقد أنها تمنع مسارًا واحدًا أو أكثر من التحلل المحتمل.

في أحد التجسيدات، تشتمل الصيغة على فيروس منقى حالّ للأورام، على سبيل المثال، 1×1010 إلى 1×1410 جسيمات فيروسية لكل جرعة، على سبيل المثال 1×1010 إلى 1×1210 جسيمات فيروسية لكل جرعة. في أحد التجسيدات، يتراوح تركيز الفيروس في الصيغة من 2 × 810 إلى 2 × 1410 جسيم فيروسي/ملليلتر، على سبيل المثال 2 × 10 12 جسيم فيروسي/ملليلتر.

في أحد التجسيدات، تشتمل الصيغة للحقن على جليسيرول glycerol.

في أحد التجسيدات، تشتمل الصيغة على الفيروس الغدّي الحالّ للأورام كما هو موصوف هنا، HEPES (حمض N-2-هيدروكسي إيثيل بيبرازين -N´-2-إيثان سلفونيك -N-2-hydroxyethylpiperazine-N´-2-ethanesulfonic acid)، الجليسيرول وعامل منظم.

في أحد التجسيدات، تتكون الصيغة بالحقن من فيروس الكشف الحالي، HEPES على سبيل المثال 5 ملليلتر مولار، جليسيرول على سبيل المثال 5-20% (بالحجم/الحجم)، حمض الهيدروكلوريك، على سبيل المثال لتعديل الرقم الهيدروجيني إلى المدى 7-8 والماء للحقن.

في أحد التجسيدات، يتم صياغة 0.7 ملليلتر من فيروس الكشف الحالي بتركيز 2 × 1210 جسيم فيروسي/ملليلتر في 5 ملليلتر مولار من HEPES و20% جليسيرول برقم هيدروجيني نهائي PH 7.8.

توجد مناقشة شاملة حول المواد الحاملة المقبولة صيدليًا في المرجع Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

في أحد التجسيدات، يتم توفير الصيغة كصيغة للإعطاء الموضعي بما في ذلك الاستنشاق.

تشتمل المستحضرات المناسبة القابلة للاستنشاق على مساحيق استنشاق، أيروسولات معايرة تحتوي على غازات دافعة أو محاليل استنشاق خالية من غازات دافعة. عادة ما تحتوي المساحيق القابلة للاستنشاق وفقًا للكشف على فيروس كما هو موصوف هنا مع سواغ مقبول فسيولوجيًا.

قد تشتمل هذه المساحيق القابلة للاستنشاق على مركبات مونو سكاريد monosaccharides (مثل الجلوكوز glucose أو الأرابينوز arabinose)، ومركبات داي سكاريد disaccharides (مثل اللاكتوز lactose ، والسكاروز saccharose ، والمالتوز maltose)، ومركبات أوليجو وبولي سكاريد oligo- and polysaccharides (مثل ديكستران dextranes)، كحوليات متعددة polyalcohols (مثل السوربيتول sorbitol ، المانيتول mannitol ، الزيليتول xylitol)، والأملاح (مثل كلوريد الصوديوم sodium chloride وكربونات الكالسيوم calcium carbonate) أو خلائط منها مع بعضها بعضًا. تُستخدم مركبات مونو وداي سكاريد Mono-

or disaccharides بشكل مناسب، واستخدام اللاكتوز أو الجلوكوز، بشكل محدد على سبيل المثال لا الحصر في شكل هيدرات منها.

تتطلب جسيمات الترسيب في الرئة حجم جسيم أقل من 10 ميكرو ن، على سبيل المثال 1-9 ميكرون على سبيل المثال من 0.1 إلى 5 ميكرو متر، على وجه الخصوص من 1 إلى 5 ميكرو متر. إن حجم الجسيمات الحاملة للفيروس ذو أهمية أولية وبالتالي في أحد التجسيدات، يمكن أن يتم امتزاز أو امتصاص الفيروس على جسيم، على سبيل المثال جسيم اللاكتوز بالحجم المعطى.

إن الغازات الدافعة التي يمكن استخدامها لتحضير أيروسولات قابلة للاستنشاق معروفة في المجال. يتم اختيار الغازات الدافعة المناسبة من بين الهيدروكربونات hydrocarbons على سبيل المثال n-بروبان n-propane ، n- بيوتان n-butane أو أيزو بيوتان isobutane وهالو هيدروكربونات halohydrocarbons على سبيل المثال، المشتقات المكلورة chlorinated و/أو المفلورة fluorinated من الميثان methane ، الإيثان ethane ، البروبان propane ، البيوتان butane ، سيكلو بروبان cyclopropane أو سيكلو بيوتان cyclobutane. يمكن استخدام الغازات الدافعة المذكورة أعلاه بمفردها أو في خليط منها.

والغازات الدافعة المناسبة بشكل خاص هي مشتقات الألكان المهلجنة halogenated alkane المختارة من بين TG 11، TG 12، TG 134a وTG227. ومن بين الهيدروكربونات المهلجنة halogenated hydrocarbons المذكورة أعلاه، تُعد TG134a (1، 1، 1، 2-تترا فلورو إيثان (1,1,1,2-tetrafluoroethane)) وTG227 (1، 1، 1، 2، 3، 3، 3-هبتا فلورو بروبان (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane)) ومزائج منها هي مناسبة بشكل خاص.

قد تحتوي الأيروسولات aerosols القابلة للاستنشاق التي تحتوي على الغازات الدافعة على مكونات أخرى أيضًا، على سبيل المثال المذيبات المشتركة، المثبتات، العوامل النشطة عند السطح (المواد الخافضة للتوتر السطحي)، ومضادات الأكسدة ومواد التزليق ووسائل تعديل الرقم الهيدروجيني. كل هذه المكونات معروفة في المجال.

يمكن أن تحتوي الأيروسولات القابلة للاستنشاق التي تحتوي على الغازات الدافعة الواردة في الاختراع على ما يصل إلى 5% بالوزن من المادة الفعالة. تحتوي الأيروسولات طبقًا للاختراع، على

سبيل المثال، من 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 المكون النشط.

يمكن أيضًا، كبديل لذلك، أن يكون الإعطاء الموضعي إلى الرئة عن طريق إعطاء محلول سائل أو صيغة معلق، على سبيل المثال، استخدام جهاز على سبيل المثال بخاخ، على سبيل المثال، بخاخ متصل بضاغط (على سبيل المثال، بخاخ من نوع Pari LC-Jet Plus(R) متصل بضاغط Pari Master(R) من إنتاج شركة Pari Respiratory Equipment, Inc., (Richmond, Va.).

يمكن توصيل فيروس الاختراع مشتّت في مذيب، على سبيل المثال في شكل محلول أو معلق، مثلما سبق وصفه بالفعل لصيغ الحقن. يمكن تعليقه في محلول فسيولوجي مناسب، على سبيل المثال، محلول ملحي أو مذيب مقبول دوائيا أو محلول منظِّم. قد تحتوي المحاليل المنظمة المعروفة في المجال على 0.05 مجم إلى 0.15 مجم من داي إيديت الصوديوم، و8.0 مجم إلى 9.0 مجم من كلوريد الصوديوم، و0.15 مجم إلى 0.25 مجم من بولي سوربات، و0.25 مجم إلى 0.30 مجم من حمض السيتريك غير المائي، و0.45 مجم إلى 0.55 مجم من سيترات الصوديوم لكل 1 ملليلتر من الماء وذلك لتحقيق الرقم الهيدروجيني من حوالي 4.0 إلى 5.0.

يمكن أن تحتوي المعلقات العلاجية أو صيغ المحاليل أيضًا على واحد أو أكثر من السواغات. والسواغات معروفة جيدًا في المجال وتشمل محاليل منظمة (مثل، عامل منظم سيترات، عامل منظم فوسفات، عامل منظم أسيتات وعامل منظم بيكربونات)، أحماض أمينية، يوريا، كحولات، حمض أسكوربيك، فسفوليبيدات، بروتينات (مثل ألبومات المصل)، EDTA، كلوريد الصوديوم وليبوسومات، مانيتول، سوربيتول وجليسيرول. يمكن كبسلة المحاليل أو المعلقات في الليبوسومات أو الكريات الدقيقة القابلة للتحلل. يتم توفير الصيغة بشكل عام في صورة معقمة بشكل كبير باستخدام عمليات التصنيع المعقمة.

وقد يشمل ذلك الإنتاج والتعقيم عن طريق ترشيح المذيب/المحلول المنظَّم المستخدَم للصيغة، التعليق المعقم للجسم المضاد في محلول مذيب منظَّم معقَّم، وتشتيت الصيغة في أوعية معقمة بطرق مألوفة لذوي المهارة العادية في المجال.

يمكن توفير الصيغة القابلة للرش وفقًا للكشف الحالي، على سبيل المثال، كوحدات جرعة مفردة (على سبيل المثال، حاويات أو قوارير بلاستيكية محكمة الغلق) معبأة في مغلفات رقيقة. تحتوي كل قارورة على جرعة وحدة بالحجم، على سبيل المثال، 2 ملليلتر، من عامل منظم لمذيب/محلول.

العلاج: في جانب آخر، يمتد الكشف الحالي إلى فيروس أو تركيبة منه كما هو موصوف هنا لاستخدامه في العلاج، خاصة لعلاج السرطان.

في أحد التجسيدات، تكون طريقة العلاج لاستخدامها في علاج الورم، وعلى وجه الخصوص ورم صلب.

يُقصد بمصطلح الورم المستخدم هنا هو الإشارة إلى كتلة غير طبيعية من الأنسجة التي تنتج عن الانقسام الخلوي المفرط غير المنضبط والتقدمي، والذي يطلق عليه أيضًا الورم. قد يكون الورم حميدًا (غير سرطاني) أو خبيثًا. يشمل الورم جميع أشكال السرطان والنقائل.

في أحد التجسيدات، يكون الورم صلبًا. قد يكون الورم الصلب موضعيًا أو نقائليًا.

في أحد التجسيدات، يكون الورم ذو أصل ظهاري.

في أحد التجسيدات، يكون الورم مرضا خبيثا، على سبيل المثال سرطان القولون والمستقيم، ورم كبد، سرطان البروستاتا، سرطان البنكرياس، سرطان الثدي، سرطان المبيض، سرطان الغدة الدرقية، سرطان الكلى، سرطان المثانة، سرطان الرأس والرقبة أو سرطان الرئة.

في أحد التجسيدات، يكون الورم مرضًا خبيثًا هو سرطان القولون والمستقيم.

يشير المرض الخبيث كما يُستخدم هنا إلى خلايا سرطانية.

في أحد التجسيدات، يتم استخدام الفيروس الغذّي الحالّ للورم في العلاج أو الوقاية من النقيلة.

في أحد التجسيدات، تُستخدم الطريقة أو الصيغة الواردة هنا في علاج السرطانات المقاومة للأدوية.

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

في أحد التجسيدات، يتم توفير فيروس أو صيغة وفقًا للكشف الحالي لاستخدامها في تصنيع دواء لعلاج السرطان، على سبيل المثال السرطان الموصوف أعلاه.

في جانب آخر، يتم تقديم طريقة لعلاج السرطان تشتمل على إعطاء كمية فعالة علاجيا من فيروس أو صيغة وفقًا للكشف الحالي إلى مريض في حاجة لذلك، على سبيل المثال مريض بشري.

في أحد التجسيدات، يتم إعطاء الفيروس الحالّ للورم أو الصيغة الواردة هنا في توليفة مع علاج آخر.

يُقصد بمصطلح "في توليفة" طبقًا لاستخدامه هنا أن يشمل إعطاء الفيروس الحالّ للورم قبل، بالتزامن مع و/أو بعد علاج السرطان.

يشمل علاج السرطان: الجراحة، العلاج الإشعاعي، العلاج الموجه و/أو العلاج الكيميائي.

يشير علاج السرطان كما هو مستخدم هنا إلى العلاج بمركب علاجي أو عامل حيوي، على سبيل المثال، جسم مضاد يهدف إلى علاج السرطان و/أو علاج مستدام.

في أحد التجسيدات، يتم اختيار علاج السرطان من أي علاج آخر مضاد للسرطان بما في ذلك عامل العلاج الكيميائي، أو عامل مضاد للسرطان مستهدف، أو العلاج الإشعاعي، أو العلاج بالنظائر المشعة أو أي توليفة منها.

في أحد التجسيدات، يمكن استخدام فيروس الكشف الحالي على سبيل المثال فيروس غذّي حال للورم كعلاج مسبق للعلاج، على سبيل المثال جراحة سبيل المثال (علاج مساعد جديد)، لتقليص الورم، لعلاج نقيلة و/أو الوقاية من نقيلة أو نقيلة إضافية. يمكن استخدام الفيروس الغذّي الحال للورم بعد العلاج، على سبيل المثال جراحة سبيل المثال (علاج مساعد)، لعلاج نقيلة و/أو الوقاية من نقيلة أو نقيلة إضافية.

يشير مصطلح "بالتزامن" أو "في نفس الوقت" طبقًا للاستخدام هنا إلى إعطاء علاج السرطان الإضافي في نفس الوقت أو في نفس الوقت تقريبًا مع صيغة الفيروس الغذّي. يمكن احتواء العلاج داخل نفس الصيغة أو إعطاؤها كصيغة منفصلة.

في أحد التجسيدات، يتم إعطاء الفيروس في توليفة مع عامل العلاج الكيميائي.

يقصد بعامل العلاج الكيميائي المستخدم هنا الإشارة إلى عوامل كيميائية معينة مضادة للورم أو أدوية تقضي على الخلايا والأنسجة الخبيثة انتقائيًا. على سبيل المثال، عوامل الألكلة، مضادات نواتج الأيض، مركبات أنثراسيكلين، قلوانيات النبات، مثبطات توبو أيزو ميراز، والعوامل المضادة للورم الأخرى. وتشمل الأمثلة الأخرى للعلاج الكيميائي: دوكسوروبيسين، 5-فلوروبوراسيل (5-FU)، باكليتاكسيل، كابسيتابين، إرينوتيكان، وبلاتينز على سبيل المثال سيسبلاتين وأُكساليبلاتين. يمكن اختيار الجرعة المفضلة من قبل الطبيب الممارس بناءً على طبيعة السرطان الذي يتم علاجه.

في أحد التجسيدات، يكون العامل العلاجي هو جانسيكلوڤير، والذي قد يساعد في السيطرة على الاستجابات المناعية و/أو تكوّن الأوعية الدموية للورم.

في أحد التجسيدات، يكون واحد أو أكثر من العلاجات المستخدمة في الطريقة المتبعة هنا إيقاعيًا، بمعنى أكثر تحديدًا علاجًا مستمرًا أو متكررًا مع جرعات منخفضة من الأدوية المضادة للسرطان، غالبًا ما تكون جنبًا إلى جنبٍ مع طرق علاج أخرى.

يمكن أن تكون المجموعة الفرعية B للفيروسات الغدّية الحالة للورم، وبشكل محدد Ad11 وتلك المشتقة منها على سبيل المثال EnAd تآزرية بشكل خاص مع العلاج الكيميائي لأنه يبدو أن لديها آلية عمل مستقلة إلى حد كبير عن موت الخلايا المبرمج، أي قتل الخلايا السرطانية بآلية نخروية حالّة في الغالب. وعلاوة على ذلك، فإن كبت المناعة الذي يحدث أثناء العلاج الكيميائي قد يسمح للفيروس الحالّ للورم بالعمل بكفاءة أكبر.

تشير الجرعة العلاجية المستخدمة هنا إلى كمية الفيروس، على سبيل المثال الفيروس الغدّي الحالّ للورم، التي تكون مناسبة لتحقيق التأثير العلاجي المقصود عند استخدامها في نظام معالجة مناسب، على سبيل المثال تحسن أعراض مرض أو ظروفه. يمكن اعتبار الجرعة بأنها جرعة علاجية في علاج السرطان أو النقائل عندما يكون عدد الجسيمات الفيروسية كافيًا ليؤدي إلى ما يلي: إبطاء أو إيقاف نمو الورم النقيلي، انكماش حجم الورم، و/أو إطالة عمر المريض. عادة ما

تكون الجرعات العلاجية المناسبة عبارة عن توازن بين تأثير علاجي وسمية مسموح بها، على سبيل المثال حيث يكون التأثير الجانبي والسمية مقبولان بسبب الفائدة التي يحققها العلاج.

في أحد التجسيدات، يتم إعطاء فيروس أو جزأ منشأ علاجي وفقًا للكشف الحالي (بما في ذلك صيغة تشتمل عليها) أسبوعيًا، على سبيل المثال في الأسبوع 1 تُعطى الجرعة في اليوم 1، 3، 5 متبوعًا بجرعة واحدة كل أسبوع لاحق.

في أحد التجسيدات، يتم إعطاء فيروس أو جزأ منشأ علاجي وفقًا للكشف الحالي (بما في ذلك صيغة تشتمل عليها) كل أسبوعين أو ثلاثة، على سبيل المثال تُعطى في الأسبوع 1 في اليوم الأول والثالث والخامس وفي الأسبوع 2 أو 3 في اليوم الأول والثالث والخامس منه. يمكن تكرار نظام الجرعات المذكور حسب الحاجة.

في أحد التجسيدات، يتم إعطاء فيروس أو جزأ منشأ علاجي وفقًا للكشف الحالي (بما في ذلك صيغة تشتمل عليها) شهريًا.

في أحد التجسيدات، يتم تحضير الفيروسات والأجزاء المنشأة للكشف الحالي عن طريق تقنيات إعادة الاتحاد الجيني. سيقدر الشخص الماهر أن جينوم الفيروس الغدّي المزود بموصل خلايا تائية يمكن تصنيعه بوسائل تقنية أخرى، بما في ذلك التخليق الكامل للجينوم أو البلازميدة الذي يتضمن جزءًا من كل الجينوم. سوف يقدر الشخص الماهر أنه في حالة تخليق الجينوم، قد لا تشتمل منطقة الغرس على نوكليوتيدات مواقع تقييد حيث أن هذه الأخيرة بمثابة منتجات بعد إدخال الجينات باستخدام أساليب إنشاء النسائل.

في واحد التجسيدات، يتم تصنيع جينوم الفيروس الغدّي المزود بموصل خلايا تائية بالكامل، على سبيل المثال وفقًا لالمتوالية رقم: 34 إلى 37.

ويمتد الكشف في هذه الوثيقة أيضًا إلى فيروس غدّي له الصيغة (I) أو صيغة فرعية منها، تم الحصول عليه أو يمكن الحصول عليه من غرس جين متحور أو طقم جينات متحورة.

التعبير "عبارة عن" كما هو مستخدم هنا يعني "يشتمل على".

في سياق هذا الوصف، يجب تفسير المصطلح "يشتمل على" على أنه "يتضمن".

يُقصد أن تجسيدات الاختراع التي تشتمل على ميزات/عناصر معينة تهدف أيضًا إلى تغطية "تتكون من" أو "تتكون جوهريا من" أو "تتكون بشكل أساسي من" العناصر/الميزات ذات الصلة.

عندما يكون من المناسب تقنيًا، يمكن دمج تجسيدات الاختراع.

يتم تضمين المراجع الفنية على سبيل المثال براءات الاختراع والطلبات هنا كمراجع.

قد تشكّل أي تجسيدات محددة ومذكورة بشكل صريح في هذه الوثيقة أساسًا لإخلاء المسؤولية سواء بمفردها أو بالاقتران مع تجسيد إضافي واحد أو أكثر.

يستند هذا الطلب في الأسبقية إلى GB1713765.4، WO2018/041838 و WO2018/041827 المضمَّنين هنا كمراجع. يجوز استخدام هذه الوثائق لتصحيح الأخطاء في الوصف الحالي، وبخاصة أي خطأ في قائمة المتواليات.

المتواليات: المتوالية رقم: 1 متوالية مشفِّرة مضادة لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية DNA، مع متوالية إشارة عند الطرف N وعلامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 2 متوالية حمض أميني مضادة لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ، مع متوالية إشارة عند الطرف N وعلامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 3 عينة مقارنة لمتوالية مشفِّرة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية DNA (مضاد FHA)، مع متوالية إشارة عند الطرف N وعلامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 4 عينة مقارنة لمتوالية حمض أميني منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (مضاد FHA) مع متوالية إشارة عند الطرف N وعلامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 5 : مضادة حمض أميني ضد CD3 ScFv

المتوالية رقم: 6 : مضادة لـ CD3 VH

المتوالية رقم: 7 : مضادة لـ CD3 VL

المتوالية رقم: 8 : متوالية رابط مضادة لـ CD3 ScFv

المتوالية رقم: 9: مضادة لـ FAP ScFv

المتوالية رقم: 10: نطاق مضاد لـ FAP VL

المتوالية رقم: 11: نطاق مضاد لـ FAP VH

المتوالية رقم: 12: متوالية رابط مضادة لـ FAP ومضادة لـ رابط EpCAM

المتوالية رقم: 13: متوالية قيادية منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

المتوالية رقم: 14: عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (مضادة لـ FHA)

المتوالية رقم: 15: عينة مقارنة (مضادة لـ FHA) ScFv

المتوالية رقم: 16: عينة مقارنة (مضادة لـ FHA) VL

المتوالية رقم: 17: عينة مقارنة (مضادة لـ FHA) VH

المتوالية رقم: 18: عينة مقارنة لمتوالية رابط (مضادة لـ FHA) ScFv

المتوالية رقم: 19: متوالية علامة Deca-His

المتوالية رقم: 20:

منشط خلايا تائية ثنائية النوعيةFAP-P2A-RFP

(خط مائل = قيادي، خط غليظ = موقع شطر فورين، خط تحته سطر = P2A متوالية، الحروف اللاتينية الصغيرة = RFP)

المتوالية رقم: 21: عينة مقارنة (مضاد FHA)

منشط خلايا تائية ثنائية النوعيةFAP-P2A-RFP

(خط مائل = قيادي، خط غليظ = موقع شطر فورين، خط تحته سطر = P2A متوالية، الحروف اللاتينية الصغيرة = RFP)

المتوالية رقم: 22: متوالية مشفِّرة FAP DNA بشرية

المتوالية رقم: 23: متوالية حمض أميني FAP بشرية

المتوالية رقم: 24: متوالية معزز CMV

المتوالية رقم: 25: متوالية تذييل بعديد أدينيلات SV40 متأخرة

المتوالية رقم: 26: NG-605 (EnAd-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية)

المتوالية رقم: 27: NG-606 (EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية)

المتوالية رقم: 28 جينوم EnAd

المتوالية رقم: 29 متوالية BX DNA تناظر وتتضمن زوج قاعدة 28166-28366 للجينوم EnAd

المتوالية رقم: 30 BY DNA متوالية تناظر وتتضمن زوج قاعدة 29345-29379 للجينوم EnAd

المتوالية رقم: 31 HIS-Tag

المتوالية رقم: 32 متوالية مستقبل تضفير.

المتوالية رقم: 33 متوالية تذييل بعديد أدينيلات SV40

المتوالية رقم: 34 متوالية حمض نووي FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (OKT3)

المتوالية رقم: 35 متوالية حمض نووي FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (aCD3)

المتوالية رقم: 36 طقم جينات متحورة NG-611

المتوالية رقم: 37 طقم جينات متحورة NG-612

المتوالية رقم: 38 طقم جينات متحورة NG-613

المتوالية رقم: 39 غرس موقع تقييد (BX)

المتوالية رقم: 40 غرس موقع تقييد (BY)

المتوالية رقم: 41 متوالية معزز CMV

المتوالية رقم: 42 متوالية معزز PGK

المتوالية رقم: 43 متوالية معزز CBA

المتوالية رقم: 44 متوالية مستقبل تضفير قصيرة DNA (SSA)

المتوالية رقم: 45 متوالية مستقبل تضفير DNA (SA)

المتوالية رقم: 46 متوالية مستقبل تضفير متفرعة DNA (bSA)

المتوالية رقم: 47 متوالية كوزاك (متوالية null)

المتوالية رقم: 48 مثال لكودون بدء

المتوالية رقم: 49 متوالية دخول ريبوسوم داخلي (IRES)

المتوالية رقم: 50 ببتيد P2A

المتوالية رقم: 51 ببتيد F2A

المتوالية رقم: 52 ببتيد E2A

المتوالية رقم: 53 ببتيد T2A

المتوالية رقم: 54 متوالية تذييل بعديد أدينيلات (بولي A)

المتوالية رقم: 55 متوالية قيادية

المتوالية رقم: 56 متوالية قيادية

المتوالية رقم: 57 متوالية حمض أميني IFNγ

المتوالية رقم: 58 متوالية حمض أميني IFNα

المتوالية رقم: 59 متوالية حمض أميني TNFα

المتوالية رقم: 60 DNA متوالية تناظر منطقة E2B EnAd لجينوم (زوج قاعدة 10355-5068)

المتوالية رقم: 61: متوالية مشفِّرة مضادة لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية DNA، مع متوالية إشارة عند الطرف N بدون علامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 62: متوالية حمض أميني مضادة لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ، مع متوالية إشارة عند الطرف N بدون علامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 63: عينة مقارنة لمتوالية مشفرة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية DNA (مضاد FHA)، مع متوالية إشارة عند الطرف N بدون علامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 64: عينة مقارنة لمتوالية حمض أميني منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (مضاد FHA) مع متوالية إشارة عند الطرف N بدون علامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 65: عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (مضاد FHA) بدون علامة ألفة ديكا-His عند الطرف C

المتوالية رقم: 66: NG-605 (EnAd-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية) بدون علامة ألفة ديكا-His

المتوالية رقم: 67: NG-606 (EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية) بدون علامة ألفة ديكا-His

المتوالية رقم: 68: متوالية حمض نووي EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية(OKT3)

المتوالية رقم: 69: متوالية حمض نووي FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (aCD3)

المتوالية رقم: 70: طقم جينات متحورة NG-611

المتوالية رقم: 71: طقم جينات متحورة NG-612

المتوالية رقم: 72: طقم جينات متحورة NG-613

المتوالية رقم: 73: طقم جينات متحورة NG-614

المتوالية رقم: 74: طقم جينات متحورة NG-617

المتوالية رقم: 75: متوالية حمض أميني FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (OKT3)

المتوالية رقم: 76: متوالية حمض أميني FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (aCD3)

المتوالية رقم: 77: جينوم NG-611

المتوالية رقم: 78: جينوم NG-612

المتوالية رقم: 79: جينوم NG-613

المتوالية رقم: 80: جينوم NG-614

المتوالية رقم: 81: جينوم NG-617

المتوالية رقم: 82: جينوم NG-615

المتوالية رقم: 83: جينوم NG-640

المتوالية رقم: 84: جينوم NG-641

المتوالية رقم: 85: متوالية Null

المتوالية رقم: 86: متوالية حمض نووي Flt3L

المتوالية رقم: 87: متوالية Null

المتوالية رقم: 88: متوالية حمض نووي MIP1α

المتوالية رقم: 89: متوالية ربط مرنة

المتوالية رقم: 90: متوالية حمض نووي IFNα

المتوالية رقم: 91: متوالية حمض نووي CXCL10

المتوالية رقم: 92: متوالية حمض نووي CXCL9

المتوالية رقم: 93: طقم جينات متحورة NG-615

المتوالية رقم: 94: طقم جينات متحورة NG-640

المتوالية رقم: 95: طقم جينات متحورة NG-641

المتوالية رقم: 96: متوالية حمض أميني FLT3L

المتوالية رقم: 97: متوالية حمض أميني MIP1α

المتوالية رقم: 98: متوالية حمض أميني IFNα

المتوالية رقم: 99: متوالية حمض أميني CXCL9

المتوالية رقم: 100: متوالية حمض أميني CXCL10

المتوالية رقم: 101: جينوم NG-618

المتوالية رقم: 102: متوالية حمض نووي NG-618 FAPمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية

المتوالية رقم: 103: طقم جينات متحورة NG-618

المتوالية رقم: 104 إلى 277 متواليات رابط

المتوالية رقم: 278 جينوم NG-616

المتوالية رقم: 279 إلى 281 عبارة عن بوادئ

الأمثلة: المثال 1: تم تصميم جزيئات منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية ناتجة عن عودة الاتحاد الجيني وبروتينات تم إنتاجها طبقًا لما هو موصوف في هذا المثال

1-1 الهندسة الوراثية لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية: يتم إنشاء منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية عن طريق ضم شظيتي جسم مضاد لسلسلة مفردة single chain antibody fragments (ScFv) ذات خصائص مختلفة مع رابط Gly4Ser مرن. يتم إنشاء ScFv من خلال ضم نطاقي VH و VL نطاق من الأجسام المضادة وحيدة النسيلة من قِبَل رابط. تم تصميم كل منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بمتوالية إشارة عند الطرف N لإفرازات الثدييات وعلامة ألفة ديكا هيستيدين طرفية C للكشف والتنقية. تم تصميم منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية بواسطة تقنيات الاستنساخ DNA القياسية وإدخالها في ناقلات تعبير عن البروتين (الشكل 1).

تم إنشاء مضاد لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية جديد باستخدام مضاد لـ FAP ScFv من براءة الاختراع WO2010037835A2 و SCFV مضاد لـ CD3 من براءة الاختراع WO 2005040220 (المتوالية رقم: 63 فيها)، مع إضافة إشارة متوالية وعلامة ألفة.

استخدمت عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مضاد لـ FHA (راصة دموي خيطية من Bordetella pertussis) ScFv من المرجع Hussein et al, 2007 (Hussein AH et al (2007) "Construction and characterization of single-chain variable fragment antibodies directed against the Bordetella pertussis surface adhesins filamentous hemagglutinin and pertactin". Infect Immunity 75, 5476-5482) و ScFv مضاد لـ CD3 من براءة الاختراع WO 2005040220 (المتوالية رقم: 63 فيها)، مع إضافة إشارة متوالية وعلامة ألفة.

1-2 إنتاج منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني: تم إنتاج البروتينات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني عن طريق استنساخ المتواليات المناظرة في ناقل pSF-CMV باستخدام معزز CMV (المتوالية رقم: 24) لدفع التعبير عن البروتين (الشكل 1). تم قياس تركيز DNA البلازميدي للبلازميدات pSF-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و pSF-CMV-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (الجدول 2)، عن طريق NanoDrop. يتم تضمين ناقل pSF-CMV فارغ كعينة مقارنة سالبة. تم تخفيف 54.7 ميكرو جرام من كل منها مع 4 ملليلتر OptiMEM. تم تخفيف 109.2 ميكرو جرام من PEI (خطي، الوزن الجزيئي 25000، Polysciences، الولايات المتحدة الأمريكية) في وسط به

4 ملليلتر OptiMEM وتم الخلط مع 4 ملليلتر من الحمض النووي المخفف لتوليد معقدات DNA-PEI (الحمض النووي: PEI بنسبة من 1: 2 (بالوزن/الوزن)). بعد التحضين في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة، تم الوصول بخليط المعقد إلى 18 ملليلتر مع OptiMEM وأضيف هذا الخليط المتحور وراثيًا إلى قارورة T175 تحتوي على خلايا Ad293 عند 90% من التشابك الخلوي. بعد تحضين الخلايا بالخليط المتحور وراثيًا لمدة 4 ساعات عند 37 درجة مئوية، 5% من CO2، تم إضافة 30 ملليلتر من الأوساط الخلوية (جلوكوز عالي DMEM مع جلوتامين تكميلي، خال من الفينول الأحمر) إلى الخلايا وتم تحضين القوارير عند 37 درجة مئوية، 5% من CO2 لمدة 48 ساعة. تم إخضاع قارورة أخرى من الخلايا للتحور الوراثي باستخدام PSF-CMV-GFP لضمان كفاءة تحوير وراثي كفء. لحصد البروتينات المفرزة، تم جمع المادة الطافية لخلايا متحورة وراثيًا وطردها مركزيا عند 350 جم عند 4 درجات مئوية لمدة 5 دقائق لإزالة مكونات الخلية (Allegra X-15R, Beckman Coulter). تم نقل المواد الطافية إلى وحدات ترشيح الطرد المركزي من طراز 15-10k MWCO Amicon Ultra، (Millipore). بعد التدويم عند 4750 دورة في الدقيقة و4 درجات مئوية، تم ضبط حجم ناتج الاحتجاز مع نفاذ التدفق للحصول على تركيز أعلى 50 ضعفا. تم تخزين الكميات المتساوية من البروتين المركز في -80 درجة مئوية

الجدول 2

يشير الحرف "p" المستخدم كبادئة لغوية في تسمية الأجزاء المنشأة إلى أن الجزء المنشأ عبارة عن بلازميدة

رقم تعريف البلازميدة	[حمض نووي للبلازميدة] نانو جرام/ملليلتر
pSE-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية	٦٧٠٠
pSE-CMV–عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية	٥٣٠٠
pSE-Lenti-FAP	٦٥٩,٦

3-1 إنتاج فيروسات تعبر عن FAP- منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية في توليفة مع بروتينات تعديل مناعي: تم إنشاء ثلاثة فيروسات (NG-640، NG-641 وNG-615) تشفر جزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مستهدف لـ FAP و2 أو 3 بروتينات تعديل مناعي (الجدول 1).

يشفر NG-640 ثلاث بروتينات جينات متحورة، وجزيء FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، وسيتوكينات CXCL9 وCXCL10. ويشفر كل من NG-641 وNG-615 أربع بروتينات لجينات متحورة. يشفر NG-641 كلا من FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وكيموكينات CXCL9 وCXCL10 وويقوم السيتوكين IFNα وNG-615 بتشفير FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية والكيموكين MIP1α والسيتوكينات FLT3 وIFNα. وتم أيضا إنشاء فيروس يشفر الجزيء FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية(NG-617) فقط.

الجدول ١

رقم الفيروس	طقم الجين المتحور
NG-615 (رقم تعليف المتوالية: ١)	SSA[1]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [2]-E2A[3]-Flt3L[4]-P2A[5]-MIP1α[6]-T2A[7]-IFNα[8]-PA[9]
NG-640 (رقم تعليف المتوالية: ٢)	SSA[1]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [2]-P2A[5]-CXCL10[10]-T2A[7]-CXCL9[11]-PA[9]
NG-641 (رقم تعليف المتوالية: ٣)	SSA[1]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [2]-P2A[5]-CXCL10[10]-T2A[7]-CXCL9[11]-E2A[3]-IFNα[8]-PA[9]
NG-617 (رقم تعليف المتوالية: ٤)	SSA[1]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [2]-PA[9]

في كل طقم جين متحور، تم مجانحة cDNA المشفر لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية وبروتينات تعديل مناعي أخرى عند 5' ومتوالية مستقبل تضفير قصير (SSA، CAGG) وعند الطرف 3' مع متوالية بولي (أ) متأخرة SV40 (PA، المتوالية رقم: 25). تم فصل متواليات cDNA لجين متحور باستخدام متواليات ببتيد قابلة للشطر الذاتي عالية الفعالية 2A (هي P2A، T2A، E2A، المتوالية رقم 50، 53 و52).

إنتاج الفيروس: تم استخدام البلازميدة pEnAd2.4 لإنشاء البلازميدات pNG-615، pNG-640 و pNG-641 عن طريق الإدخال المباشر لأطقم جينات متحورة تخليقية (رقم تغليف المتواليات: 93، 94 و95، على التوالي). تحتوي NG-615 على جينات متحورة أربع تشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مستهدف FAP (المتوالية رقم: 102)، Flt3L (المتوالية رقم: 86)، MIP1α (المتوالية رقم: 88) وIFNα (المتوالية رقم: 90). تقوم NG-640 و NG-641 بتشفير منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المستهدف لـ FAP (المتوالية رقم: 102)، CXCL9 (المتوالية رقم: 92) وCXCL10 (المتوالية رقم: 91)، كما يحتوي NG-641 على IFNα مشفر لجين متحور رابع (المتوالية رقم: 90). ويتم عرض مخططات أطقم الجينات المتحورة في الشكل

1. تم تأكيد إنشاء الحمض النووي للبلازميدة عن طريق تحليل التقييد وإنشاء متواليات الحمض النووي.

تم إنشاء صيغ خطية من البلازميدات pNG-615، pNG-640 و pNG-641 عن طريق الاهتضام بالتقييد باستخدام الإنزيم AscI لإنتاج الجينومات الفيروسية. تم تضخيم الفيروسات وتنقيتها وفقًا للطرق المبينة أدناه.

تم تنقية الحمض النووي المهتضَم عن طريق استخلاص الفينول/الكلوروفورم وترسيبه لمدة 16 ساعة، -20 درجة مئوية في 300 ميكرو لتر > 95% من إيثانول فئة البيولوجيا الجزيئية و10 ميكرو لتر من أسيتات الصوديوم بتركيز 3 مولار. تم إنشاء كريات من الحمض النووي المترسب عن طريق تعريضه للطرد المركزي عند 14000 دورة في الدقيقة، لمدة 5 دقائق. وتم الغسل في 500 ميكرو لتر من الإيثانول، 70%، قبل الطرد المركزي مرة أخرى، 1400 دورة في الدقيقة، 5 دقائق. تم تجفيف كرية الحمض النووي النظيفة بالهواء، وإعادة تعليقها في 500 ميكرو لتر من OptiMEM يحتوي على 15 ميكرو لتر من كاشف التحور الوراثي ليبوفكتامين وتم تحضينه لمدة 30 دقيقة، عند درجة حرارة الغرفة. تم بعد ذلك إضافة خليط التحوير بالتنقيط إلى دورق T-25 تحتوي على 293 خلية تم زراعتها حتى وصلت لنسبة 70% من التشابك. بعد تحضين الخلايا باستخدام خليط التحوير الوراثي لمدة ساعتين عند 37 درجة مئوية، تم إضافة 5% من CO2، 4 ملليلتر، من وسط الخلية (جلوكوز مرتفع من DMEM مع جلوتامين مستكمَل بـ 2% من FBS) إلى الخلايا وتم تحضين الدوارق عند 37 درجة مئوية، 5% من CO2.

تم مراقبة خلايا 293 المتحورة كل 24 ساعة، وتم استكمالها بالوسط الإضافي كل 48-72. تم مراقبة إنتاج الفيروس بملاحظة تأثير اعتلال خلوي cytopathic effect كبير (CPE) في الطبقة الأحادية للخلية. بمجرد مراقبة CPE كبير، تم حصد الفيروس من خلايا 293 من خلال ثلاث دورات من التجميد-فك التجميد. تم استخدام الفيروسات المحصودة لإعادة إصابة 293 خلية لتضخيم مخزون الفيروسات. تم تأكيد إنتاج الفيروس العيوش خلال التضخيم عن طريق مراقبة CPE الملحوظ في الطبقة الأحادية للخلية. بمجرد ملاحظة CPE، تم حصد الفيروس من خلايا 293 عن طريق ثلاث دورات تجميد-فك تجميد. تم استخدام المخزونات المضخمة لمزيد من

التضخيم قبل تنقية الفيروسات باستخدام ربط مزدوج باستخدام كلوريد السيزيوم لإنتاج مخزونات الفيروسات.

المثال 2: تحليل انتساخ الفيروس والنشاط الحال للورم: انتساخ الفيروس: تم استخدام سلالات خلايا كارسينوما الرئة (A549)، الصدر (MDA-MB-453) أو المثانة (RT4) التي تم تلقيحها لمدة 72 ساعة باستخدام 1ppc NG-615، NG-640، NG-641، NG-617، إنادنوتوسيريف (EnAd) أو تركها غير مصابة للقياس الكمي للحمض النووي الفيروسي بواسطة qPCR. تم جمع المواد الطافية الخلوية وترويقها عن طريق الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 دورة في الدقيقة. تم استخدام 50 ميكرو لتر من المادة الطافية لتحليل الحمض النووي.

تم استخلاص الحمض النووي من العينة الطافية باستخدام طقم Qiagen DNeasy، وفقًا لبروتوكول الشركة المصنعة. تم أيضا تحضير منحنى قياسي باستخدام جسيمات فيروس EnAd (2.5e10-2.5e5vp)، واستخلاصها باستخدام طقم DNeasy. تم تحليل كل عينة مستخلصة أو قياسية باستخدام qPCR باستخدام مجموعة بادئ-مسبار خاص بجين فيروسي معين إلى الجين المبكر E3. أظهر القياس الكمي لعدد الجينومات الفيروسية المكتشفة لكل خلية الانتساخ الفيروسي في A549 وMDA-MB-453 وRT4 لكل الفيروسات المختبرة (NG-617، NG-615، NG-640 وNG-641) (الشكل 2). كان الانتساخ الفيروسي مشابها لكل الفيروسات ومكافئا لذلك الخاص بالفيروس EnAd الأبوي. لم يتم اكتشاف جينومات فيروسية في الخلية غير المصابة.

النشاط الحالّ للورم: تم مراقبة خلايا كارسينوما الرئة (A549) التي تم تلقيحها باستخدام 100ppc NG-615، NG-640، NG-641، NG-617، EnAd أو تُركت غير مصابة باستخدام وسيلة تحليل الخلايا في الوقت الفعلي xCELLigence (اختصارا (RTCA)). تم مراقبة تكاثر الخلايا كل 60 دقيقة حتى 96 ساعة. تم تقييم انحلال الورم للخلايا عن طريق حساب زمن القتل 50 (KT50) والذي يعبر عن النقطة الزمنية عندما يتم بلوغ 50% من الانحلال (الشكل 3). أظهرت هذه البيانات KT50 مكافئا عبر كل الفيروسات المختبرة بما في ذلك الفيروس EnAd الأم. لم يُلاحظ أي تأثير حال للورم على الخلايا غير المعالجة.

تشير هذه البيانات مجتمعةً إلى أن تضمين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وإما اثنين أو ثلاث جينات متحورة للتعديل المناعي لا يؤثر تأثيرًا ذا دلالة في النشاط الانتساخي أو الحال للورم لفيروس EnAd.

المثال 3: تحليل التعبير عن الجين المتحور الذي يشارك فيه الفيروس: للكشف عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، يمكن فحص علامة ألفة ديكاهيستيدين عند الطرف C باستخدام جسم مضاد مضاد لـ His باستخدام تقنية بقعية ويسترن. تم ضبط عينات البروتين باستخدام محلول منظم انحلال إلى حجم نهائي من 15 ميكرو لتر بما في ذلك 2.5 ميكرو لتر 6× من محلول منظم لعينة Laemmli SDS التي تحتوي على β-مركابتو إيثانول وSDS. تم تحضين العينات لمدة 5 دقائق عند 95 درجة مئوية لدنترة البروتينات وتحميلها على 10% من هلام بولي أكريلاميد الجاهز -15 عين (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BioRad, UK). تم تشغيل الهلام في 180 فولت لمدة 45 دقيقة في 1 × محلول منظم عامل داخل نظام رباعي Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad, UK). تم تنفيذ النقل في وجود حزمة ثلج للحد من الحرارة. تم حظر غشاء النيترو سيليولوز باستخدام 5% من اللبن في PBS-T على جهاز رج لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الغرفة، وتم بحثه باستخدام الجسم المضاد لـ His (C-term) (الفأر α-6xHis، النسيلة 3D5، Invitrogen، المملكة المتحدة، #46-0693)، المخفف بنسبة 1: 5000 في 5%/PBS من اللبن. بعد التحضين على جهاز رج طوال الليل في 4 درجات مئوية، تم غسل الغشاء وفحصه باستخدام جسم مضاد ألفا-فأر-جلوبيولينمناعي ثانوي متعدد النسائل مرقم بعلامة HRP (1: 10.000 في 5%/PBS من اللبن، داكو، #P0161) لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة. للتمثيل البصري، تم وضع ركيزة مدة مستمرة SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate، (Thermo Fisher Scientific, UK)، وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة وتعريضها لفيلم أشعة سينية وتم تطويرها في معالج أفلام أوتوماتيكي. أظهرت النتائج تعبير وإفراز بروتين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من خلايا Ad293 متحورة وراثيًا باستخدام بلازميدات التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، ولكن ليس الناقل الأبوي.

القياس الكمي لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني: لقياس كمية بروتين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني، تم استخدام تقنية بقعة النقطة لمقارنة إشارة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بمعيار بروتين (C-term 10His) الموسوم بعلامة His (10 × Cathepsin D بشري موسوم بعلامة هيس، Biolegend، #556704).

تم تحضير التخفيفات التسلسلية للضعفين لعينات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ومعيار البروتين، و1.5 ميكرو لتر من كل منها يطبق مباشرة على غشاء نيترو سيليولوز وتجفيفه بالهواء لمدة 20 دقيقة. تم تنفيذ بروتوكول الحجب والصبغ الموصوف أعلاه لبقعة ويسترن. تم تعديل التركيز الجزيئي لمعيار البروتين لتمثيل تركيز منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بمقدار 250 ميكرو جرام/ملليلتر. وأظهرت النتائج (الشكل 13أ) التعبير وإفراز بروتين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من خلايا Ad293 المتحورة وراثيًا باستخدام بلازميدات التعبير منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

اختبار ELISA لارتباط FAP: تم تقييم نشاط ربط FAP لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وعينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (مضاد FHA) (المتوالية رقم: 2 و4) المفرزة من الخلايا التي تم تحويرها وراثيًا باستخدام pSF-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو pSF-CMV-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بواسطة اختبار مناعي ماص مرتبط بالإنزيم enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). تم تضمين مواد طافية لناقل فارغ pff-CMV كعينة مقارنة سالبة. تم تحضير أطباق ELISA (طبق مكون من 96 عين من طراز Nunc Immuno MaxiSorp) مغطاة طوال اليوم طوال الليل في 4 درجة مئوية باستخدام بروتين FAP/سيبراز بشري (100 نانو جرام/عين، Sino Biological Inc، 10464-H07H-10) في محلول منظم PBS. تم غسل الأطباق بين كل خطوات الربط اللاحقة باستخدام PBS 0.05% من توين 20. تم إعاقة الأطباق لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة غرفة باستخدام 5% من BSA في PBS 0.05% من توين 20. تم تخفيف كميات متساوية من بروتين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، أو بروتين تم حصده من عيون متحورة وراثيًا بناقل pSF-CMV فارغ، لعشرة أضعاف إلى 55/PBS من 0.05%/BSA من توين 20. تم إضافة كل العينات إلى أطباق مدهونة بـ FAP وتحضينها لساعتين عند درجة حرارة الغرفة. تم تخفيف جسم مضاد الكشف، جسم مضاد لـ His (C-term) (فأر مضاد لـ 6xHis، نسيلة 3D5، Invitrogen, UK, #46-

0693) بنسبة 1 : 1000 واستخدامه لساعة عند درجة حرارة الغرفة. تم بعدها وضع Fc مضاد لفأر مقترن بـ HRP (بنسبة 1 : 1000 في 55/PBS من اللبن، Dako) لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الغرفة قبل إجراء الكشف عن HRP باستخدام محلول ركيزة HRP وهو 3، 3، 5، 5'-تيرا ميثيل إيثيلين داي أمين (TMB, Thermo-Fisher). تم استخدام محلول إيقاف لإنهاء التفاعل وتم قياس اللون المتطور في 450 نانو متر على قارئ أطباق. تم رسم منحنى الامتصاص عند 450 نانو متر لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ، عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ومواد طافية لناقل فارغ، مما يدل على ارتباط محدد لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ببروتين FAP. تظهر النتائج (الشكل 13ب) الارتباط المحدد لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وليس عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ببروتين FAP ناتج عن عودة الاتحاد الجيني.

التعبير عن الجين المتحور بواسطة ELISA: تم تقييم التعبير عن الجينات المتحورة للكيموكين أو السيتوكين، IFNα، MIP1α، FLT3L، CXCL10 وCXCL9 باستخدام ELISAs. تم تلقيح سلالات خلايا كارسينوما A549 وRT4 باستخدام NG-615 1ppc، NG-640، NG-641، NG-617، EnAd أو تُركت بدون إصابة لمدة 7 أيام. وعند الأيام 4 و7 بعد التلقيح، تم ترويق المواد الطافية الخلوية وتقييمها كشفا عن التعبير عن الجين المتحور بواسطة ELISA.

تم إجراء اختبار IFNα ELISA باستخدام طقم IFN ألفا البشري من نوع Verikine (تجربة فحص المقايسة Pbl)، تم إجراء اختبار MIP1α ELISA باستخدام طقم CCL3 Quantikine البشري (R & D systems)، تم إجراء اختبار Flt3L ELISA باستخدام طقم Flt3L ELISA البشري (Abcam)، تم إجراء اختبار CXCL9 ELISA باستخدام طقم CXCL9 ELISA البشري (Abcam)، وتم إجراء اختبار CXCL10 ELISA باستخدام طقم CXCL10 ELISA البشري (Abcam). تم إجراء جميع الاختبارات وفقًا لبروتوكول الشركة المصنعة.

تم تحديد تركيزات IFNα، MIPα، FLt3L، CXCL9 وCXCL10 المفرزة عن طريق الاستقراء من خلال المنحنيات القياسية. تم الكشف عن التعبير عن IFNα، MIP1α وFlt3L في المادة الطافية الخلوية للخلايا المعالجة بـ NG-615، وتم الكشف عن IFNα، CXCL9 وCXCL10 في المواد الطافية للخلايا المعالجة بـ NG-641، وتم الكشف عن CXCL9 وCXCL10 في

المواد الطافية للخلايا المعالجة بـ NG-640 (الشكلين 4 و5). لم يتم الكشف عن التعبير عن الجين المتحور للكيموكين أوالسيتوكين في الخلايا المقارنة المعالجة أو غير المعالجة بـ EnAd.

التعبير الوراثي عن الجين المتحور الوظيفي الذي تم تقييمه بواسطة اختبار مرشِد خلوي: تم تقييم التعبير عن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الوظيفي والجينات المتحورة وراثيًا IFNα في الاختبارات باستخدام سلالة خلايا مرشِدة Jurkat-Dual (شركة Invivogen). وهي سلالة خلايا ليمفاوية تائية بشرية تم الاحتفاظ بها حية (Jurkat) تم تحويرها بواسطة الدمج الثابت لاثنين من البنيات المرشِدة المنشأة القابلة للحث. تمكن واحدة من البنيات المرشِدة المنشأة القابلة للحث على تنشيط IFN-□ لمسار العامل التنظيمي للإنترفيرون interferon regulatory factor (IRF) ليتم دراسته من خلال إفراز ونشاط الفوسفاتاز القلوي الجنيني المفرَز (SEAP، بينما الثاني عبارة عن جزيء مرشد لوسيفيراز مفرَز مستجيب لـ NF-kB يتسم بالنشاط عن طريق إصدار الإشارات من خلال جزيء مرشد الخلايا التائية. يتسم نشاط SEAP بالتناسب مع مستوى □□-IFN الموجود في المادة الطافية ويمكن قياسه عن طريق الكشف عن الانحلال المستحث بـ SEAP للركيزة Quanti-BlueTM. تم تقييم التعبير عن MIP1α الوظيفي باستخدام سلالة خلية مرشِدة CCR5 (CHO-K1 CCR5 β -أرستين، Invivogen). تم تلقيح سلالات خلايا الكارسينوما A549 باستخدام NG-615 1ppc، NG-640، NG-641، NG-617، EnAd أو تركها غير مصابة. عند اليوم 2 أو 3 أو 4 بعد التلقيح، تم جمع المواد الطافية الخلوية وترويقها لتحليلها.

لتقييم وظيفة IFNα، تم إضافة 20 ميكرو لتر من كل مادة طافية، تخفيفها بنسبة 1 : 10 أو 1 : 250 في وسط الاستنبات، إلى خلايا Jurkat Dual (2 × 510 خلية/عين) وتحضينها لمدة 16-20 ساعة. تم بعد ذلك حصد المواد الطافية من الأطباق ومعالجتها باستخدام 200 ميكرو لتر من كاشف Quanti-Blue™ لمدة ساعة واحدة. تم تحليل الاطباق باستخدام قارئ أطباق دقيقة يقيس الامتصاص (Abs) عند 640 نانو متر. تم الكشف عن الاستجابات التي تبين وجود IFNα وظيفية في المواد الطافية من خلايا الكارسينوما المعالجة بـ NG-615 و NG-641 ولكن ليس بـ NG-640 أو NG-617 أو عينات المقارنة المعالجة بـ EnAd أو غير المعالجة بـ

EnAd (الشكل 6أ). كان مستوى IFNα الوظيفي المكتشف عند مستويات مشابهة في المواد الطافية المعالجة بـ NG-615 و NG-641.

لتقييم وظيفة MIP1α، تم استزراع خلايا مرشِدة CCR5 (5 × 310 خلية/عين) وتحضينها لمدة 20-24 ساعة. تم بعد ذلك إضافة 5 ميكرو لتر من المادة الطافية من الخلايا الورمية المعالجة إلى كل عين وتحضينها لمدة 90 دقيقة. تم بعدها الكشف عن النشاط المرشِد لإنزيم لوسيفيراز باستخدام محلول كشف وتم التقييم الكمي على قارئ أطباق تألق. تم الكشف عن الاستجابات التي تدل على وجود MIP1α وظيفي في المواد الطافية من خلايا الكارسينوما المعالجة بـ NG-615 والمواد الطافية الآتية من الخلايا المعالجة بعينة مقارنة موجبة من الفيروس معروفة بالتعبير عن MIP1a، NG-347 (الشكل 6ب).

لتقييم الخلايا الليفية الأولية للرئة MRC-5 الوظيفية FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (التي تعبر عن FAP على غشائها الخلوي) (2 × 410 خلية/عين) وتحضينها لمدة 4 ساعات للسماح بالتصاق الخلايا بالأطباق. تم بعد ذلك إضافة خلايا Jurkat-Dual (2 × 510 خلية/عين) إلى العيون جنبا إلى جنب 20 ميكرو لتر من المادة الطافية من الخلايا الورمية المعالجة. تم تحضين الخلايا لمدة 16-20 ساعة. تم بعدها حصد المواد الطافية ومعالجتها باستخدام 50 ميكرو لتر من كاشف Quanti-Luc قبل قراءة الأطباق على الفور على قارئ أطباق للكشف عن نشاط لوسيفيراز. تم الكشف عن استجابات تثبت وجود FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الوظيفي في المواد الطافية لخلايا الكارسينوما المعالجة بـ NG-617، NG-615، NG-640 و NG-641 ولكن ليس المواد الطافية للعينات المقارنة المعالجة أو غير المعالجة بـ EnAd (الشكل 7). ومن المثير للدهشة أنه بالنظر إلى المستويات المشابهة من IFN المنتَجة بواسطة NG-615 و NG-641، فإن المواد الطافية الآتية من الخلايا المعالجة بـ NG-615 كان لها مستويات أقل كثيرا من التعبير عن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الوظيفي عند مقارنة ذلك بكل من فيروسات التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الأخرى المختبرة، بما في ذلك الفيروس الآخر المحتوي على 4 جينات متحورة، NG-641.

المثال 2: تم تقييم الأنشطة الوظيفية لبروتينات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني في عدد من الاختبارات المختلفة قبل إنشاء فيروسات EnAd حاملة لجين متحور منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

عزل خلايا دم الإنسان أحادية النواة المحيطية (PBMCs): تم عزل خلايا PBMCs البشرية بواسطة الطرد المركزي متدرج الكثافة إما من عينات دم بشرية حديثة من متبرعين أصحاء أو من مخاريط الكريات البيض في الدم الكامل، تم الحصول عليها من NHS Blood و Transplant UK في أكسفورد. في كلتا الحالتين، تم تخفيف العينات 1: 2 باستخدام PBS وتم توزيع 25 ملليلتر من هذا الخليط في طبقات على 13 ملليلتر من Ficoll (1.079 جم/ملليلتر، Ficoll-Paque Plus، GE Healthcare) في أنبوب 50 ملليلتر من طراز Falcon. تم تعريض العينات للطرد المركزي (Allegra X-15R، Beckman Coulter) عند 1600 دورة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 22 درجة مئوية مع أقل معدل للإبطاء للحفاظ على فصل الطور. بعد الطرد المركزي، يمكن ملاحظة 4 طبقات تضمنت طبقة بلازما في الأعلى، تليها واجهة تحتوي على PBMCs، طبقة Ficoll وطبقة من خلايا الدم الحمراء والخلايا المحببة في القاع. تم جمع PBMCs باستخدام ماصة Pasteur وغسلها مرتين باستخدام PBS (1200 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقيقة في درجة حرارة الغرفة) وإعادة تعليقها في وسط RPMI مستكمَل باستخدام 10% من FBS.

عزل الخلايا التائية الموجبة لـ CD: تم استخلاص خلايا تائية موجبة لـ CD3 وهي من نوع (CD3+) من الخلايا PBMCs عن طريق استنفاد الخلايا غير CD3 باستخدام طقم عزل الخلايا التائية Pan، (Miltenyi Biotec, #130-096-535)، وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة.

معالجة عينات استسقاء أولية: تم استقبال عينات استسقاء بشرية أولية من جناح الأورام بمستشفى تشرشل (مستشفيات جامعة أكسفورد) من المرضى الذين يعانون من أعراض متعددة، بما في ذلك على سبيل المثال لا الحصر سرطان المبيض والبنكرياس والثدي والمعدة. عند الاستلام، تم فصل الكسور الخلوية والسائلة، مع قسامات من السائل المجمد عند -20 درجة مئوية للتخزين والتحليل المستقبلي. تمت معالجة الجزء الخلوي باستخدام محلول منظم انحلال خلايا الدم الحمراء (Roche, #11814389001) لإزالة خلايا الدم الحمراء، وفقًا لتعليمات الشركة المصنّعة. تم

تحديد أنواع الخلايا الموجودة في كل عينة بصبغها كشفا عن EpCAM وEGFR وFAP وCD45 وCD11b وCD56 وCD3 وCD4 وCD8 وPD1 وCTLA4 وتحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. بعد ذلك تم استخدام الخلايا مجددة لتنشيط الخلايا التائية في خارج الجسم الحي وتجارب انحلال الخلايا المستهدفة. في بعض الحالات، تم تمرير الخلايا في DMEM المستكمَلة بـ 10% من FBS للاستخدام في التجارب اللاحقة.

الحفاظ على سلالة الخلايا: تم الحفاظ على جميع سلالات الخلايا في DMEM (Sigma-Aldrich، UK) أو وسط RPMI (Sigma-Aldrich، UK) كما هو محدد في الجدول 3، مع 10% (بالحجم/الحجم) من مصل بقري جنيني (FBS، GibcoTM) و1% (بالحجم/الحجم) من البنيسيلين/الستربتومايسين (10 مجم/ملليلتر، Sigma-Aldrich، المملكة المتحدة)، في حاضنة مرطبة (MCO-17AIC, Sanyo) عند 37 درجة مئوية و5% من CO2، ما لم يُنص على خلاف ذلك. تم تقسيم الخلايا كل 2 إلى 3 أيام قبل الوصول إلى نقاط التشابك عن طريق التفكك الأنزيمي باستخدام تريبسين/EDTA (0.05% التربسين 0.02% EDTA، Sigma-Aldrich، UK). في هذه العملية، تم استنشاق وسط مستنبت وغسل الخلايا بـ 15 ملليلتر من PBS وتمت معالجة الخلايا في وقت لاحق بـ 2 ملليلتر من التريبسين/EDTA لمدة 2-10 دقائق عند 37 درجة مئوية. تم تعادل التربسين بـ 10 ملليلتر من DMEM تحتوي على 10% من FBS وتم نقل جزء من الخلايا إلى قوارير جديدة تحتوي على وسط جديد. بالنسبة لاستنبات الخلايا الروتيني، تم استكمال الوسط باستخدام 10% من FBS، للتهابات والتحوير الوراثي لفيروس البلازميدة مع 2% من FBS وعمليات تحوير وراثي للبلازميدة BiOC الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني بدون مكمل من FBS.

الجدول ٣

سلالة الخلايا	منشأ الخلايا	وسط الاستنبات	المصدر
سلالات خلوية مشتقة من الاستسقاء	الاستسقاء الأولي البشري	DMEM	NHS Blood & Transplant UK
BTC100	الخلايا الليفية الأولية (CAF) المرتبطة بسرطان الرئة الأولي البشري	DMEM	University of Oxford
CHO-K1	مبيض هامستر صيني، لاصق	RPMI	ATCC
سلالات خلوية ثابتة CHO-K1	مبيض هامستر صيني، لاصق	RPMI	-
DLD1	كارسينوما غدّية بشرية في القولون والمستقيم	RPMI	ATCC
HEK 293A	كُلى جنينية بشرية، لاصق	DMEM	ATCC
سلالات الخلايا الثابتة HEK 293A	كُلى جنينية بشرية، لاصق	DMEM	-
HEK 293T	كُلى جنينية بشرية، لاصق	DMEM	ATCC
MCF-7	غدة ثديية بشرية، لاصقة	DMEM	ATCC
خلايا الجلد الليفية الأولية البشرية الطبيعية (NHDF)	خلايا الجلد الليفية الأولية البشرية الطبيعية للبالغين	DMEM	ATCC
SKOV3	كارسينوما غدّية بشرية للمبيض	DMEM	ATCC

إحصائيات: في الحالات التي تم فيها مقارنة حالتين، أُجريت تحليلات إحصائية باستخدام اختبار t. في جميع الحالات الأخرى، تم إجراء التحليلات الإحصائية باستخدام ANOVA أحادي الاتجاه.

تحديد خصائص تنشيط الخلايا التائية البشرية بواسطة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني: تمت مقارنة قدرة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية للحث

على تنشيط الخلايا التائية في وجود أو عدم وجود خلايا الجلد الليفية الأولية البشرية الطبيعية normal human dermal fibroblast (NHDF). تم استنبات خلايا تائية بشرية من نوع CD3+ (70000 خلية لكل عين في أطباق مكونة من 96 عين بقاع على شكل حرف U) بشكل فردي أو مع خلايا NHDF (بنسبة 10: 1 من T إلى NHDF) في وجود الوسط وحده أو 300 نانو جرام/ملليلتر من FAP أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. تم استنبات الخلايا لمدة 24 ساعة عند 37 درجة مئوية استنباتًا مشتركًا وتم حصادها لاحقًا باستخدام محلول منظم فصل خلايا خالي من الإنزيمات (Thermo, #13151014). تم تحليل مستويات التعبير عن CD69 (الشكل 14أ) وCD25 (الشكل 14ب) على الخلايا التائية +CD45 عن طريق صبغ الأجسام المضادة وعدّ الخلايا بالتدفق وتم تمثيلها كقيم متوسط الفلورة الهندسي geometric mean fluorescence (gMFI). تم استخدام الأجسام المضادة لـ CD3 المثبتة بالطبق (7.5 ميكرو جرام/ملليلتر) كعينة مقارنة موجبة لتنشيط الخلايا التائية. تسبب FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بشكل انتقائي في التعبير عن واسمات التنشيط CD69 وCD25 على الخلايا التائية، مما يشير إلى أنه كان قادرًا على تنشيط الخلايا التائية.

في تجربة ثانية مماثلة، تم تقييم الخلايا التائية عن طريق صبغ السيتوكين داخل الخلايا لمدة 6 ساعات بعد الاستنبات المشترك مع خلايا NHDF (200000 خلية من نوع +CD3 زائد 40000 خلية من NHDF في عيون لطبق به 96 عين) و300 نانو جرام/ملليلتر من FAP أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. تم صبغ الخلايا التائية +CD45 داخل الخلايا من أجل التعبير IFNγ مع إضافة Brefeldin A إلى وسط الاستنبات قبل خمس ساعات من الحصاد. كعينة مقارنة موجبة، تم تحفيز الخلايا التائية باستخدام PMA قابل للذوبان (10 نانو جرام/ملليلتر) وأيونوميسين (1 ميكرو جرام/ملليلتر). تشير النتائج الموضحة في الشكل 14ج إلى أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في وجود NHDF نتج عنه عدد أكبر بكثير من الخلايا التائية التي تعبر عن IFNγ مقارنةً بعينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

المثال 4: لتقييم وظيفة IFN المنتجة من الجين المتحور في خلايا NG-641، تم معالجة Jurkat-DualTM باستخدام المواد الطافية من الخلايا الورمية A549 إما المصابة أو غير المصابة بـ 10 جسيمات لكل خلية particles per cell (ppc) من إنادنوتوسيريف (EnAd)

enadenotucirev أو NG-641 لمدة 3 أيام. لإثبات أن إفراز SEAP خاص بـ IFN محدد، تم حجب IFN عن طريق تحضين جسيمات مضادة خاصة بـ IFN محدد باستخدام المواد الطافية A549 لمدة 30 دقيقة قبل معالجة سلالة خلية مرشدة Jurkat-Dual - تم تضمين جسم مضاد لعينة مقارنة من النوع المتماثل كعينة مقارنة سالبة. تبين البيانات (الشكل 8أ) أنه يتم تثبيط نشاط المادة الطافية الخلوية الورمية المعالجة بـ NG-641 في اختبار خلايا مرشدة Jurkat Dual وذلك بواسطة الجسم المضاد لـ IFN وليس العينة المقارنة من النوع المتماثل، وبالتالي يشارك فيها IFN. تم استخدام نظام اختبار مرشد مختلف لتقييم وظيفية الجينات المتحورة للكيموكين CXCL9 وCXL10 في NG-641. واستخدم هذا الاختبار سلالة خلوية مرشدة -أرستين من نوع PathHunter التي تعبر عن CXCR3، المستقبل لكل من الكيموكينين (Eurofins). يؤدي تنشيط GPCR عقب CXCL9/10 المرتبط بـ CXCR3 المعبر عنه بواسطة هذه الخلايا إلى توظيف -أرستين إلى المستقبل الذي يُقاس باستخدام اختبار كسب إشارة بناء على استكمال تقنية شظية الإنزيم Enzyme Fragment Complementation (EFC). تم معالجة الخلايا المرشدة -أرستين CXCR3، PathHunter، باستخدام المواد الطافية من الخلايا الورمية A549 المصابة أو غير المصابة بـ 10 جسيمات لكل خلية (ppc) من EnAd أو NG-641 لمدة 3 أيام. يتناسب تركيز CXCL9/10 في المادة الطافية مع التألق في الاختبار. لبيان أن تنشيط GPCR كان يختص بـ CXCL9/10 محدد، تم حجب CXCL9 وCXCL10 عن طريق تحضين أجسام مضادة خاصة بـ CXCL9/10 معين باستخدام المواد الطافية A549 لمدة 30 دقيقة قبل معالجة خلايا -أرستين، PathHunter. تبين البيانات المبينة في الشكل 8ب زيادة نشاط الخلايا المرشدة CXCR3 في وجود المواد الطافية من الخلايا الورمية المعالجة بـ NG-641 مقارنةً بالعينات المقارنة المعالجة بـ EnAd أو غير المصابة، ويتم حجب هذه الزيادة بالأجسام المضادة إلى CXCL9/10.

وكمقياس بديل لوظيفة الكيموكين، تم استخدام قدرة الكيموكينات على التقليل المقنن للتعبير عن سطح الخلية للمرشدات النوعية الخاصة بها على أساس اختبار، بما يؤدي لتقييم مستويات مستقبل CXCR3 على الخلايا التائية البشرية المنشطة المضادة لـ CD3/CD28. كانت الخلايا الورمية A549 مصابة أو غير مصابة بجسيم فيروسي لكل خلية من إنادنوتوسيريف (EnAd) أو NG-

641 لمدة 7 أيام وتم جمع المواد الطافية. تم بعد ذلك معالجة الخلايا التائية المنشطة بالمواد الطافية لمدة 30 دقيقة وتم قياس مستويات CXCR3 عبر تعداد الخلايا بالتدفق باستخدام البيانات التي تم رسم منحنى لها كمتوسط شدة التألق (MFI). لبيان أن التقليل المقنن لـ CXCR3 عند سطح الخلية كان خاصا بـ CXCL9/10، تم حجب CXCL9 وCXCL10 بواسطة الأجسام المضادة الخاصة بـ CXCL9/10 باستخدام المواد الطافية الخلوية الورمية A549 لمدة 30 دقيقة قبل معالجة الخلايا التائية المنشطة. تبين البيانات الموضحة في الشكل 9 تقليل مقنن للتعبير عن CXCR3 في كل من الخلايا التائية CD4 وCD8 المحدث بواسطة المواد الطافية من الخلايا الورمية A549 المصابة بـ NG-641، وتم إلغاء هذا التأثير بواسطة المعالجة المسبقة بالأجسام المضادة لـ CXCL9/10.

المثال 5: النشاط الوظيفي للفيروسات التي تعبر عن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في مستنبتات الخلايا الورمية البشرية خارج الجسم الحي

تم تقطيع عينات من الأورام البشرية المقطعة حديثا، من عمليات استئصال جراحية مقررة، تم توفيرها عبر البنك الحيوي biobank بموجب الاعتماد الأخلاقي، في البداية باستخدام مقصات ومشرط ثم تم تكوين معلقات خلوية فردية باستخدام وسيلة تفريق نسيج GentleMACs (Miltenyi Biotec). تم اكتشاف أن المستحضرات الخلوية غير المنفصلة تشتمل على خلايا ورمية، خلايا ورمية أولية وخلايا مناعية مختلفة، بما في ذلك الخلايا التائية، وتم استخدامها لتقييم قدرة الفيروسات على إصابة الخلايا الورمية الأولية، إنتاج الجينات المتحورة المشفرة الخاصة بها، وتنشيط الورم المتغلغل للخلايا التائية الموجودة أيضا في المستنبتات. تم إعادة تعليق الخلية في وسط المستنبت الذي يتكون من خليط من المغذي F-12 لهام Ham، مكمل GlutaMAX™ (Gibco)، 1× إنسولين-ترانسفرين-سيلينيوم-إيثانول أمين (Gibco) (ITS -X)، أمفوتريسين ب بمقدار 2.5 مجم/ملليلتر (Gibco™)، بنيسيلين بمقدار 100 وحدة/ملليلتر، ستربتوميسين 100 مجم/ملليلتر، بيروفات الصوديوم و10% من FBS، وتم توزيعها على الأطباق بمقدار حوالي 1 × 610 خلية/ملليلتر في كل من أطباق 96 عين (0.25 ملليلتر بالحجم النهائي) أو أطباق 24 عين (0.5 ملليلتر بالحجم النهائي). تم تلقيحها باستخدام EnAd، NG-615، NG-617، NG-640 أو NG-641 عند 1000 جسيم لكل خلية، أو تركها بدون معالجة (UIC). وكعينة

مقارنة موجبة لتنشيط الخلايا التائية، تم أيضا تنبيه بعض العيون باستخدام الأجسام المضادة لـ CD3 ولـ CD28، كل بمقدار 2 ميكرو جرام/ملليلتر. تم استنبات الخلايا في عيون مزدوجة لمدة 72 ساعة، ثم تم جمع المواد الطافية ومستويات السيتوكينات المختلفة المنتجة باستخدام أطقم أساسها مسبحيات متألقة متعددة السيتوكينات (LEGENDplex™) وعداد خلايا بالتدفق. تم اختبار عينات كارسينوما رئوية خلوية ثلاث صغيرة الخلايا non-small cell lung carcinoma (NSCLC)، (T016، T017، T024)، خلية كارسينوما كلوية واحدة renal cell carcinoma (RCC) وعينة نقائل كبد للقولون والمستقيم colorectal (CRC) واحدة. فيما يتعلق ببيانات التعبير عن الجين المتحور في الأشكال 4-6، تم إنتاج IFN انتقائيا في المستنبتات المعالجة باستخدام NG-615 و NG-641 (الشكل 10أ). تم الكشف بالفعل عن المركب الترابطي Flt3 (FLT3L) عقب المعالجة باستخدام NG-615 ولكن تم الكشف عن مستويات منخفضة جدا فحسب بفيروسات أخرى، وكانت هذه المستويات مشابهة لتلك المستحثة عبر تنشيط الخلايا التائية باستخدام CD3/28 تدل على أن Flt3L في المستنبتات NG-615 كان منتج الجين المتحور. وبينت نتائج السيتوكينات الأخرى أنه مع دراسة تلقيح سلالة الخلية الورمية الموصوفة في المثال 3 (الشكل 7)، فإن تلقيح NG-615 يؤدي إلى مستويات تنشيط للخلية التائية أقل كثيرا من فيروسات تشفير FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الأخرى وهي NG-617، NG-640 وفيروس آخر حامل لأربع جينات متحورة NG-641، كما هو مبين في IFN، TNF، IL-17، جرانزيم B و IL-13 في الشكل 10ب.

تم أيضا قياس تنشيط الخلايا التائية الورمية داخلية المنشا في مستنبت الخلايا الورمية NSCLC المستاصلة بواسطة عد الخلايا بالتدفق، بما يؤدي لتقييم مستويات واسمات تنشيط الخلايا التائية CD25، CD69 و CD107a فضلا عن التعبير عن السيتوكين بين الخلايا (IFN و TNF) بواسطة كل من الخلايا التائية من نوعي CD4 و CD8 بعد 3 أيام من الاستنبات. كما هو مبين في الشكل 11أ-د، فإن EnAd له تأثير ضئيل على واسمات التنشيط أو التعبير عن السيتوكين، حيث أن جميع المعالجات NG-617، NG-640 و NG-641 أدت إلى الزيادة المقننة لكل منها مما تم قياسه لتنشيط الخلايا التائية. وتتماشى المستويات المشابهة للتنشيط الملاحظة في

الفيروسات الحاملة لـ FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مع بيانات السيتوكين الموصوفة أعلاه (الشكل 10ب).

المثال 6: في هذا المثال، تم تقييم قدرة الخلايا التائية المنشطة بـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني للحث على الموت المبرمج للخلايا الليفية الأولية المستهدفة

FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يحث على انحلال بمشاركة خلايا تائية لسلالات خلوية موجبة لـ FAP وخلايا أولية

تم استنبات NHDF (7000 خلية) استنباتًا مشتركًا مع 70000 خلية تائية في عيون لطبق به 96 عين له قاع على هيئة حرف U في وجود وسط بمفرده أو 300 نانو جرام/ملليلتر للسيطرة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. بعد 24 ساعة من الاستنبات المشترك، تم حصاد مواد طافية وتحديد السمية الخلوية بواسطة اختبار LDH وفقًا لتعليمات الشركة المصنّعة. تظهر النتائج في الشكل 15أ أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية زاد بشكل ملحوظ من تحلل خلايا NHDF.

في تجربة مشابهة، تم استنبات 7000 خلية رئوية ليفية أولية (BTC100) مع 70000 خلية تائية من نوع +CD3 مع أو بدون 300 نانو جرام/ملليلتر من عينة مقارنة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. بعد 24 ساعة من الاستنبات المشترك، تم حصاد مواد طافية وتحديد السمية الخلوية بواسطة اختبار LDH. تظهر النتائج في الشكل 15ب وج أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية زاد بشكل ملحوظ من تحلل الخلايا الليفية الرئيسية المرتبطة بسرطان بشري أولي primary human cancer associated fibroblast (CAF). يبين الشكل 16 التعبير عن FAP بواسطة سلالات الخلايا هذه وغيرها المشتقة من المريض.

تم تقييم العلاقة بين الجرعة والاستجابة لتحلل الخلايا بمشاركة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من خلال الاستنبات المشترك مع 8000 خلية من خلايا NHDF مع 40000 خلية من الخلايا التائية وتركيزات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية تتراوح من 2 × 310 إلى 2 × 10-2 نانو جرام/ملليلتر. بعد الاستنبات المشترك لمدة 24 ساعة عند 37 درجة مئوية، تم إجراء اختبار LDH على مواد طافية لتحديد السمية الخلوية للخلايا المستهدفة. تم رسم منحنى الاستجابة للجرعة

باستخدام نموذج غير خطي مناسب من أربعة متغيرات مدمج في GraphPad Prism، مما يولد قيمة EC50 لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية قدرها 3.2 نانو جرام/ملليلتر. تظهر النتائج (الشكل 17أ) علاقة تتوقف على الجرعة بين تركيز FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية والتسمم الخلوي حسب قياسها باختبار LDH (كما هو موضح في Abs490)

المثال 7: تم إنشاء FAP ثابتة تعبر عن سلالات خلوية CHO و Ad293 كوسيلة لإثبات نوعية مولد ضد FAP لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من خلال المقارنة بخلايا أبوية متحورة وراثيًا.

إنشاء سلالات خلوية متحورة وراثيًا بشكل ثابت تعبر عن FAP: تم الحصول على متوالية بروتين من جين FAP من قاعدة بيانات NCBI (المتوالية رقم: 23)، التي تم نسخها عكسيًا لتوليد متوالية مشفِّرة DNA تم تخليقها بواسطة Oxford Genetics Ltd (أوكسفورد، المملكة المتحدة). تم استنساخ جين FAP إلى ناقل pSF-Lenti بواسطة تقنيات الاستنساخ القياسية التي تنتج ناقل pSF-Lenti-FAP. تم تحوير خلايا HEK293T وراثيًا باستخدام ناقل التعبير FAP Lentivirus جنبًا إلى جنبٍ مع pSF-CMV-HIV-Gag-Pol، pSF-CMV-VSV-G، pSF-CMV-HIV-Rev. تم استخدام Lipofectamine 2000 ككاشف تحوير وراثي وأُضيف إلى الحمض النووي الناقل بنسبة من الحمض النووي إلى ليبوفيكتامين قدرها 1: 2، وتحضينها بالخلايا عند 37 درجة مئوية. تم حصاد المادة الطافية التي تحتوي على الفيروس البطيء lentivirus بعد 48 ساعة وخلطه مع بولي برين (التركيز النهائي، 8 ميكرو جرام/ملليلتر). تمت إضافة خليط الفيروس البطيء/بولي برين إلى الخلايا المستزرعة Ad293 أو CHO وتحضينها عند 37 درجة مئوية. في اليوم الرابع، تم تبادل المادة الطافية للوسط الذي يحتوي على بوروميسين (2 ميكرو جرام/ملليلتر لـ Ad293 و7.5 ميكرو جرام/ملليلتر لـ CHO). ثم تم اختيار المتغيرات الثابتة بشكل استنساخي وتم تحديد التعبير عن FAP لسلالات الخلايا الأبوية أو متغير متحور بشكل ثابت عن طريق الصبغ بـ FAP أو عينة مقارنة لجسم مضاد من النمط المتماثل وتحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق (الشكل 18أ).

يختص انحلال الخلية المستهدفة بمشاركة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بالخلايا التي تعبر عن FAP: تم استنبات خلايا CHO أو CHO-FAP (7000 خلية) بمفردها أو مع الخلايا

التائية البشرية (70000) في وجود الوسط بمفرده أو 2 ميكرو جرام/ملليلتر لعينة مقارنة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في عيون طبق 96 عين قعره على هيئة حرف U. بعد تحضين لمدة 24 ساعة، تم حصاد المواد الطافية واستهداف الخلية السمية الخلوية باختبار السمية الخلوية LDH كما هو موضح في المثال 4 (الشكل 18ب). تم تحديد تنشيط الخلايا التائية من خلال تحليل مستويات التعبير عن CD69 وCD25 عبر عدّ البيانات بالتدفق (الشكل 19). لم تُلاحظ السمية الخلوية إلا عندما تم استنبات خلايا CHO-FAP مع الخلايا التائية وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. يشير هذا إلى أن تنشيط الخلايا التائية بمشاركة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وانحلال الخلية المستهدف يختص بدرجة عالية بالخلايا التي تعبر عن FAP والمقيدة بها وليس سلالة الخلايا الأبوية السالبة لـ FAP.

المثال 8: في تجربة أخرى، تم تقييم قدرة البروتين الناتج عن عودة الاتحاد الجيني FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على تنشيط الخلايا التائية CD4 أو CD8 وقدرة كل من هذه الخلايا التائية الفرعية على حل خلايا NHDF. وقد تم استنبات لخلايا تائية من نوع +CD3 (35000 خلية) مع 7000 خلية من NHDF في وجود 300 نانو جرام/ملليلتر من عينة تحكم أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في عيون طبق مكون من 96 عين له قاع على، وتحضينها عند 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. تم حصاد الخلايا وصبغها بأجسام مضادة إلى CD4 أو CD8 وCD69 وCD25، وتم تحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. أظهرت النتائج (الشكل 20أ) أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية تسبب في زيادة في علامات تنشيط CD69 وCD25 في كل من الخلايا التائية +CD4 و+CD8.

في تجربة مماثلة، تم تقييم قدرة كل مجموعة فرعية من الخلايا التائية الفرعية CD4 وCD8على قتل الخلايا المستهدفة. تم استخلاص الخلايا التائية +CD4 من الخلايا المنقاة بـ CD3 عن طريق الانتقاء الإيجابي باستخدام طقم عزل الخلايا التائية CD4 (Miltenyi Biotec, #130-045-101)، وفقًا لبروتوكول الشركة المصنعة، مع خلايا CD8 داخل تدفق نافذ غير معزول. في عيون طبق مكون من 96 عين له قاع على شكل U، تم استنبات 7000 NHDF مع 35000 خلية تائية من +CD4 أو +CD8 مع 300 نانو جرام/ملليلتر من عينة مقارنة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وتحضينها عند 37 درجة مئوية. بعد 24 ساعة، تم حصاد مواد طافية

واستهداف الخلية السمية الخلوية باختبار السمية الخلوية LDH. تظهر النتائج (الشكل 20ب) أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية تسبب في حث كل من الخلايا التائية +CD4 و+CD8 على قتل خلايا NHDF.

المثال 9: تحديد خصائص عملية تنشيط بمشاركة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية للخلايا اللِّمفاوية المصاحبة للورم الذاتي من استسقاء خبيث أولي

لتقييم نشاط بروتينات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية باستخدام الخلايا السرطانية المشتقة من المريض، تم الحصول على عينات من سوائل الاستسقاء الخبيثة الأولية التي تحتوي على كل من الخلايا التائية +CD3 والخلايا +FAP للاختبار. تم استنبات خلايا استسقاء غير منقاة (بدون تغيير على هيئتها التي تم استلامها بها) عند 250000 خلية لكل عين من طبق مكون من 96 عين وله قاع على شكل U في 100% من سائل استسقاء أو وسط مستكمَل بمصل بشري 1% في وجود 500 نانو جرام/ملليلتر من عينة تحكم أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. عملت العيون غير المعالجة بمثابة عينات مقارنة سلبية. بعد التحضين عند 37 درجة مئوية لمدة 5 أيام، تم حصاد إجمالي عدد الخلايا وتم تحديد عدد الخلايا التائية +CD3 (الشكل 21أ) ومستويات التعبير عن CD25 على الخلايا التائية +CD3 (الشكل 21ب). تم تحديد إجمالي أرقام الخلايا لكل عين باستخدام خرز العد الدقيق. أظهرت النتائج أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية نتج عنه زيادة كبيرة في تنشيط الخلايا التائية للخلايا التائية المرتبطة بالورم من مرضى السرطان.

كامتداد للتجربة السابقة، تم حصاد عيون مكررة وعدد خلايا + FAP التي تم تحديدها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق (الشكل 21ج). تم تحديد إجمالي أرقام الخلايا لكل عين باستخدام خرز عد دقيق. أظهرت النتائج أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية نتج عنه انخفاض كبير في أعداد الخلايا الذاتية التي تعبر عن FAP في عينة الاستسقاء.

المثال 10: تم معالجة فيروسات EnAd تعبر عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ناتج عن عودة الاتحاد الجيني معالجة وراثية وتنقيتها باستخدام الطرق الموصوفة هنا.

توليد فيروس Enadenotucirev يعبر عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

إن فيروس EnAd عبارة عن فيروس غدّي من مجموعة خيمرية مؤهلة للنسخ B يحتوي على بدائل نوكليوتيد متكررة غير متماثلة من Ad3 لـ Ad11p في منطقة E2B وصيغة حذف E3 شبه كاملة وصيغة حذف E4 أصغر تم تعيينها إلى E4orf4 (انظر Kuhn et al, Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer, PLoS One, 2008 Jun 18; 3(6): e2409).

تم استخدام البلازميدة pEnAd2.4 لتوليد البلازميدات ppEnAd2.4-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، pEnAd2.4-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، pEnAd2.4-CMV-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، pEnAd2.4-SA-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (جدول 4) عن طريق الإدخال المباشر لطقم تشفير FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (المتوالية رقم: 1) أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (المتوالية رقم: 3). احتوى طقم جينات متحورة على متوالية مستقبِل تضفير قصيرة عند 5' CAGG أو معزز CMV خارجي (المتوالية رقم: 24) أو EpCAM أو FAP أو عينة مقارنة من متوالية منشط خلايا تائية ثنائية النوعية cDNA ومتوالية تذييل بعديد أدينيلات 3' (المتوالية رقم: 25). تم تأكيد بناء البلازميدة عن طريق إنشاء متواليات الحمض النووي. إن معزز CMV الخارجي نشط بشكل جوهري وبالتالي يؤدي إلى التعبير المبكر عن الجينات المتحورة. وتقوم متوالية مستقبل التضفير بتحريك التعبير تحت سيطرة المعزز المتأخر الرئيسي وتؤدي إلى التعبير المتأخر عن الجين المتحور عقب بدء نسخ الجينوم الفيروسي.

الجدول 4

رقم تعريف البلازميدة	[الحمض النووي للبلازميدة] نانو جرام/ملليلتر
منشط خلايا تائية ثنائية pEnAd2.4-CMV-FAP النوعية	١٣٢٢,٨
منشط خلايا تائية ثنائية pEnAd2.4-SA-FAP النوعية	٣٩١٨,٣
pEnAd2.4-CMV–عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية	١٨٩,١
pEnAd2.4-SA–عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية	٢٣٦,٢
منشط خلايا تائية ثنائية pEnAd2.4-CMV-FAP النوعية-RFP	١٥٩٩
منشط خلايا تائية ثنائية pEnAd2.4-SA-FAP النوعية-RFP	١٨٧٢
pEnAd2.4-CMV–عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعيةRFP-	١٢٩٤
pEnAd2.4-SA–عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعيةRFP-	٢٠٨٢

إنتاج الفيروس وتحديد خصائصه: تم إنشاء صور خطية من البلازميدات EnAd2.4-CMV- EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وpEnAd2.4-SA-EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وpEnAd2.4-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و-pEnAd2.4 SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وpEnAd2.4-CMV–عينة مقارنة منشط خلايا

تائية ثنائية النوعية وpEnAd2.4-SA-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية عن طريق اهتضام بالتقييد بواسطة الإنزيم AscI لإنتاج جينوم الفيروس الخطي. تم تنقيته الحمض النووي المهتضَم من خلال استخلاص الحمض النووي باستخدام الاستخلاص بأيزو بروبانول وترسيبه لمدة 16 ساعة، -20 درجة مئوية في 300 ميكرو لتر > 95% إيثانول من الفئة الحيوية الجزيئية و10 ميكرو لتر من أسيتات الصوديوم بتركيز 3 مولار. تم إنشاء كريات من الحمض النووي المترسب عن طريق تعريضه للطرد المركزي عند 14000 دورة في الدقيقة، 5 دقائق وتم الغسل في 500 ميكرو لتر من الإيثانول، 70%، قبل الطرد المركزي مرة أخرى، 1400 دورة في الدقيقة، 5 دقائق. تم تجفيف كرية الحمض النووي النظيفة في الهواء وإعادة تعليقها في الماء 100 ميكرو لتر. تم مزج 6.25 ميكرو جرام DNA مع كاشف تحوير وراثي من ليبوفيكتامين بمقدار 15.6 ميكرو لتر في OptiMEM وتحضينه لمدة 20 دقيقة، عند درجة حرارة الغرفة. ثم تم إضافة خليط تحوير وراثي إلى قارورة T-25 تحتوي على الخلايا Ad293 التي نمت حتى 80% من التشابك الخلوي. بعد تحضين الخلايا بخليط تحوير وراثي لمدة 4 ساعات عند 37 درجة مئوية، تمت إضافة 5% من CO2، 4 ملليلتر من الأوساط الخلوية (الجلوكوز المرتفع DMEM مع جلوتامين مستكمَل بـ 10% FBS) إلى الخلايا وتم تحضين القوارير عند 37 درجة مئوية، 5% CO2. تم رصد الخلايا Ad293 التي تم تحويرها وراثيًا كل 24 ساعة وتم استكمالها بوسط إضافي كل 48-72 ساعة. تم رصد إنتاج الفيروس من خلال ملاحظة تأثير الاعتلال الخلوي (CPE) في الطبقة الأحادية للخلايا. عند ملاحظة CPE واسعة تم حصاد الفيروس من خلايا Ad293 بواسطة ثلاث دورات لفك تجميد الخلايا. تم اختيار النسائل الفيروسية المفردة عن طريق التخفيف التسلسلي لناتج انحلال محصود وإعادة إصابة Ad293 بالفيروسات، وحصاد العيون التي تحتوي على لويحات مفردة. أُجريت الإصابة التسلسلية بالفيروسات لخلايا Ad293 بمجرد وصول الإصابة إلى درجة CPE الكاملة من أجل تضخيم مخزونات الفيروس. تم تأكيد إنتاج فيروسات قابلة للحياة أثناء التضخيم من خلال ملاحظة CPE كبيرة في الطبقة الأحادية للخلية.

تنقية الفيروس: وبمجرد تضخيم مخزونات الفيروس الفعالة، تم تنقية الفيروسات من خلال مضاعفة كثافة الطرد المركزي لكلوريد السيزيوم (النطاقات) لإنتاج مخزونات الفيروس NG-603، NG-

604، NG-605 وNG-606. تم اختبار هذه المخزونات هذه بواسطة فحص micoBCA (شركة Life Technologies)، تبعا لتعليمات الشركة المصنّعة (الجدول 5).

الجدول 5

رقم تعريف EnAd	رقم تعريف NG	رقم تعريف متوالية الفيروس الجينومي	جسيم فيروسي/ملليلتر	TCID50/ملليلتر
حينة EnAd-CMV مقارنة منشط خلايا ثانية ثانية النوعية	NG-603		١٠×١,٤٢٦,٠٧	١٠×٥,٠١
حينة مقارنة EnAd-SA منشط خلايا ثانية ثانية النوعية	NG-604		١٠×٣,٣١,٧٣	١٠×٢,٠٠

EnAd-CMV-FAP منشط خلايا ثائية ثنائية النوعية	NG-605	المتوالية رقم: ٢٦	$^{١٢}١٠\times١,٦٤٦٥٣$	$^{١١}١٠\times١,٥٨$
EnAd-SA-FAP منشط خلايا ثائية ثنائية النوعية	NG-606	المتوالية رقم: ٢٧	$^{١٢}١٠\times١,٢٨١٤٨$	$^{١١}١٠\times٣,٩٨$
عينة-EnAd-CMV مقارنة منشط خلايا ثائية ثنائية النوعية-P2A-RFP	NG-607		$^{١٢}١٠\times٥,٩٦٣$	$^{٩}١٠\times١,٢٦$
عينة مقارنة-EnAd-SA منشط خلايا ثائية ثنائية النوعية-P2A-RFP	NG-608		$^{١٢}١٠\times١,٥١٨٤٨$	$^{٩}١٠\times٦,٣١$
EnAd-CMV-FAP منشط خلايا ثائية ثنائية النوعية-P2A-RFP	NG-609		$^{١٢}١٠\times١,٥٧٥١٧$	$^{٩}١٠\times٧,٩٤$
EnAd-SA-FAP منشط خلايا ثائية ثنائية النوعية-P2A-RFP	NG-610		$^{١١}١٠\times٧,٧٤٨٨١$	$^{١١}١٠\times٥,٠١$

المثال 11: تم وصف أنشطة الفيروسات NG-601 وNG-602 وNG-603 وNG-604 وNG-605 وNG-606 باستخدام الطرق الموضحة أدناه.

توصيف نشاط تشفير EnAd المشفر لـ منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بالمقارنة مع EnAd في سلالات الكارسينوما

تم تحليل قدرة NG-601، NG-602، NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 أو EnAd للتكرار عن طريق الإصابة الفيروسية لخلايا كارسينوما الرئة A549 وتقييمها بواسطة qPCR. تم استزراع الخلايا A549 في عيون من طبق به 24 عين بكثافة خلايا قدرها 2 ×

510 خلية/عين. تم تحضين الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تُصاب الخلايا بـ 100 جسيم فيروس لكل خلية (ppc) أو تم تركها غير مصابة. تم حصد العيون بعد 24 أو 48 أو 72 ساعة من العدوى وتم تنقية الحمض النووي باستخدام مجموعة صغيرة من الحمض النووي الجينومي PureLink genomic (شركة Invitrogen) وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة. تم تحديد كمية الجينوم الفيروسي الكلي من خلال qPCR مع استخدام كل عينة مستخلصة أو معيار لمجموعة بادئ–مسبار خاص بجين EnAd محدد في خليط التفاعل المبين بالتفصيل في الجدول 6. تم إجراء qPCR وفقًا للبرنامج في الجدول 7.

الجدول 6

كاشف	الحجم/عين (ميكرو لتر)
2 × خليط مسبار qPCRBIO (PCRBiosystems)	10
بادئ أمامي EnAd	0.08
بادئ عكسي EnAd	0.08
مسبار EnAd	0.8
NFW	4.04
العينة	5
حجم العين	20

الجدول 7

عدد الدورات	درجة الحرارة (درجة مئوية)	المدة (بالثانية)
1	95	120

40	95 65-60	5 30-20

أوضح القياس الكمي لعدد الجينومات الفيروسية التي تم اكتشافها في كل خلية أن النسخ الفيروسي لـ NG-601 وNG-602 وNG-603 وNG-604 وNG-605 وNG-606 وEnAd يشبه ذلك الموجود في سلالة الخلية A549 (الشكل 22أ).

تم تقييم النشاط الحال للخلايا لـ NG-601، NG-602، NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 أو EnAd عن طريق إصابة A549 بفيروس الاختراع (الشكل 22ب). تم زرع الخلايا A549 في طبق 96 عين بكثافة 1.5 × 410 خلية/عين. تم تحضين الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تصاب الخلايا بنسبة ppc من الفيروس (التخفيف التسلسلي بنسبة 5 أضعاف، 4.1 × 10-7 إلى 5000 جسيم فيروس لكل خلية) أو تركها بدون إصابة بالفيروس. تم قياس التسمم الخلوي A549 في اليوم الخامس بواسطة اختبار تكاثر الخلايا بمحلول مائي مفرد CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, #G3582) (MTS). تم رسم منحنيات استجابة للجرعة باستخدام نموذج غير خطي مناسب من أربعة متغيرات مدمج في GraphPad Prism. أظهرت قيم IC50 المتولدة لكل فيروس أن الأنشطة الحالة للأورام لكل من NG-601 وNG-602 وNG-603 وNG-604 وNG-605 وNG-606 وEnAd كانت متماثلة لكل فيروس.

تأكيد التعبير عن الجين المتحور الوظيفي منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من NG-603، NG-604، NG-605، NG-606: لتحديد ما إذا كانت الفيروسات NG-601 وNG-602 وNG-605 وNG-606 قد أنتجت منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية وظيفية، تم إجراء اختبارات تنشيط الخلايا التائية باستخدام سلالات الخلايا CHO وCHO-EpCAM وCHO-FAP كخلايا مستهدفة. تم تكوين 10000 خلية مستهدفة مع 50000 خلية تائية +CD3 في عيون طبق مكون من 96 عين له قاع على شكل U مع مواد طافية فيروسية Ad293 مخففة 100 ضعفًا في وسط استنبات وتحضينها لمدة 24 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2. تم حصاد الخلايا التائية

وصبغها بالأجسام المضادة الخاصة بـ CD25 وCD69 وتحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. أشارت النتائج (الشكلان 23أ و23ب) إلى أن الفيروسات NG-601 وNG-602 عبرت عن الجين المتحور الوظيفي منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الذي نشط الخلايا التائية عندما تم استنباتها مع خلايا CHO-EpCAM، وعبرت NG-605 وNG-606 عن جين متحور وظيفي منشط خلايا تائية ثنائية النوعية قام بتنشيط الخلايا التائية عند استنباتها مع خلايا CHO-FAP، ولكن ليس عند استنباتها مع خلايا CHO.

القياس الكمي للتعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في سلالة خلية كارسينوما القولون: تم تقييم كمية من التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بواسطة إدخال NG-601، NG-602، NG-605، NG-606 على سلالة خلية كارسينوما القولون البشري DLD. تم استزراع الخلايا DLD في أطباق استنبات بـ 6 عيون بكثافة خلوية 1.2 × 610 خلية/عين. بعد مرور 18 ساعة، تم إصابة خلايا DLD بـ EnAd، وNG-601، وNG-602، وNG-603، وNG-604، وNG-605، وNG-606 بمعدل 100 جسيم فيروس لكل خلية. تم زراعة الخلايا لمدة 72 ساعة قبل أن يتم جمع المواد الطافية من العيون وطردها مركزيا لمدة 5 دقائق، 1200 دورة في الدقيقة لإزالة حطام الخلية. بعدها تم استخدام المواد الطافية التي تم ترويقها في اختبار قتل خلايا، مع مقارنة السمية الخلوية بمنحنى معياري ناتج باستخدام منشط خلايا تائية ثنائية النوعية متحور وراثيًا بتركيز معروف، مما يسمح بتحديد كمية منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في المواد الفيروسية الطافية.

لتحديد كمية FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية التي تم إنتاجها من NG-605 وNG-606، تم إجراء اختبار السمية الخلوية حيث تم استنبات 8000 خلية من NHDF مع 40000 خلية تائية من +CD3 ومواد فيروسية طافية DLD مخففة بمقدار 1 في 310 و1 في 410 و1 في 510. تم إنشاء منحنى قياسي عن طريق تحضين NHDF والخلايا التائية +CD3 مع FAP أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بتخفيفات تسلسلية 10 أضعاف من 3333 إلى 3.33×10-4 نانو جرام/ميكرو لتر. تم حصاد المواد الطافية بعد 24 ساعة من المعالجة وتم قياس السمية الخلوية بواسطة اختبار LDH. تم تحديد كمية منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المعبر عنها بمقارنة السمية الخلوية للمواد الفيروسية الطافية بتلك الخاصة بالمنحنى المعياري لـ منشط

خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني. أشارت النتائج (الشكل 24) إلى أن الفيروسات NG-605 وNG-606 أنتجت 9.8 و49.2 ميكرو جرام من FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لكل مليون خلية DLD، على التوالي.

المثال 12: بالإضافة إلى تشفير FAP أو عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، تحمل فيروسات NG-607 وNG-608 وNG-609 وNG-610 أيضًا جين متحور لبروتين فلوري أحمل (RFP) لتصوير الخلايا المصابة بفيروس الاختراع باستخدام طرق الفحص المجهري الفلوري (المتوالية رقم: 20 و21، الجدول 4). تم وصف الأنشطة الوظيفية لهذه الفيروسات باستخدام الطرق الموضحة أدناه.

تأكيد التعبير عن الجين المتحور من NG-607، NG-608، NG-609، NG-610

تم تقييم قدرة الفيروسات NG-607، NG-608، NG-609 وNG-610 على إنتاج الجين المتحور منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من خلال إصابة خلايا Ad293 بالفيروسات. تم وضع الخلايا في الصفيحات Ad293 في طبق به 6 عيون بمقدار 1 × 610 خلية/عين. تم تحضين الأطباق لمدة 24 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تصاب الخلايا بالفيروسات عند 100 جسيم فيروسي لكل خلية أو تركها غير مصابة. في غضون 48 ساعة بعد العدوى، تم تشعيع لويحات باستخدام مصباح الزئبق الفلوري وتصويرها (الشكل 18). أشارت النتائج إلى أن الفيروسات NG-607 وNG-608 وNG-609 وNG-610 تعبر عن الجين المتحور RFP.

المثال 13: في السلسلة التالية من التجارب، تم تقييم قدرة EnAd وFAP أو عينة مقارنة من فيروسات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية NG-603 وNG-604 وNG-605 وNG-606 وNG-607 وNG-608 وNG-609 وNG-610 على قتل الخلايا المستهدفة، بما في ذلك الخلايا الورمية والخلايا الليفية الأولية، تم تقييمها.

في الدراسة الأولى، تم تقييم قدرة EnAd على قتل خلايا DLD باستخدام تقنية xCELLigence. تم توزيع خلايا DLD في طبق E به 48 عين بمقدار 1.2 × 410 خلية/عين وتحضينها لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تصاب الخلايا بـ 100 جسيم فيروسي لكل خلية

من EnAd أو تركها غير مصابة. تم استخدام XCELLigence لقياس مدى السمية الخلوية للخلية المستهدفة كل 15 دقيقة خلال فترة تحضين استمرت 8 أيام.

في تجربة مماثلة، تم تقييم قدرة NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 وEnAd على قتل خلايا NHDF في مستنبت مشترك مع خلايا الورم SKOV والخلايا التائية +CD3 باستخدام XCELLigence. تم زرع الخلايا NHDF وخلايا SKOV في طبق E به 48 عين بمقدار 4 × 310 خلية/عين و1 × 310 خلية/عين، على التوالي. تم تحضين الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تصاب الخلايا إما بـ 100 جسيم فيروسي لكل خلية من EnAd، لـ NG-603، NG-604، NG-605 أو NG-606 أو تركها غير مصابة. بعد تحضين لمدة ساعتين، تمت إضافة 37.500 من الخلايا التائية +CD3 إلى كل عين. تم استخدام xCELLigence لقياس السمية الخلوية المستهدفة كل 15 دقيقة. تظهر النتائج (الشكل 26أ) أن فيروسات NG-605 وNG606 التي تعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، ولكن ليس فيروسات NG-603 وNG-604 التي تعبر عن EnAd أو عينة مقارنة من FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، كانت قادرة على تحفيز انحلال خلايا NHDF، بخصائص حركية تعتمد على المعزز المستخدم للتعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (أسرع مع معزز CMV).

في تجربة مماثلة، تم تقييم قدرة NG-603، NG-604، NG-605، NG-606 وEnAd على قتل خلايا NHDF، في مستنبت مشترك مع SKOV والخلايا التائية +CD3 باستخدام فحص السمية الخلوية LDH. تم زرع الخلايا NHDF وخلايا SKOV في طبق 96 عين له قعر على شكل حرف U بمقدار 8 × 310 و2 × 310 خلية/عين على التوالي، وإصابتها بـ 100 جسيم فيروسي/خلية من EnAd، من NG-603، NG-604، NG-605 أو NG- 606 أو تركها بدون إصابة. بعد تحضين لمدة ساعتين، تمت إضافة 75.000 من الخلايا التائية +CD3 لكل عين وتم تحضين الأطباق عند 37 درجة مئوية، 5% CO2. تم حصاد المواد طافية في فترة صفر و24 و48 و96 ساعة بعد المعالجة وتم قياس سمية الخلايا بواسطة اختبار السمية الخلوية LDH. تظهر النتائج (الشكل 26ب) أن فيروسات NG-605 وNG606 التي تعبر عن FAP-منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، ولكن ليس NG-603 وNG-604 التي تعبر عن EnAd أو

عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، كانت قادرة على تحفيز تحلل خلايا NHDF، بخصائص حركية تعتمد على المعزز المستخدم للتعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

وكامتداد لتجربة LDH أعلاه، تم حصاد الخلايا أيضًا عند صفر و24 و48 و96 ساعة بعد المعالجة، وصبغها بأجسام مضادة لـ CD45 وCD69 وCD25 وتم تحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. أظهرت النتائج (الشكل 27) أن فيروسات NG-605 وNG-606 التي تعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، ولكن ليس NG-603 وNG-604 التي تعبر عن EnAd أو عينة مقارنة من فيروسات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، كانت قادرة على تحفيز تنشيط الخلايا التائية، بخصائص حركية تعتمد على المعزز المستخدم للتعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

في تجربة مماثلة، تم تقييم الاعتماد على FAP للحث على تنشيط الخلايا التائية بمشاركة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. في طبق به 96 عين على شكل U، تم زرع الخلايا SKOV بمقدا 2 × 310 خلية/عين بمفردها أو في توليفة مع خلايا NHDF بمقدار 8 × 310 خلية/عين. تمت إضافة الجسيمات الفيروسية إلى كل عين عند 100 جسيم فيروسي لكل خلية، وتم تحضين الأطباق عند 37 درجة مئوية، 5% CO2. بعد ساعتين، تمت إضافة 75.000 من الخلايا التائية من نوع +CD3 بالإضافة إلى الأطباق التي تم تحضينها أيضًا. بعد 96 ساعة من الإصابة بالفيروسات، تم حصاد الخلايا وصبغها كشفا عن CD45 وCD25 وتحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق (الشكل 28أ). تثبت النتائج أن فيروسات NG-605 وNG-606 التي تعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لم نشطت الخلايا التائية في وجود خلايا NHDF الموجبة لـ FAP فحسب.

في تجربة مماثلة، تم التحقق من نوعية التعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المشتق من المعزز (CMV أو الفيروس MLP/SA) في NG-605 وNG-606 أيضًا. في طبق 96 عين على شكل U، تم زرع خلايا NHDF في خلايا 4 × 310 خلية/عين. تمت إضافة 100 جسيم فيروسي لكل خلية إلى كل عين، وتم تحضين الأطباق في 37 درجة مئوية، 5% CO2. بعد ساعتين، تمت إضافة 40000 خلية من خلايا CD3 وتحضين الأطباق أيضًا. بعد 72 ساعة من الإصابة بالفيروسات، تم حصاد المواد الطافية وقياس السمية الخلوية بواسطة اختبار السمية

الخلوية LDH. تثبت النتائج (الشكل 28ب) أن فيروسات NG-605 المشتقة من CMV، وليس NG-606 المشتقة من SA، كانت قادرة على المشاركة في قتل خلايا NHDF عند إصابة خلايا NHDF بالفيروسات فقط.

تشير النتائج إلى أن كلا من NG-605 وNG-606 كانا قادرين على تحفيز تنشيط الخلايا التائية واستهداف تحلل الخلايا، على الرغم من أن المنحنى الحركي يختلف اختلافًا طفيفًا حسب المعزز المستخدم.

تم الحصول على مقاطع فيديو متتابعة لمراقبة تحلل الخلايا المستهدفة بمشاركة الخلايا التائية عن طريق FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو EnAd أو NG-603 أو NG-605 الناتج عن إعادة الاتحاد الجيني. تم صبغ خلايا NHDF بصبغ CellTracker Orange CMTMR Dye (Life Tech, #C2927)) وتم صبغ الخلايا التائية +CD3 بصبغ CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Life Tech, #C34557) تبعا لبروتوكولات الشركة المصنّعة. تم وضع NHDF المصبوغة في طبق 24 عين بمقدار 7.5 × 310 خلية/عين في مستنبت مشترك مع 1.35 × 410 من DLD أو SKOV. تم تحضين الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2. تمت معالجة الخلايا بعد ذلك بـ 300 نانو جرام/ملليلتر من FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو إصابتها بـ 100 جسيم فيروسي لكل خلية من EnAd وNG-603 وNG-605 أو تركها دون معالجة. بعد فترة تحضين لمدة ساعتين، تمت إضافة 100000 خلية تائية من نوع +CD3 مصبوغة إلى العيون الضرورية، بالإضافة إلى 1.5 ميكرو مولار من كاشف CellEvent Caspase 3-7 (Life Tech, #C10423). تم الحصول على مقاطع الفيديو على المجهر ثلاثي العدسات العينية Nikon TE 2000-E Eclipse، مع التقاط الصور كل 15 دقيقة لمدة 96 ساعة. يتم عرض إطارات من الفيديو في الشكل 29. تظهر النتائج أن NG-605 وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني، ولكن ليس EnAd أو NG-603، كانا قادرين على تنشيط الانحلال السريع لخلايا NHDF.

في تجربة مماثلة، تم صبغ خلايا NHDF بصبغ CellTracker Green CMFDA Dye (Life Tech, #C2925) وتم صبغ الخلايا التائية +CD3 بصبغ CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Life Tech, #C34557) تبعا لبروتوكولات الشركة المصنّعة. تم وضع

NHDF المصبوغ في طبق 24 عين بمقدار 7.5 × 310 خلية/عين في مستنبت مشترك مع 1.35 × 410 من خلايا الورم DLD أو SKOV. تم تحضين الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2. تمت معالجة الخلايا بعد ذلك بـ 100 جسيم فيروسي لكل خلية من NG-607، NG-608، NG-609 أو NG-610 أو تركها دون معالجة. بعد فترة تحضين لمدة ساعتين، تمت إضافة 100000 خلية تائية من نوع +CD3 مصبوغة إلى العيون الضرورية. تم الحصول على مقاطع الفيديو على المجهر ثلاثي العدسات العينية Nikon TE 2000-E Eclipse، مع التقاط الصور كل 15 دقيقة لمدة 96 ساعة. يتم عرض إطارات من الفيديو في الشكل 30. تظهر النتائج أن جميع الفيروسات تؤدي إلى إصابة الخلايا السرطانية (RFP، ومضان أحمر، موجبة)، ولم تكن سوى NG-609 وNG-610 القادرة على تحفيز تحلل سريع لخلايا NHDF التي تم استنباتها استنباتًا مشتركًا.

المثال 14: في هذا المثال، تم تقييم تنشيط الخلايا اللِمفاوية ذاتية المنشأ المصاحبة للورم من الاستسقاء الخبيث الأولي +FAP من مرضى السرطان بواسطة EnAd، NG-603، NG-604، NG-605 وNG-606. كانت عينات المرضى التي تعتبر مناسبة لإجراء مزيد من التحليل هي تلك التي تحتوي على خلايا تائية وخلايا +FAP.

في التجربة الأولى، تم استنبات خلايا الاستسقاء غير المنقاة (وبالتالي لم يطرأ عليها أي تغيير منذ استلامها) الآتية من مريض عند 250000 خلية لكل عين من طبق مكون من 96 عين وله قاع على شكل U في 100% من سائل استسقاء. تمت إصابة الخلايا بفيروسات في 100 جسيم فيروسي لكل خلية، مع استخدام العيون غير المعالجة كعينات مقارنة سالبة. كما تم تضمين EnAd-CMV-GFP وEnAd-SA-GFP في التجربة كدليل لتحديد الإصابة بالفيروسات والتعبير الجيني للفيروسات في المرحلة المتأخرة، على التوالي، مع بيان صورة مجهرية. بعد التحضين عند 37 درجة مئوية لمدة 5 أيام، تم حصد إجمالي الخلايا وتم تحديد مستوى التعبير عن CD25 على الخلايا التائية +CD3 (الشكل 32أ). تم تحديد إجمالي أرقام الخلايا لكل عين باستخدام خرزات العد الدقيق. أظهرت النتائج أن فيروسات NG-605 وNG-606 التي تعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أدت إلى حدوث زيادات كبيرة في تنشيط الخلايا التائية للخلايا اللمفاوية المرتبطة بالورم.

كامتداد للتجربة المذكورة أعلاه، تم حصد عيون مكررة وعدد خلايا + FAP الذاتية المحددة بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. تم تحديد إجمالي أرقام الخلايا لكل عين باستخدام خرزات العد الدقيق. تظهر النتائج (الشكل 40ب) أن NG-605 وNG-606 عملا على حدوث انخفاض ملحوظ في عدد الخلايا ذاتية المنشأ التي تعبر عن FAP في عينات الاستسقاء، مما يوحي بأن بعض خلايا +FAP قد تم قتلها بواسطة الخلايا التائية المنشطة.

في تجربة ثانية، تم استنبات خلايا استسقاء غير منقاة (وبالتالي لم يحدث لها تغيير منذ استلامها) من مريض سرطان عند 250000 خلية لكل عين من طبق مكون من 96 عين وله قاع على شكل U في 100% سائل استسقاء أو وسط مستكمَل بـ 1% مصل بشري. تم إصابة الخلايا بفيروسات في 100 جسيم فيروسي لكل خلية، مع استخدام العيون غير المعالجة كعينات مقارنة سالبة. كما تم تضمين EnAd-CMV-GFP وEnAd-SA-GFP كأدلة لتحديد الإصابة والتعبير الجيني الفيروسي في المرحلة المتأخرة، على التوالي، مع صور مجهرية. بعد التحضين عند 37 درجة مئوية لمدة 5 أيام، تم حصاد إجمالي عدد الخلايا وتم تحديد عدد الخلايا التائية +CD3 (الشكل 33) ومستوى التعبير عن CD25 على الخلايا التائية +CD3 (الشكل 34). تم تحديد إجمالي عدد الخلايا لكل عين باستخدام خرزات العد الدقيق. تظهر النتائج أن NG-605 وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني من مريض، ولكن ليس NG-606، أدى إلى زيادة كبيرة في تنشيط الخلايا التائية للخلايا اللمفاوية المرتبطة بالورم في الأوساط. ولم يؤد الفيروس إلى تنشيطها في سائل الاستسقاء.

وكامتداد للتجربة المذكورة أعلاه، تم حصاد العيون التي بها نسخ وتم تحديد عدد خلايا +FAP بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق (الشكل 35). تم تحديد إجمالي أرقام الخلايا لكل عين باستخدام خرزات العد الدقيق. تظهر النتائج أن NG-605 وFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني، ولكن ليس NG-606، أدى إلى انخفاض ملحوظ في عدد الخلايا الذاتية التي تعبر عن FAP في الوسائط. ولم يؤد أي من الفيروسين إلى انخفاض في خلايا +FAP في سائل استسقاء.

المثال 15: المناقشة: تقدم الفيروسات الحالّة للورم استراتيجية جديدة مثيرة للاهتمام لدمج عدة طرق علاجية في عامل تضخيم ذاتي، مفرد مستهدف (Keller & Bell, 2016; Seymour &

(Fisher, 2016. وبينما يتم تكرارها انتقائيًا داخل الخلايا السرطانية وانتشارها من خلية إلى أخرى، يُعتقد أن بعض الفيروسات الحالّة للورم تشارك في موت الخلايا عن طريق مسارات غير معززة للموت (Ingemarsdotter et al, 2010; Li et al, 2013)، كجزء من العملية التي تسمح لجسيمات الفيروس بالهروب من الخلايا التي تحتضر. بشكل محدد، تقضي EnAd على الخلايا بواسطة عملية معززة للالتهاب تُعرف باسم موت الخلية الورامية أو الإقفارية (Dyer, 2017). تتسبب تلك الآلية غير المعززة للموت في إطلاق العديد من المكونات الخلوية المعززة للالتهابات، وعلى سبيل المثال ATP، HMGB1 والتعرض إلى كارليتيلوكين (المعروفة بأنها الأنماط الجزيئية المرتبطة بالضرر، DAMPs)، (Weerasinghe & Buja, 2012)، ومن المرجح أن تكون متمركزة على قدرة الفيروس على تعزيز استجابة فعالة مناعية مضادة للسرطان. وبالرغم من ذلك، بالإضافة إلى كون المتواليات من التحلل المباشر، فإن الفيروسات توفر القدرة على تشفير والتعبير عن حيويات أخرى مضادة للسرطان، إزالة تحديات التوصيل وضمان أعلى تركيز من الانجازات الحيوية داخل البيئة المصغَّرة للورم. تقوم Imlygic بتشفير GM-CSF، ولكن تكون احتمالية تهيئة الفيروسات ليس لها حدود فعليًا، ويوفر العديد من الفرص المثيرة تصميم استراتيجيات علاجية متعددة الصور مع الأثار المضادة للفيروس المضافة أو المؤازرة (de Gruijl et al, 2015; Hermiston & Kuhn, 2002).

يوفر تشفير منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية داخل الفيروسات الحالة للورم وسيلة قوية لتنشيط ورم الخلايا اللِّمفاوية للارتشاح الورمي لتصبح سامة خلويًا أو تحلل الخلايا المستهدفة الموجبة لمولد الضد، توفير وسيلة علاجية منفصلة تماما عن آثار التحلل الفيروسي المباشر. في هذه الدراسة، أوضحنا أن السمية الخلوية المستهدفة بواسطة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية تكون نوعية تجاه مولد الضد بالكامل، ويمكن أن تشارك فيها خلايا تائية CD4 و CD8 (Brischwein et al, 2006) ويمكن أن يتم دمجها في الفيروس الغدّي الحال للورم والتعبير عنها فقط في الخلايا التي تسمح باستنساخ الفيروس. بالإضافة إلى ذلك، تُظهر الدراسة الحالية، لأول مرة، أنه يمكن تنشيط الخلايا التائية داخلية المنشأ داخل التحليلات السرطانية السائلة بواسطة منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية ومنشطات خلايا تائية ثنائية النوعية المشفرة بالفيروس ويمكنها القضاء على الخلايا الورمية داخلية المنشأ دون أي تنبيه إضافي أو انعكاس لتثبيط المناعة. بشكل هام،

يمكن أن يحدث ذلك حتى في السوائل الأساسية التي تشتمل على البيئة المصغرة من استسقاء بريتوني أو الارتشاح البلوري، كبديل للبيئة المصغرة المثبطة للمناعة للأورام الصلبة.

تقوم تهيئة الفيروسات الحالة للورم للتعبير عن منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية بدمج آليتين علاجيتين مميزتين إلى حد ما، مع تقديم الموت الحالّ للخلايا الورمية التي تسمح بالإصابة بالفيروس، ويستهدف الأخير السمية الخلوية للخلايا التائية عن طريق مولد ضد معين، مختار. يوفر ذلك مرونة كبيرة في تصميم طريقة علاجية، ربما باستخدام منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية لتوصيل السمية الخلوية إلى الخلايا المرتبطة بالورم التي تقاوم القضاء عليها نسبيًا بواسطة الفيروس مباشرةً. على سبيل المثال، في حين أننا قمنا بتجسيد التكنولوجيا هنا باستخدام منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الذي يتعرف على مولد ضد مرتبط بالورم السرطاني (EpCAM)، فإنه من الممكن أيضًا استخدام طريقة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لاستهداف السمية الخلوية إلى الخلايا الليفية الأولية المرتبطة بالورم أو خلايا أنسجة أخرى. في الواقع، حتى عندما لا تقتصر الأهداف الخاصة بالتعرف على منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على التعبير في البيئة المصغرة للورم، يُسمَح عن طريق ربط إنتاج منشط خلايا تائية ثنائية النوعية باستنساخ الفيروس بالتعبير عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ليتم تقييدها مكانيًا بالورم، مما يقلل من السموم النظامية. هذا أمر مهم، حيث أن المنشطات خلايا تائية ثنائية النوعية التي تدار عن طريق الوريد تظهر حركية دورانية قصيرة نسبيًا (Klinger et al, 2012) وغالبًا ما ترتبط بسميات كبيرة مستهدفة خارج نطاق الورم (Teachey et al, 2013).

وقد تم سابقا استكشاف إمكانية تشفير منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية داخل الفيروسات الحالة للورم باستخدام فيروس الوقس الحال للورم منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المستهدفة لـ Ephrin A2. أظهر هذا العامل أن Ephrin منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكن أن يشارك في تنشيط PBMCs والقضاء على الخلايا الورمية المستهدفة بواسطة مولد الضد في المعمل أو في جسم الكائن الحي. ومن المثير للاهتمام أنه على الرغم من أن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكنه تنشيط الخلايا التائية، إلا أنه لم يؤدي إلى تكاثر الخلايا التائية بدون إضافة IL-2 خارجية المنشأ، في حين أن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المستخدم في الدراسة الحالية أدى إلى انتشار واسع

النطاق لكل من PBMC في المعمل والخلايا اللِّمفاوية المرتبطة بالورم باستخدام عينات الخزعة السريرية خارج جسم الكائن الحي.

نحن نؤمن بأن الاختلافات الملاحظة قد تعكس تصميم منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المختلف، الفيروس الحال للورم المختلف المستخدم أو ربما يعتمد على كثافة مولد ضد مما يعطي ارتباطًا كافيًا لـ CD3 المرتبطة تشابكيًا على الخلايا التائية.

إن أحد الأهداف الرئيسية لعلاج الفيروس الحالّ بالورم هو تخليق استجابة للخلايا التائية المضادة للسرطان التي تعترف بمولدات الضد المستحدثة الخاصة بالمريض وكذلك الورم "العام" المرتبط مولدات ضد. يمكن أن تقوم الفيروسات الحالّة بذلك عن طريق تنبيع عرض مولد الضد المحسن عن طريق حلّ الخلايا الورمية في سياق DAMPs جنبًا إلى جنبٍ مع الأنماط الجزيئية المرتبطة بالممرض المتعلق بالفيروس (PAMPs). تشير الصباغة الكيميائية الهستولوجية المناعية التلطيخ المناعي الكيميائي لأورام القولون المستأصل، بعد توصيل EnAd عن طريق الوريد، إلى أن الفيروس يعزز التدفق القوي للخلايا التائية +CD8 إلى الأنسجة الورمية (Garcia-Carbonero, 2017). ومع ذلك، في حين أن تلك يمكن أن تكون طريقة قوية للغاية، إلا أن استجابات الخلية التائية الموائمة تعتمد في نهاية المطاف على التعبير عن مولدات الضد MHC من الفئة الأولى بواسطة خلايا الورم، للسماح بالتخلص المستهدف. يكون فقدان التعبير عن MHC عبارة عن إستراتيجية التهرب المناعي الموثقة جيدًا للأورام (Garrido et al, 2016).

من الجدير بالذكر أن كلتا الاستراتيجيتين الساميتين للخلايا اللتان ترتبطان مباشرةً بالفيروسات الحالّة للورم المهيأة بواسطة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية التي تعمل بشكل مستقلّ في الفئة الأولى من MHC بواسطة خلايا الورم، وبالتالي يمكن استخدامها للقضاء على الخلايا السرطانية حتى عندما فقدت خلايا الورم التعبير عن MHC.

وهكذا تظهر الدراسة الحالية أن تشفير منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية داخل EnAd يقدم استراتيجية واعدة بشكل خاص لتحقيق التعبير المستهدف في الأورام المنتشرة، مستغلًا استقرار الدم المعروف والتوافر الحيوي الجهازي للفيروس، والذي تمت دراسته الآن في العديد من التجارب السريرية في مرحلة مبكرة. وتجدر الإشارة إلى أنه في الدراسة التي يتم فيها إعطاء الفيروس في

الوريد قبل عدة أيام من استئصال سرطان القولون الابتدائي، أظهر التقييم المناعي اللاحق لأقسام الأورام أن الفيروس قد وصل إلى مناطق من خلال الأورام وأعطى إشارات هكسون قوية داخل النواة، مما يدل على العدوى الناجحة واستنساخ الفيروس بشكل انتقائي في خلايا الورم. هذا يؤكد البيانات ما قبل السريرية (Di et al, 2014; Illingworth, 2017) التي تدل على أن هذا الفيروس مستقر بنسبة 100% من دم الإنسان ويجب أن يكون قادرًا على الإصابة بالعدوى المستهدفة بالخباثة الثانوية والمنتشرة في المرضى البشر.

يمكن تشفير منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية بواسطة EnAd بدون أي خسارة من المقاومة الحالة للمرض، مما يعكس قدرة كبيرة على التحوير الجيني للفيروس. لن يؤثر وجود الجينات المعدلة على الخواص الفيزيائية الكيميائية لجسيمات الفيروس، ومن ثم يجب أن تظهر الفيروسات المعدلة نفس الحركات الدوائية السريرية تمامًا مثل العامل الأبوي، ويجب أن تكون قادرة على التعبير عن الـ منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المشفرة بشكل انتقائي داخل الأورام في جميع أنحاء الجسم. وهذا يوفر نهجًا جديدًا مثيرًا وقد يكون فعالًا للغاية للعلاج المناعي المستهدف للسرطان والذي يجب أن يكون له الأولوية الآن للتقييم السريري.

المثال 16: الكبت المناعي للخلية التائية البشرية واستهداف السمية الخلوية بواسطة سوائل الإفراز الخبيث للمريض

تمثل الإفرازات الخبيثة بيئة من التفاوت المناعي المحتمل مع الاستجابات المناعية المكبوتة الملاحظة بشكل شائع في المرضى الذين يعانون من السرطان النقيلي في مرحلة متأخرة. تم قياس كمية IL-10، التي تعتبر بمثابة سيتوكين مضاد للالتهابات، في مصل الدم العادي أو سوائل الإفراز الخبيث للمريض (A, peritoneal ascites; P, pleural effusion) باستخدام الطقم العلاجي Human IL-10 ELISA MAX (Biolegend, 430604). كانت مستويات IL-10 في الإفرازات (88.1 - 633.4 بيكو جرام/ملليلتر لتر) أكثر بكثير من تلك المقاسة في المصل الطبيعي (7.2 - 10 بيكو جرام/ملليلتر).

تم دراسة قدرة طبقات CD3/CD28 (Gibco, 11161D) على تنشيط خلايا PBMC T في وجود مصل طبيعي، استسقاء أو سائل بلوري. تمت معالجة الخلايا التائية PBMC البشرية

(100000 خلية لكل عين في لوحة 96 بشكل جيد) بطبقات CD3/CD28 (باتباع الشركات المصنعة) في مصل السائل العادي أو سائل إفراز المريض (50%). تم ترك الخلايا التائية دون معالجة في كل سائل كعينة مقارنة سالبة. بعد 24 ساعة من الاستنبات، تم حصاد الخلايا وتم بعد ذلك تحليل مستويات التعبير عن CD69 وCD25 على الخلايا التائية +CD3 عن طريق صبغ الأجسام المضادة وعد الخلايا بالتدفق الممثلة كنسبة مئوية من الخلايا الموجبة المزدوجة (خلايا +CD69+CD25). في مصل الدم العادي، أعطت خرزات مضادة لـ CD3/CD28 حوالي 60% من الخلايا التائية المزدوجة الموجبة لكل من CD25 وCD69، في حين أن وجود سائل استسقاء قد قام بتوهين تنشيط الخلية تائية في السوائل 12/6.

في تجربة مماثلة، تم معالجة 100000 خلية تائية باستخدام خرزات CD3/CD28 في وجود المصل الطبيعي، سائل الاستسقاء أو السائل البِلّوري (50%). تم إضافةجسم مضد لـ CD107a، أو جسم مضاد لعينة مقارنة من نمط متماثل مباشرةً إلى وسط الاستنبات. بعد ساعة واحدة، تم إضافة مونينسين (BD Golgistop, BD Biosciences) وفقًا لتعليمات الشركات المصنعة. بعد 5 ساعات أخرى، تم حصاد الخلايا وتحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق لتحديد التبلل. في مصل الدم العادي، أعطت الخرزات المضادة لـ CD3/CD28 ما يقرب من 22.5% من الخلايا التائية مزالة التحبيب، في حين وجود سائل استسقاء قام بتوهين تنشيط الخلايا التائية في السوائل 12/10. كان مستوى إزالة التحبيب ترابطي بشكل كبير (معامل Pearson مشترك، r= – 0.7645، p= 0.0038) بكمية IL–10 في كل سائل.

في تجربة مشابهة، تم استنبات 75000 خلية تائية بشكل مشترك مع 15000 SKOV3 وEpCAM في وجود مصل طبيعي، استسقاء أو سائل بلوري (50%). تم معالجة الخلايا التائية باستخدام عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في كل سائل كعينة مقارنة سالبة. بعد 24 ساعة من الاستنبات، تم حصاد الخلايا وتم بعد ذلك تحليل مستويات التعبير عن الخلايا التائية CD69 وCD25 على +CD3 عن طريق صبغ الجسم المضاد وعدّ الخلايا بالتدفق الممثلة كنسبة مئوية من الخلايا المزدوجة الموجبة (خلايا +CD69+CD25). في المصل العادي، أعطت EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية حوالي 67.6% من الخلايا التائية المزدوجة

الموجبة لكل من CD25 وCD69، في حين قام سائل الاستسقاء بتوهين تنشيط الخلايا التائية في 12/0 من السوائل، وتحفيز تنشيطها بشكل طفيف في السوائل 10/4.

في تجربة مماثلة، تم استنبات 75000 خلية تائية بشكل مشترك مع 15000 SKOV3 وEpCAM في وجود مصل طبيعي، استسقاء أو سائل بلوري (50%). تم معالجة الخلايا التائية باستخدام عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في كل سائل كعينة مقارنة سالبة. تم إضافة جسم مضاد لـ CD107a أو جسم مضاد لعينة مقارنة متماثلة النمط مباشرةً إلى وسط استنبات. بعد ساعة واحدة، تم إضافة مونيسين (BD Golgistop, BD Biosciences) وفقًا لتعليمات الشركات المصنعة. بعد 5 ساعات أخرى، تم حصاد الخلايا وتحليلها بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق لتحديد إزالة التحبيب). في المصل العادي أعطت خرزات EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ما يقرب من 41.4% من الخلايا التائية مزالة التحبيب، في حين أن وجود سائل الاستسقاء قام بتوهين تنشيط الخلايا التائية في السوائل 12/2.

تم تقييم قدرة EnAd-SA-EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وEnAd-SA-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لتحفيز تحليل الخلية المستهدفة المتوسطة بالخلية التائية في سوائل إفراز صفاقية إفراز باستخدام تقنية xCELLigence. تم طلاء خلايا SKOV في طبق إبسيلون المكون من 48 عين عند الخلايا 1e4/عين على التوالي. تم تحضين الأطباق لمدة 18 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% من CO2، قبل إصابة الخلايا بـ 100 جسيم فيروس لكل خلية (ppc) أو عدم إصابتها. بعد ساعتين، تمت إضافة الخلايا التائية (5: 1) في مصل عادي أو سائل إفراز المريض (النهائي، 50%). تم استخدام xCELLigence لقياس السمية الخلوية للخلية المستهدفة كل 10 دقائق. تشير النتائج إلى أن تحلل SKOV3 بمشاركة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بواسطة الخلايا التائية يكون مستقل عن السائل المستخدمة.

يتم زراعة خلايا الاستسقاء غير المنقاة (وبالتالي عدم حدوث أي تغيير لها منذ استلامها) عند 100000 خلية لكل عين لطبق به 96 عين مسطح القاع في وسط RPMI أو سائل استسقاء. تم معالجة الخلايا باستخدام EpCAM أو عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، مع استخدام العيون غير المعالجة التي تعمل كعينة مقارنة سالبة. بعد التحضين عند 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، تم حصاد الخلايا، وتم تحديد مستوى التعبير عن CD25 وCD69 على خلايا CD3.

أظهرت النتائج أن EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الذي نتج عنه زيادة كبيرة في تنشيط الخلايا التائية (CD69/CD25 المزدوجة الموجبة) من الخلايا اللِمفاوية المرتبطة بالورم، زاد بشكل طفيف بواسطة سائل الاستسقاء.

في تجربة مماثلة، يتم زراعة خلايا الاستسقاء غير المنقاة (وبالتالي عدم حدوث أي تغيير لها منذ استلامها) عند 100000 خلية لكل عين لطبق به 96 عين مسطح القاع في وسط RPMI أو سائل استسقاء. تم معالجة الخلايا باستخدام EpCAM أو عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، أو فيروسات منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني (100 جسيم فيروسي/خلية)، مع العيون غير المعالجة التي تعمل كعينة مقارنة سالبة. بعد التحضين عند 37 درجة مئوية لمدة 5 أيام، تم حصاد مجموعة الخلايا بالكامل، وعدد خلايا +CD3 ومستوى التعبير عن خلايا CD25 و CD3 المحددة. وعدد خلايا داخلية المنشأ + EpCaM المحددة بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. تم تحديد إجمالي الأعداد الخلوية لكل عين باستخدام خرزات الحساب الدقيقة. أظهرت النتائج أن EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و EnAd اللتان تعبران عن EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الي نتج عنها زيادة كبيرة في تنشيط الخلايا التائية (العدد CD3، CD25) من الخلايا اللِمفاوية المرتبطة بالورم والسمية الخلوية لخلايا +EpCAM في كل من وسط RPMI وسائل الاستسقاء.

كامتداد للتجربة المذكورة أعلاه، تم معالجة ستة عينات إفرازية إضافية من مريض (ما مجموعه 7 عينات) بشكل مماثل في سائل الاستسقاء وعدد من +CD3، التعبير عن CD25 للخلايا التائية وعدد من خلايا +EpCAM المحددة بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. تظهر النتائج أن EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و EnAd اللتان تعبران عن EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية قد نتج عنهما زيادة كبيرة في تنشيط الخلايا التائية (عدد CD3، CD25) من الخلايا اللِمفاوية المرتبطة بالأورام والسمية الخلوية لخلايا +EpCAM بتكاثر في نطاق من عينات إفراز الخزعة.

المثال 17: التنشيط بمشاركة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية للخلايا التائية وقتل خلايا +FAP بواسطة خلايا تائية من متبرعين مختلفين

في تجارب أخرى، تم استخدام الطرق الموضحة في المثال 2 لمزيد من تقييم خصائص تنشيط الخلية التائية لبروتين FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتج عن عودة الاتحاد الجيني المختبر في المستنبتات المشتركة لـ NHDF والخلايا التائية، مقارنةً بالعينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وتنشيط الخلية التائية متعددة النسائل باستخدام CD3/CD28 المضادة لـ CD3/CD28.

تم اختبار المواد الطافية التي أخذت بعد 24 ساعة من المستنبت بواسطة ELISA الخاصة بـ IFNγ (الشكل 36أ) ومصفوفة خرز السيتوكين (LEGENDplex human T helper cytokine panel, BioLegend #74001) لطبق به بروتينات السيتوكين (شكل 36ب). لم تقم العينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بتحفيز أي تغير ملحوظ في أي سيتوكين، إلا أن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أدت إلى زيادات كبيرة في جاما إنترفيرون، IL-2، TNFα، IL-17 وIL-10، بما يتفق مع المجموعات الفرعية المختلفة من الخلايا التائية التي تنبيهها، وكان إنتاج IFNγ أكبر بكثير من ذلك الذي يتم تنبيهه بواسطة مضاد CD3/CD28.

إن التنبيه باستخدام FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، ولكن ليس عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، في وجود خلايا NHDF قد قام بتحفيز إزالة التحبيب بسرعة (في غضون 6 ساعات) من الخلايا التائية، كل من المجموعات الفرعية +CD4 و+CD8، كما هو محدد بواسطة تخارج CD107a/LAMP1 على سطح الخلية التائية (كما تم تقييمه بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق)، والذي يترابط بقوة مع قدرتها على القضاء على الخلايا المستهدفة (الشكلان 36أ و36ب). تم نقل تحفيز التحبيب المذكور بواسطة FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية إلى تحلل ليفي قوي (الشكل 69ج)، وفقًا لما تم قياسه بإطلاق LDH بعد 24 ساعة من الاستنبات المشترك مع خلايا PBMC التائية (EC50 تكون حوالي 2.5 نانو جرام/ملليلتر لتر) مع تحفيز تنشيط الخلايا التائية والسمية الخلوية الملاحظة التي تستخدم 6/6 من الخلايا التائية المانحة (الشكل 69د). لم يتم تحفيز أي سمية خلوية بواسطة عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، بما يلائم الخلايا التائية التي تظل في حالة غير منشَّطَة.

المثال 18: تأثير فيروسات FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وEnAd-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على خلايا في عينات الاستسقاء الخبيث من مرضى سرطان مختلفين

كمتابعة للدراسات الموضحة في المثال رقم 16، تم الحصول على استسقاء بريتوني صفاقي رئيسي جديد من مرضى السرطان الإضافيين من أجل دراسة نشاطات فيروس EnAd FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. تم تمديد ثلاث عينات من المرضى تحتوي على خليتيّ الورم +EpCAM والخلايا الليفية الأولية +FAP خارج جسم الكائن الحي، وتم استنبات مجموعات الخلايا المختلطة (الملتصقة) مع الخلايا التائية المستخلصة من PBMC وفيروسات EnAd غير المعدلة أو فيروسات EnAd الذي يعبر عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. بعد 72 ساعة، تم حصاد إجمالي الخلايا وعدد +FAP (الشكل 38أ) وخلايا +EpCAM (الشكل 38ب) المحددة بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق. بالإضافة إلى ذلك، تم قياس حالة التنشيط للخلايا التائية (بواسطة التعبير عن CD25) (الشكل 38ج). قامت عدوى كل من EnAd-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بتحفيز تنشيط الخلية التائية واستنفاد الخلية +FAP في جميع عينات المرضى، مع عدم وجود تغير كبير في مستويات خلايا الورم +EpCAM. لم تقوم EnAd الأبوية أو فيروسات عينة المقارنة بتحفيز تنشيط الخلية التائية غير الملاحظة، باستخدام أعداد خلية +FAP التي تظل مشابهة لعينة المقارنة غير المصابة.

بشكل هام، أدى هذا الاستنفاد في الخلايا الليفية الأولية +FAP بشكل متناسق إلى انخفاض قوي في مستويات السيتوكين TGFβ المثبطة للمناعة المكتشفة في المواد الطافية (الشكل 38د).

في سلسلة ثانية من التجارب، تم تقييم إجمالي الخلايا (غير المنقاة) من خمس عينات خزعة من المريض لتقييم نشاط الخلايا التائية المرتبطة بالورم داخلي المنشأ في العينات. تم وضع الخلايا في أطباق مع 50% من سائل الاستسقاء ومعالجتها بالعينة المقارنة الناتجة عن عودة الاتحاد الجيني أو بروتينات FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، أو 100 مع سيطرة المؤتلف أو بروتينات FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، أو 100 جسم فيروسي/خلية من فيروسات EnAd أو EnAd-منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. بعد التحضين لمدة 5 أيام، تم قياس تنشيط الخلية التائية (بواسطة التعبير عن CD25) والعدد المتبقي من خلايا +FAP بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق (الشكلان 39أ وب). في جميع عينات المرضى الثلاثة، قامت FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و EnAd-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الناتجة عن عودة الإتحاد الجيني بتحفيز التنشيط القوي للخلية التائية، مع ما يصل إلى 80% تقريبًا من الخلايا التائية المستخلصة

من المريض، والتي تسببت في الاستنفاد الملحوظ للخلايا الليفية الأولية. ومن المثير للاهتمام أن EnAd-SA-FAP-منشط خلايا تائية ثنائية النوعية قامت بتحفيز التعبير عن CD25 في 3/2 من العينات، بدون تنشيط ملحوظ أو استنفاد خلية +FAP في المريض 1. قد يرجع ذلك إلى عدم وجود خلايا ورمية كافية للإصابة بالفيروس وإنتاج بروتين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (لم يتم الكشف عن أي خلية +EpCAM في هذه العينة بواسطة عدّ الخلايا بالتدفق)، بما يناسب متطلبات الخلايا الورمية للتعبير عن الجينات المتحورة وراثيًا الموجَهَة بـ MLP (SA) (هذا يفسر أيضًا نقص تنشيط الخلية التائية واستنفاد خلية +FAP بواسطة فيروس EnAd-SA-FAP-منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مع عينات استسقاء المريض استسقاء الموضحة في الأشكال 42-44). بشكل جماعي، تُظهِر البيانات أن EnAd الذي يعبر عن FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكنها، بعد الإصابة بالخلايا الورمية، أن تؤدي بشكل تكراري إلى تنشيط الخلايا التائية المرتبطة بالورم للقضاء على الخلايا الليفية الأولية داخلية المنشأ.

تم إجراء تجربة أخرى ما إذا كان من الممكن تحسين نشاط FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية عن طريق إعاقة نقطة تفتيش PD-1، باستخدام عينة خزعة من المريض تمثل الحلية التائية فيها 73.6% من PD-1 موجبة وكانت خلايا +FAP تمثل 62.9% من PDL1 الموجبة (الشكل 40أ). تم إنشاء مستنبتات مشتركة مماثلة لتلك المذكورة أعلاه في وجود أو عدم وجود الجسم المضاد IgG2b الفأري النقي المعيق لـ PDL1 البشري (BioLegend, clone 29E.2A3) بتركيز نهائي قدره 2.5 ميكرو جرام/ملليلتر لتر. بعد يومين من الاستنبات، تم حصاد إجالي الخلايا وتم قياس خلايا +FAP المتبقية وتنشيط الخلية التائية. أدى تضمين جسم الإعاقة المضاد لـ PDL1 إلى زيادة متواضعة في تحفيز CD25 (الشكل 40ب) وإنتاج IFNγ أعلى بضعفين (الشكل 40ج)، دون تغيير استنفاد خلايا +FAP (الشكل 40د) مع تحلل كامل تقريبًا في اليوم الثاني في أي وضع.

وقد وردت تقارير تفيد أن الخلايا اللِّمفاوية المرتبطة بالورم (TALs) المعزولة عن استسقاء مريض سرطان المبيض قد تضمن تعبير كبير عن PD-1 واختلال وظائف المستجيب - بما في ذلك السمية الخلوية وإنتاج IFNg. بالتوافق مع هذا، كان التعبير عن PD-1 أعلى بمقدار ضعفين على خلايا +CD3 من ستة خزعات استسقاء مريض سرطان من تلك الموجودة في خلايا الدم

الطرفية أحادية النواة (PBMCs) من ثلاثة مانحين أصحاء (الشكل 41أ). لتقييم وظائف الخلايا التائية داخل عينات خزعة السرطان هذه، تم الاستنبات المشترك لخلايا NHDF وخلايا الاستسقاء أو خلايا PBMC غير المنقاة (النسبة المئوية من خلايا +CD3 لكل عينة يتم توضيحها في الشكل 41ب) مع عينة المقارنة أو المواد الطافية المحتوية على FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، وتم حصاد المواد الطافية لمدة 5 أيام بعد ذلك واختبارها لـ IFNγ بواسطة ELISA (الشكل 41ج). لم تحفيز IFNγ بواسطة عينة المقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. أنتجت ثلاثة من عينات خلية الاستسقاء IFNγ على مستوى مشابه لعينات PBMC، في حين أن العينات الثلاث الأخريات يكون لديهم استجابة مخففة لـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية. بعد ذلك، نتحقق من قدرة هذه الخلايا التائية لتحفيز التحلل بمشاركة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لخلايا NHDF. تم وضع NHDF في طبق، وتم إضافة خلايا PBMC أو خلايا الاستسقاء جنبًا إلى جنبٍ مع المواد الطافية التي تتضمن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية ويتم رصد قدرة الخلايا على البقاء حية في المستنبت في الوقت الحقيقي باستخدام نظام اختبار السمية الخلوية xCELLigence. على الرغم من التباين في إنتاج IFNγ، قامت كل عينات الاستسقاء بتحفيز السمية الخلوية بالكامل لخلايا NHDF عند إضافتها مع FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، مع معدل مماثل بشكل عام لتحلل NHDF بمشاركة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية إلى ذلك الملاحظ عندما يتأثر بواسطة PBMCs (الشكل 41د).

لمعرفة ما إذا كانت FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكنها توسط تنشيط الخلايا التائية في عينات الإفراز الخبيثة للمريض الموجود (الجميع عند 50%)، تم تنشيط الخلايا التائية لـ PBMC باستخدام العينة المقارنة أو FAP منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية في وجود خلايا NHDF، أو تنشيطها باستخدام مضاد CD3/CD28 Dynabeads، إما في 50% من مصل الإنسان العادي (NS) أو عينات إفراز صفاقي مختلفة (الخلايا-الحرة). بينما تم تنشيط 42% من الخلايا التائية في المصل الطبيعي (موجبة مزدوجة لكل من CD25 وCD69) في 24 ساعة بعد التنبيه باستخدام الخرزات المضادة لـ CD3/CD28، قامت 5/3 من سائل الاستسقاء المختبر بتوهين تنشيط الخلية التائية بشكل كبير مقارنةً بالاستجابة في NS (الشكل 42أ). ومع ذلك، عندما تم استنبات PBMCs مع NHDF وتنبيهها باستخدام FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، لم يكن

هناك أي توهين ملحوظ لتنشيط الخلية التائية في وجود أي من سوائل الإفراز (الشكل 42ب)، مما يدل على أن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكن أن تتغلب على الآليات المثبطة للمناعة لتنشيط الخلايا التائية.

المثال 19: انحلال ورمي يتدخل فيه EnAd-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و CD11b+ TAMs مسبب للاستقطاب باستثارة الخلية في نواتج استسقاء مريض إلى نمط ظاهري أكثر تنشيطًا

للتحقق عما إن كان إنتاج سيتوكينات Th1، المتضمنة IFNγ، TNFα و IL-2، بواسطة تنشيط يتدخل فيه FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لخلايا تائية، والإزالة اللاحقة للخلايا الليفية الأولية FAP+ (وارتبط الانخفاض المرتبط في TGFβ1 بإزاحات أخرى في البيئة الدقيقة الورمية من النشاط الكابت للمناعة والمعزز لنمو ورمي إزاء نشاط مضاد لورم، تم تقييم التأثير على الخلايا الملتهمة الكبيرة المرتبطة بالورم (TAMs) في عينة خلية ناتج الاستسقاء غير المنفصل. تم وضع خلايا الاستقساء للمريض غير المنقاة الإجمالية في طبق في 50% من سائل الاستسقاء ومعالجتها بعينة مقارنة حرة أو FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو مصابة بـ منشط خلايا تائية ثنائية النوعية بعينة مقارنة EnAd-SA أو فيروس EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (عند 100 جسيم فيروسي/الخلية). على التوازي، تمت معالجة بعض الخلايا بـ IFNγ لحث نمط ظاهري لخلايا نخاعية من CD11b منشطة. بعد 3 أيام من التحضين، تم أولًا قياس حالة التنشيط لخلايا تائية؛ قياس خلايا CD25+ بواسطة عد الخلايا بالتدفق وإفراز IFNγ بواسطة ELISA.

أدت المعالجة باستخدام FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية و EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية إلى ما يقارب 60% من خلايا CD3+ T تصبح CD25+ (الشكل 43أ) وكميات كبيرة من IFNγ في المواد الطافية من المستنبت (الشكل 43ب). لم تتم ملاحظة أي زيادة أعلى من الركيزة بواسطة عينة المقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو فيروس المقارنة للتعبير الوراثي عن CD25 أو IFNγ. لتقييم استقطاب TAM، تم قياس مستويات التعبير الوراثي عن CD64 و CD86 (M1 أو مرقمات ملتهمات كبيرة "منشطة") و CD206 و CD163 (M2 أو مرقمات TAM) على الخلايا CD11b+ بواسطة عد الخلايا بالتدفق (الشكل 43ج). تحث المعالجة بـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية حر أو EnAd يعبر وراثيًا عن FAP

منشط خلايا تائية ثنائية النوعية نمط ظاهري أكثر تنشيطًا، يتجلى بالزيادة الكبيرة في التعبير الوراثي عن CD64، وتناقصات قوية في CD206 و- CD163 مماثلة لتلك الملحوظة عندما تم رفع IFNγ في المستنبتات.

بينما لم تحث المعالجة بـ FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية حر أو فيروس مقارنة تغير واضح في CD86 أعلى الركيزة في هذه التجربة، حث EnAd الذي يعبر عنFAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية زيادة كبيرة في التعبير الوراثي عن CD86، بما يشير إلى أن الإصابة بفيروس EnAd ونشاط FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكن أن يتآزرا لتنشيط الخلايا النخاعية الأولية داخل بيئة دقيقة ورمية كابحة مثل عينات سائل الاستسقاء الخبيث المختبرة في هذا الطلب. في هذه الدراسة، حثت المعالجة بـ IFNγ زيادة متوسطة في CD86، بما يشير إلى أن الزيادة الكبيرة في CD86 الملحوظة بواسطة EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية يمكن أن تكون من خلال آلية مستقلة عن IFNγ.

المثال 20: ينشط EnAd-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية من الخلايا اللمفاوية الارتشاحية للورم ويستحث السمية الخلوية في خزعات ورمية بالبروستاتا صلبة خارج الجسم الحي

توفر مستنبتات تضفير نسيجية إحدى النماذج السريرية الأولية الأكثر واقعية للأنسجة المختلفة، الأعضاء والأورام. لتقييم نشاط الفيروسات التي تعبر عن FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في هذا الإعداد المتعلق سريريًا المرتفع، تمت دراسة خزعات الثقب المقترنة العديدة لنسيج البروستاتا الخبيث والحميد من بروستاتا بشرية مستأصلة. في الفحص الأولي، تم بشكل قابل لإعادة الإنتاج توضيح نسيج البروستاتا ليكون بها حلقات دائرية من الخلايا الورمية +EpCAM (الشكل 44أ) مشتتة بينيًا بين المناطق الكبيرة للخلايا السدوية المحتوية على خلايا CD8 T المشتتة (الشكل 44ب). وجد صبغ FAP على الخلايا الليفية الأولية المجاورة للمناطق الورمية (الشكل 44ج).

تم تقطيع القلوب بواسطة جهاز تقطيع هزاز إلى سمك 300 ميكرو متر ومستنبتات شرائحية ثابتة في وجود الفيروس (1.5e9 جسيم فيروسي/تضفير)، أو تركها غير مصابة. بعد 7 أيام، تم تثبيت الشرائح، تضمينه بالبارافين، تجزئته إلى أجزاء وتم تقييم حالة تنشيط الخلية التائية بواسطة كيمياء

نسيجية مناعية (IHC) بواسطة الصبغ للتعبير الوراثي عن CD25 (الشكل 44د). أظهرت العينات فقط التي تتلقى EnAd-CMV-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية أو EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية تنشيط لخلايا تائية ارتشاحية لورم، يتجلى بواسطة صبغ CD25 القوي. لم يكن لأي من العينات غير المعالجة أو عينات المقارنة التي تمت معالجتها بالفيروس خلايا إيجابية لـ CD25 يمكن الكشف عنها. تم اختبار المواد الطافية من هذه المستنبتات المأخوذة بعد 4 و7 أيام من الإصابة بالفيروس من حيث IFNγ وIL-2 بواسطة ELISA، مع زيادات في IFNγ مكتشفة من المستنبتات الشرائحية من البروستاتا الخبيثة، لكن غير الحميدة، المصابة بعدوى بأي من فيروس FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (الشكل 44هـ) وIL-2 المكتشف في المستنبتات ذات فيروس EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (الشكل 44و). حثت EnAd-SA-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية كميات مرتفعة من IFNγ، حيث كانت قابلة للكشف سابقًا، مقارنة بفيروس FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المدفوع بـ CMV.

المثال 21 – فيروسات EnAd أخرى تعبر وراثيًا عن FAP منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية

تم إنشاء خمسة فيروسات (NG-611، NG-612، NG-613، NG-614، NG-617) والتي تشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية منفرد (الجدول 8).

الجدول 8

الرقم التعريفي للفيروس	طقم جينات منحورة
NG-612 (المتوالية رقم: ٧٨)	SSA[1]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [5]-His[3]-PA[4]
NG-613 (المتوالية رقم: ٧٩)	SA[6]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [5]-His[3]-PA[4]
NG-614 (المتوالية رقم: ٧٣)	SA[6]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [7]-His[3]-PA[4]
NG-617 (المتوالية رقم: ٨١)	SSA[1]-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [5]-PA[4]

في كل طقم جينات متحورة، تمت مجانحة cDNA الذي يشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في الطرف 5، مع أي من متوالية مستقبلة للتضفير قصيرة (SSA، CAGG) أو متوالية مستقبلة للتضفير طويلة (SA، المتوالية رقم: 45). في الطرف 3، من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، تم تشفير متوالية بولي (A) متأخرة SV40 (PA، المتوالية رقم: 54) بشكل مسبوق بأي من علامة هيستادين (HIS) أو دون علامة. في الفيروسات NG-611، NG-612، NG-613 و NG-617 استخدام الجزء المضاد لـ CD3 من جزيء منشط خلايا تائية ثنائية النوعية صورة متغيرة من سلسلة منفردة من الجسم المضاد أحادي النسيلة CD3ε المضاد للبشر من الفأر OKT3.

إنتاج الفيروس : تم استخدام البلازميدة pEnAd2.4 لتوليد البلازميدات pNG-611، pNG-612، pNG-613، pNG-614 و pNG-617 بواسطة الإدخال المباشر لطقم جينات متحورة متخلقة (المتوالية رقم: 70-74، كل على حدة). طقم الجينات المتحورة pNG-612، pNG-613 و pNG-617 يشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مستهدف لـ FAP بالمتوالية رقم: 75 وطقم جينات متحورة pNG-614 يشفر منشط خلايا تائية ثنائية النوعية مستهدف لـ FAP بالمتوالية رقم: 76. يتم توضيح الأشكال التخطيطية لأطقم الجينات المتحورة في الشكل 45أ إلى ج. تم التأكيد على إنشاء DNA البلازميدة بواسطة تحليل التقييد وعمل متواليات DNA.

تم تحويل البلازميدات، pNG-611، pNG-612، pNG-613، pNG-614 و pNG-617، للصورة الخطية بواسطة اهتضام تقييدي بإنزيم AscI لإنتاج الجينومات الفيروسية. تم تضخيم الفيروسات وتنقيتها وفقًا للطرق الواردة بالتفصيل أدناه.

تمت تنقية DNA مهتضم بواسطة الاستخلاص باستخدام الفينول/الكلوروفورم وترسيبها لمدة 16 ساعة، -20 درجة مئوية في 300 ميكرو لتر >95% من إيثانول من الفئة الحيوية الجزيئية و10 ميكرو لتر من 3 مولار من أسيتات الصوديوم. تم تحويل DNA المترسب لشكل كروي بواسطة الطرد المركزي في 14000 دورة بالدقيقة، 5 دقائق وتم غسلها في 500 ميكرو لتر 70% من الإيثانول، قبل الطرد المركزي مرة أخرى، 14000 دورة بالدقيقة، 5 دقائق. تم التجفيف بالهواء لكرية DNA النظيفة، إعادة تعليقها في 500 ميكرو لتر OptiMEM تحتوي على 15 ميكرو لتر من مادة كاشفة من نقل الإصابة بعدوى ليبوفكتامين وتحضينها لمدة 30 دقيقة، RT. ثم تمت إضافة خليط نقل الإصابة بالفيروس بالتالي بالتقطير إلى وعاء T-25 يحتوي على خلايا 293

نامية إلى 70% من التشابك. بعد التحضين للخلايا مع خليط نقل إصابة بفيروس لمدة 2 ساعة في 37 درجة مئوية، تمت إضافة 5% CO2 4 ملليلتر من أوساط الخلية (جلوكوز مرتفع DMEM بجلوتامين مكمل بـ 2% FBS) إلى الخلايا وتمت تحضين القوارير في 37 درجة مئوية، 5% CO2.

تمت مراقبة خلايا 293 المصابة بالفيروس كل 24 ساعة وتم إكمالها بأوساط إضافية كل 48-72 ساعة. تمت مراقبة إنتاج الفيروس بواسطة ملاحظة التأثير الكبير الممرض للخلية (CPE) في الطبقة المنفردة من الخلية. بمجرد أن لوحظ CPE مكثف تم تجميع الفيروس من خلايا 293 بواسطة ثلاثة من دورات التجميد والإذابة. تم استخدام الفيروسات التي تم تجميعها لإعادة الإصابة بفيروس لخلايا 293 من أجل تضخيم مخزونات الفيروس. تم التأكيد على الإنتاج الفيروسي الحيوي أثناء التضخيم بواسطة ملاحظة CPE كبير في الطبقة الأحادية للخلية. بمجرد أن تمت ملاحظةCPE تم تجميع الفيروس من الخلايا 293 بواسطة ثلاثة دورات من التجميد والإذابة. تم استخدام المخزونات المكبرة من الفيروسات لتضخيم إضافي قبل أن تتم تنقية الفيروسات بواسطة تكوين نطاقات من كلوريد السيزيزم المشتركة لإنتاج مخزونات الفيروس.

النشاط الفيروسي الذي تم تقييمه بواسطة qPCR: تم استخدام الخلايا A549، إما المصابة بالفيروس لمدة 72 ساعة بـ 1 جسيم فيروسي لكل خلية من NG-611، NG-612، NG-617، enadenotucirev أو تركها غير مصابة بالفيروس لتحديد كمي لـ DNA فيروسي بواسطة qPCR. تم تجميع المواد الطافية من الخلايا وتصفيتها بواسطة الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 دورة بالدقيقة. تم استخلاص DNA من 45 ميكرو لتر من عينة السائل الطافي باستخدام طقم Qiagen DNeasy، وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة. تم كذلك تحضير منحنى قياسي باستخدام جسيمات فيروس enadenotucirev (2.5e5-2.5e10 جسيم فيروسي) واستخلاصها باستخدام طقم DNeasy. تم تحليل كل عينة مستخلصة أو معيار مستخلص بواسطة qPCR باستخدام ضبط بادئ ومسبار نوعي لجين فيروس إلى E3 الجين المبكر.

أوضح التحديد الكمي لعدد الجينومات الفيروسية المكتشفة لكل خلية أن NG-611، NG-612، وNG-617 أظهرت نسخ جينومي كبير في سلالات الخلايا A549 (الشكل 45د).

شابه ذلك جميع الفيروسات المختبرة المضمنة الفيروس الأبوي enadenotucirev، بما يشير إلى تضمين الجين الناقل منشط خلايا تائية ثنائية النوعية لا يؤثر في نشاط نسخي للفيروس. لم يتم الكشف عن أي من الجينومات الفيروسية في الخلايا غير المصابة بالفيروس (بيانات غير موضحة).

تنشيط الخلية التائية وإزالة التحبب منها والذي تتدخل فيه الفيروسات التي تعبر عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية: إصابة خلية ورم سرطاني بالفيروس: تمت زراعة خلايا A549 في أطباق من 24 عين بكثافة 2.5e5 من خلايا/عين. تمت تحضين الأطباق لمدة 4 ساعات، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تتم إصابة الخلايا بالفيروس بمقدار 1 جسيم فيروسي لكل خلية من NG-611، NG-612، enadenotucirev أو تم تركها غير مصابة بالفيروس. في 24، 48 أو 72 ساعة بعد نقل الإصابة بالفيروس تم تجميع المواد الطافية من الخلايا، تصفيتها بواسطة الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 دورة بالدقيقة والتجميد الإطباقي.

اختبار الخلية التائية : تمت زراعة سلالات الخلايا الليفية الأورمية من الرئة MRC-5 التي تعبر عن FAP، أو خلايا الورم السرطاني من المبيض التي تعبر عن EpCam، SKOV3 في أطباق من 48 عين بكثافة من 5.7e4 خلايا/عين و1.2e5 خلايا/عين، كل على حدة. تمت تحضين الأطباق لمدة 4 ساعات، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن يتم استبدال الوسط بـ 150ميكرو لتر/عين من السائل الطافي المذاب الذي تم تجميعه من أطباق A549. ثم تمت إضافة خلايا CD3 تائية المنقاة المعزولة من مانحي PBMC من البشر إلى الأطباق للحصول على نسبة من الخلايا التائية إلى MRC-5 أو SKOV3 من 2 إلى 1. تمت تحضين المستنبتات المشتركة لمدة 16 ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2 قبل أن تم تجميع المواد الطافية الخلوية لتحليل ELISA وتجميع الخلايا التائية لتحليل عد الخلايا بالتدفق. تمت إزالة وسط المستنبت المحتوية على الخلايا غير الملتصقة من عيون المستنبت المشتركة وطردها مركزيًا (300 ضعف جرام). تمت بكل عناية إزالة السائل الطافي، تخفيفها 1 في 2 مع PBS 5% BSA وتخزينها لتحليل ELISA. تم غسل الطبقات الأولية من الخلية الملتصقة مرة باستخدام PBS وبعد ذلك فك ربطها باستخدام التربسين. تم إخماد التريبسين باستخدام 10% من وسط FBS RPMI وتمت إضافة الخلايا إلى كريات الخلايا التي تم تجميعها من المواد الطافية بالمستنبت. تم الطرد المركزي للخلايا (300 ضعف

جرام)، تم طرح السائل الطافي وغسل كرية الخلية في 200 ميكرو لتر من PBS. تم الطرد المركزي للخلايا مرة أخرى ثم إعادة تعليقها في 50 ميكرو لتر من سائل حي/ميت (Live/Dead Aqua) يحتوي على PBS (Life tech) لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة. تم غسل الخلايا مرة في محلول منظم من FACs قبل الصبغ بمجموعة من الأجسام المضادة المترافقة بشكل مباشر: مضاد CD3 مترافق مع AF700؛ مضادCD25 مترافق مع BV421؛ مضاد HLA-DR مترافق مع PE/CY5؛ مضادCD40L مترافق مع BV605؛ مضاد CD69 مترافق مع PE ومضادCD107a مترافق مع FITC. تم كذلك صبغ عينة من الخلايا من كل حالة زراعة مشتركة بأجسام مضادة للمقارنة من نظير ذي صلة. تم إجراء جميع الصبغ في محلول منظم من FACs بحجم إجمالي من 50ميكرو لتر/عين لمدة 15 دقيقة، 4 درجة مئوية. ثم تم غسل الخلايا مرتين بمحلول منظم من FACs (200ميكرو لتر) قبل إعادة التعليق في 200 ميكرو لتر من محلول منظم من FACs والتحليل بواسطة عد الخلايا بالتدفق (Attune).

زيادة متحكم فيها لمرقمات تنشيط الخلية التائية: تم تقييم تحليل عد الخلايا بالتدفق لتنشيط خلية تائية بواسطة التعبير الوراثي عن مرقمات تنشيط الخلية التائية وهي CD25، CD69، HLA-DR وCD40L أو مرقم منع تحبب الخلية التائية، CD107a على خلايا منفردة، حية. أظهرت هذه البيانات أنه عند الزراعة المشتركة مع خلايا EpCam+ SKOV3 تزايد عدد الخلايا التائية التي تعبر عن CD25، CD69، HLA-DR، CD40L أو CD107a بخلية السطح بشكل كبير عندما تمت إضافة المواد الطافية من NG-611 إلى الخلايا مقارنة بالمواد الطافية من NG-612، enadenotucirev أو العينات الضابطة غير المعالجة (الشكل 47). لجميع المرقمات المذكورة تمت استثارة مقدار قليل من تنشيط الخلية التائية بواسطة المواد الطافية من خلايا A549 المصابة بالفيروس لمدة 24 ساعة مع ذلك، بمقدار 48 ساعة بعد الإصابة بالفيروس، أثارت المواد الطافية تنشيط خلية تائية بشكل كبير عبر جميع المرقمات. كانت تلك هي الحالة في 72ساعة بعد الإصابة بالفيروس.

عند الزراعة المشتركة مع خلايا FAP+ MRC-5 تزايد عدد الخلايا التائية التي تعبر عن CD25، CD69، HLA-DR، CD40L أو CD107a بخلية السطح بشكل كبير عندما تمت إضافة سوائل طافية من NG-612 إلى الخلايا مقارنة بالمواد الطافية من NG-611،

enadenotucirev أو العينات الضابطة غير المعالجة (الشكل 48). يمكن كذلك أن تتم ملاحظة تنشيط خلية تائية ما مع فيروس NG-611، والذي كان على الأرجح نتيجة التعبير الوراثي المنخفض لكن القابل للكشف عن EpCam (حوالي 5%) على سلالات خلايا MRC-5 التي تربط EpCAM منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الذي تم التعبير عنه بواسطة فيروس NG-611 (الشكل 49). لجميع المرقمات المذكورة، تمت استثارة مقدار قليل من تنشيط الخلية التائية بواسطة المواد الطافية من خلايا A549 المصابة بالفيروس لمدة 24 ساعة مع ذلك، بمقدار 48 ساعة بعد نقل الإصابة بالفيروس، أثارت المواد الطافية تنشيط خلية تائية بشكل كبير عبر جميع المرقمات. تمت كذلك زيادة مرقمات CD25 و CD69 بشكل متحكم فيه عقب التحضين مع المواد الطافية التي تم تجميعها 72 ساعة بعد الإصابة بالفيروس، مع ذلك، تم الكشف عن مرقمات التنشيط، HLA-DR، CD40L و CD107a في مستويات أقل مع المواد الطافية التي تم تجميعها 72 ساعة بعد الإصابة بالفيروس ثم 48 ساعة بعد الإصابة بالفيروس. يمكن أن يكون ذلك نتيجة المستويات المرتفعة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية الموجود في هذه المرحلة اللاحقة من الإصابة بالفيروس التي تؤدي إلى تنشيط خلية تائية السريع والقوي والذي يعني أن وظائف المرسل تحتاج إلى أن يتم قياسها في نقاط زمنية سابقة عن 16 ساعة بعد التحضين مع المواد الطافية.

للكشف عن التعبير الوراثي عن IFNγ، تم تخفيف المواد الطافية المزروعة بشكل مشترك في 5% من محلول منظم للاختبار BSA/PBS (في نطاق من 1: 10 إلى 1: 1000) وتم إجراء ELISA باستخدام طقم Quantikine ELISA من جاما IFN البشرية (أنظمة R&D) وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة. تم تحديد تركيز IFNγ الذي تم إفرازه بواسطة الاستقراء من المنحنى القياسي. يمكن فقط أن يتم الكشف عن التعبير الوراثي عن IFNγ في المواد الطافية من المستنبتات المشتركة باستخدام NG-611 على خلايا SKOV3 الشكل 50أ) أو NG-611، NG-612 على خلايا MRC-5 (الشكل 50ب).

المثال 22: فعالية تنشيط مناعي ومضادة للورم للفيروسات التي تعبر عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية في داخل جسم الكائن الحي

تم غرس خلايا جذعية مكونة للدم من نوع +CD34 متوافقة مع البشر من فئران NSG (من Jackson Labs) مع الخلايا الورمية لـ HCT116 تحت الجلد على كلا الخاصرتين في 18

أسبوع بعد التطعيم. بمجرد أن وصلت الأورام إلى 80-400 مم3 تم توزيع الفئران إلى مجموعات بحيث أن كل طرف معالجة كان له توزيع مكافئ لأحجام الورم، 7 فئران لكل مجموعة. تم حقن الفئران داخل الورم بأي من المحلول الملحي، enadenotucirev أو NG-611 عند 5 × 910 جسيم لكل حقن، 2 مرة حقن لكل ورم. تمت معالجة الأورام على كلا الخاصرتين. تم قياس حجم الورم 3-4 مرة لكل أسبوع وأوضحت أن المعالجة باستخدام NG-611 تسببت في ظهور استجابة مضادة للورم كبيرة حتى 20 يوم بعد الجرعات بالمقارنة مع مجموعات الـ enadenotucirev أو مجموعات المقارنة غير المعالجة (الشكل 51أ). بعد 20 يوم بعد الجرعات تمت معالجة ورم واحد من 4 من الفئران في كل مجموعة لعد الخلايا بالتدفق بينما ظلت الأورام مجمدة في الجليد الجاف.

عد الخلايا بالتدفق : تم تفكيك تراكم عينات الورم بشكل ميكانيكي فورًا عقب استئصال حجم صغير من أوساط RPMI. تم بالتالي تمرير الأورام المفككة التراكم من خلال جهاز صبغ 70 ميكرو متر من الخلية وطردها مركزيًا في 300 جرام لمدة 10 دقائق. تمت إعادة التعليق لكريات الخلايا في 100 ميكرو متر من سائل حي/ميت (Live/Dead Aqua) يحتوي على PBS (Life tech) لمدة 15 دقائق على الثلج. تم غسل الخلايا مرة في محلول منظم من FACs (BSA PBS %5) قبل الصبغ بمجموعة من الأجسام المضادة المترافقة بشكل مباشر : مضاد CD8 (RPA-T8، AF700)؛ مضاد CD4 (RPA-T4، PE)؛ مضاد CD45 (2D1، APC-Fire 750)؛ مضاد CD3 (OKT3، PerCP-Cy5.5)؛ مضاد CD25 (M-A251، PE-Dazzle 594)؛ مضاد CD69 (FN50، APC)؛ مضاد HLA-DR (L243، BV605)؛ مضاد CD107a (H4A3، FITC). تم كذلك صبغ مجموعة من معلقات الخلايا الورمية بأجسام مضادة للمقارنة مع نظير ذي صلة. تم إجراء جميع صور الصبغ في محلول منظم لـ FACs في حجم إجمالي من 50 ميكرو لتر/عين لمدة 20 دقيقة في 4 درجة مئوية. تم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام محلول منظم من FACs (200 ميكرو لتر) قبل إعادة التعليق في 200 ميكرو لتر من محلول منظم من FACs والتحليل بواسطة عد الخلايا بالتدفق (Attune). أوضح تحليل FACs أن نسبة الخلايا التائية من نوع CD8 إلى CD4 T في الورم تزايد بشكل كبير في الأورام المعالجة بـ NG-611 بالمقارنة مع العينات المعالجة بـ enadenotucirev أو عينات المقارنة غير المعالجة (الشكل 51ب).

المثال 23 – فيروسات EnAd والتي تعبر بشكل مشترك عن FAP منشطات خلايا تائية ثنائية النوعية والسيتوكينات والكيموكينات المعدلة للمناعة

تم توليد ثلاث فيروسات (NG-615، NG-640 و NG-641) والتي شفرت FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية والبروتينات المعدلة للمناعة (الجدول 9).

الجدول ٩

الرقم التعريفي للفيروس	طقم جينات متحورة
NG-615 (المتوالية رقم: ٨٢)	SSA^1-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية^2-$E2A^3$-$Flt3L^4$-$P2A^5$-$MIP1\alpha^6$-$T2A^7$-$IFN\alpha^8$-PA^9
NG-640 (المتوالية رقم: ٨٣)	SSA^1-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية^2-$P2A^5$-$CXCL10^{10}$-$T2A^7$-$CXCL9^{11}$-PA^6
NG-641 (المتوالية رقم: ٨٤)	SSA^1-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية^5-$P2A^5$-$CXCL10^{10}$-$T2A^7$-$CXCL9^{11}$-$E2A^3$-$IFN\alpha^8$-PA^6
NG-615 (المتوالية رقم: ٢٧٨)	SA^{12}-FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية^3-$E2A^3$-$Flt3L^4$-$P2A^5$-$MIP1\alpha^6$-$T2A^7$-$IFN\alpha^8$-PA^9

إنتاج الفيروس : تم استخدام البلازميدة pEnAd2.4 لتوليد البلازميدات pNG-615، pNG-616، pNG-640 و pNG-641 بواسطة الإدخال المباشر لطقم جينات متحورة متخلقة (المتوالية رقم: 93-95، كل على حدة). يحتوي NG-615 و NG-616 على أربعة من الجينات المتحورة التي تشفر FAP مستهدف لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية (المتوالية رقم: 75)، Flt3L (المتوالية رقم: 96)، MIP1α المتوالية رقم: 97) و IFNα (المتوالية رقم: 98). تشفر NG-640 و NG-641 FAP مستهدف لمنشط خلايا تائية ثنائية النوعية (المتوالية رقم: 75)، CXCL9 (المتوالية رقم: 99) و CXCL10 (المتوالية رقم: 100)، يحتوي كذلك NG-641 على جين ناقل رابع يشفر IFNα (المتوالية رقم: 98). تم التأكيد على إنشاء DNA البلازميدة بواسطة تحليل التقييد وعمل متواليات من DNA.

تمت المعالجة الخطية للبلازميدات، pNG-615، pNG-616، pNG-640 و pNG-641، بواسطة اهتضام تقييدي بإنزيم AscI لإنتاج الجينومات الفيروسية. تم تضخيم الفيروسات وتنقيتها وفقًا للطرق الواردة بالتفصيل في المثال 33.

النشاط الفيروسي الذي تم تقييمه بواسطة qPCR وELISA للجين الناقل: إصابة خلية ورم سرطاني بفيروس: تم استخدام الخلايا A549 إما المصابة بالفيروس لمدة 72 ساعة بـ 1 جسيم فيروسي لكل خلية من NG-615، enadenotucirev أو تركها غير مصابة بالفيروس لتحديد كمي لـ DNA فيروسي بواسطة qPCR وتحليل التعبير الوراثي عن الجين الناقل بواسطة ELISA. تم تجميع المواد الطافية من الخلايا وتصفيتها بواسطة الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 دورة بالدقيقة. تم استخدام 45 ميكرو لتر من السائل الطافي لتحليل DNA وتم استخدام السائل الطافي المتبقي لـ ELISA.

qPCR: تم استخلاص DNA من عينة السائل الطافي باستخدام طقم Qiagen DNeasy، وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة. تم كذلك تحضير منحنى قياسي باستخدام جسيمات فيروس enadenotucirev (2.5e5-2.5e10 جسيم فيروسي) واستخلاصها باستخدام طقم DNeasy. تم تحليل كل عينة مستخلصة أو معيار مستخلص بواسطة qPCR باستخدام ضبط بادئ ومسبار نوعي لجين فيروس إلى E3 الجين المبكر. أوضح التحديد الكمي لعدد الجينومات الفيروسية المكتشفة لكل خلية أن NG-615 أظهرت نسخ جينومي كبير في سلالات خلايا A549 على مستوى مماثل لذلك الخاص بالفيروس الأبوي enadenotucirev (الشكل 52). أشارت هذه البيانات إلى أن تضمين منشط خلايا تائية ثنائية النوعية وثلاثة من الجينات الناقلة المعدلة للمناعة لا تؤثر بدرجة كبيرة في نشاط نسخي للفيروس. لم يتم الكشف عن أي من الجينومات الفيروسية في الخلايا غير المصابة بالفيروس.

اختبار ELISA: تم إجراء IFNα ELISA باستخدام طقم ألفا IFN بشري من نوع Verikine (تجربة فحص المقايسة PbI)، تم إجراء MIP1α ELISA باستخدام طقم ELISA لحجز صحي لـ CCL3 البشري (أنظمة R & D) وتم إجراء Flt3L ELISA باستخدام طقم ELISA البشري Flt3L (Abcam). تم إجراء جميع الاختبارات وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة.

تم تحديد تركيزات IFNα، MIPα أو Flt3L التي تم إفرازها بواسطة الاستقراء من المنحنيات القياسية. يمكن أن يتم الكشف عن التعبير الوراثي عن IFNα، MIP1α وFlt3L في السائل الطافي من NG-615 لكن ليس مع enadenotucirev أو خلايا المقارنة غير المعالجة (الشكل 53).

تنشيط الخلية التائية وإزالة التحبب منها والذي تتدخل فيه الفيروسات التي تعبر عن منشط خلايا تائية ثنائية النوعية.

إصابة خلية ورم سرطاني بفيروس: تمت زراعة خلايا A549 في أطباق من 24 عين بكثافة 2.5e5 من خلايا/عين. تمت تحضين الأطباق لمدة 4 ساعات، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن تتم إصابة الخلايا بالفيروس بمقدار 1 جسيم فيروسي لكل خلية من NG-612، NG-615، enadenotucirev أو تم تركها غير مصابة بالفيروس. في 24، 48 أو 72 ساعة بعد نقل الإصابة بالفيروس تم تجميع المواد الطافية من الخلايا، تصفيتها بواسطة الطرد المركزي لمدة 5 دقائق، 1200 دورة بالدقيقة والتجميد الإطباقي.

اختبار الخلية التائية: تمت زراعة سلالات الخلايا الليفية الأورمية من الرئة MRC-5 التي تعبر عن FAP في أطباق من 48 عين بكثافة من 5.7e4 خلايا/عين. تمت تحضين الأطباق لمدة 4 ساعات، 37 درجة مئوية، 5% CO2، قبل أن يتم استبدال الوسط بـ 150ميكرو لتر/عين من السائل الطافي المذاب الذي تم تجميعه من أطباق A549. ثم تمت إضافة خلايا CD3 تائية المنقاة المعزولة من مانحي PBMC من البشر إلى الأطباق للحصول على نسبة من الخلايا التائية إلى MRC-5 من 2 إلى 1. تمت تحضين المستنبتات المشتركة لمدة 16ساعة، 37 درجة مئوية، 5% CO2 قبل أن تم تجميع المواد الطافية الخلوية لتحليل ELISA وخلايا تائية التي تم تجميعها من تحليل عد الخلايا بالتدفق وفقًا للطرق التي وردت بالتفصيل في المثال 29.

زيادة متحكم فيها لمرقمات تنشيط الخلية التائية: تم تقييم تحليل عد الخلايا بالتدفق لتنشيط خلية تائية بواسطة التعبير الوراثي عن مرقمات تنشيط الخلية التائية CD25، CD69، HLA-DR وCD40L أو مرقم منع تحبب الخلية التائية، CD107a الخلايا المنفردة، +CD3، الحية. أظهرت هذه البيانات أنه عند الزراعة المشتركة مع خلايا MRC-5 +FAP تزايد عدد الخلايا

التائية التي تعبر عن CD25، CD69، HLA-DR، CD40L أو CD107a بشكل كبير عندما تمت إضافة المواد الطافية من NG-615 أو 612 إلى الخلايا بالمقارنة مع المواد الطافية من enadenotucirev أو المواد الطافية من عينة المقارنة غير المعالجة (الشكل 54).

إفراز للسيتوكين الاستثاري IFNγ: للكشف عن التعبير الوراثي عن IFNγ، تم تخفيف المواد الطافية بالمستنبتات المشتركة إلى 5% من محلول منظم لاختبار BSA/PBS (في نطاق من 1: 10 إلى 1: 1000) وتم إجراء ELISA باستخدام طقم Quantikine ELISA من جاما IFN البشرية (أنظمة R&D) وفقًا لبروتوكول الشركة المصنّعة. تم تحديد تركيز IFNγ الذي تم إفرازه بواسطة استقراء من المنحنى القياسي. يمكن فقط أن يتم الكشف عن التعبير الوراثي عن IFNγ في المواد الطافية من المستنبتات المشتركة باستخدام المواد الطافية من NG-612 أو من A549 المصابة بالفيروس من NG-615 (الشكل 55).

طقم الجينات المتحورة للمتوالية رقم 95 لـ NG-641

CAGGCCCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCTTGTTCCTGGTCGCAAC

TGCTACCGGAGTCCATTCGGACATCGTCATGACCCAAAGCCCTGACTC

GCTCGCTGTGTCACTGGGAGAGCGGGCGACTATCAACTGCAAATCATC

CCAGAGCCTGCTGTATTCACGCAATCAGAAAAACTACCTGGCCTGGTA

TCAGCAGAAGCCGGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTTCTGGGCCT

CCACCCGCGAAAGCGGCGTGCCGGACCGCTTCAGCGGAAGCGGATT

CGGAACTGACTTTACTCTGACCATTAGCTCCTTGCAGGCGGAGGACGT

GGCCGTCTACTACTGCCAGCAGTATTTCTCCTATCCGCTCACCTTTGG

GCAAGGCACCAAGGTGGAGATTAAGGGAGGGGGCGGCAGCGGGGGA

GGCGGCAGCGGCGGCGGGGGATCGCAGGTCCAGCTCGTCCAATCCG

GAGCCGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCGTCGGTCAAGGTCAGCTGCAAA

ACTTCGCGCTACACCTTCACTGAGTACACGATCCACTGGGTCCGCCAG

GCGCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGATCGGCGGGATCAACCCAAACA

ACGGAATCCCAAATTACAATCAGAAATTTAAAGGGCGGGTGACTATCA

CCGTGGATACCTCGGCCTCCACGGCGTACATGGAGCTCTCATCACTCA

GATCGGAGGACACCGCGGTCTATTACTGCGCCCGCCGCCGGATCGCT

TATGGATACGATGAAGGACATGCGATGGATTACTGGGGCCAGGGCAC

CCTCGTCACGGTGTCGTCAGGAGGCGGCGGTTCACAGGTGCAGCTGC

AGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATG

TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGG

GTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT

CCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC

ACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGC

AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATG

ATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAG

TCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGATCTGGTGGCGG

CGGATCTGATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCT

CCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAG

TTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATG

GATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAG

GGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGG

AGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACC

CATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGGAAGC

GGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGA

GAACCCTGGACCTAATCAAACTGCCATTCTGATTTGCTGCCTTATCTTT

CTGACTCTAAGTGGCATTCAAGGAGTACCTCTCTCTAGAACTGTACGCT

GTACCTGCATCAGCATTAGTAATCAACCTGTTAATCCAAGGTCTTTAGA

AAAACTTGAAATTATTCCTGCAAGCCAATTTTGTCCACGTGTTGAGATC

ATTGCTACAATGAAAAAGAAGGGTGAGAAGAGATGTCTGAATCCAGAA

TCGAAGGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTCT

AAAAGATCTCCTGGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATG

CGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTAAGAAAAGTGGTGTTCTTTT

CCTCTTGGGCATCATCTTGCTGGTTCTGATTGGAGTGCAAGGAACCCC

AGTAGTGAGAAAGGGTCGCTGTTCCTGCATCAGCACCAACCAAGGGA

CTATCCACCTACAATCCTTGAAAGACCTTAAACAATTTGCCCCAAGCCC

TTCCTGCGAGAAAATTGAAATCATTGCTACACTGAAGAATGGAGTTCAA

ACATGTCTAAACCCAGATTCAGCAGATGTGAAGGAACTGATTAAAAAGT

GGGAGAAACAGGTCAGCCAAAAGAAAAAGCAAAAGAATGGGAAAAAAC

ATCAAAAAAAGAAAGTTCTGAAAGTTCGAAAATCTCAACGTTCTCGTCA

AAAGAAGACTACAGGAAGCGGACAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAA

TTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAACCCTGGACCTGCCTTGACCTTTGCT

TTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTG

GGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTT

GATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTCTCCTGCTTGAA

GGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTT

CCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGAT

CTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGAC

CCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTG

GAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCTGAT

GAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCAC

TCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGT

CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCAACAAACTTGCAAGAA

AGTTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTAGCTTGACTGACTGAGATACAGCG

TACCTTCAGCTCACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAA

CCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGA

TGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACA

ACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGG
AGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAGTCGTCAGCT
AT

إشارة مرجعية للرسومات:

الشكل 1-2أ

د- متوالية كوزاك

هـ -مستقبِل تضفير

و- كودون البدء

ز- رابط GS

ح- كودون الإيقاف

ط- بولي (A)

ي- انتساخ الفيروس في خلايا A549

ك- الجينومات الفيروسية المكتَشَفة (لكل خلية)

ل- أيام بعد المعالجة

الشكل 2ب-ج

د- انتساخ الفيروس في خلايا MDA-MB-453

هـ- انتساخ الفيروس في خلايا RT4

و- الجينومات الفيروسية المكتَشَفة (لكل خلية)

الشكل 3أ-ب

هـ- مؤشر الخلايا

و- الزمن (بالساعة)

ز - KT50 (بالساعة)

الشكل 4 أ-ب-ج

هـ - التعبير عن الجين المتحور للسيتوكين لـ NG-615 في الرئة وخلايا الكارسينوما

هـ - FLT3L (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

و - MIP1α (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

ز - IFNα (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

ح - IFNα (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

ط - أيام بعد المعالجة

الشكل 5 أ-ب-ج

د- التعبير عن الجين المتحور للسيتوكين لـ NG-641 في الرئة وخلايا الكارسينوما

هـ - CXCL9 (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

و - CXCL10 (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

ز - IFNα (بيكو جرام / 1 × 610 خلية)

ح - أيام بعد المعالجة

الشكل 6 أ-ب

ج - نشاط IFNα (640 Abs نانو متر)

د - MIP1α الوظيفي (نانو مولار)

هـ – عينة مقارنة

الشكل 7 أ

ب – اليوم 2

ج– نشاط FAP–منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (وحدة قياس اللمعان النسبي)

الشكل 7ب–ج

ب – اليوم 3

ج – اليوم 4

د– نشاط FAP–منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (وحدة قياس اللمعان النسبي)

الشكل 8أ–ب

ج– الكثافة البصرية لقياس إفراز SEAP (620 نانو متر)

د– عينة مقارنة من نوع متماثل Ab

هـ – مضاد لـ IFNα Ab

و– التألق (وحدة قياس اللمعان النسبي)

ز –غير معالجة

ح – معالجة مضاد CXCL9/10 Ab

الشكل 9

أ – بدون معالجة

ب –معالجة مضاد CXCL9/10 Ab

ج– MFI لـ CXR3

د – خلايا تائية من نوع +CD4

هـ – خلايا تائية من نوع +CD8

الشكل 10أ

ب – نقائل كبدية CRC

ج – NG-615 لم تُختبر إلا باستخدام عينات ورم من NSCLC من نوع T016 وT017

د – بيكو جرام/ملليلتر

هـ – عين

الشكل 10ب

هـ – نقائل كبدية CRC

و – NG-615 لم تُختبر إلا باستخدام عينات ورم من NSCLC من نوع T016 وT017

ز – بيكو جرام/ملليلتر

ح – عين

ط – * = أعلى من المعيار الأعلى

ي – عينات الورم

الشكل 10ب يتبع

هـ – نقائل كبدية CRC

و – NG-615 لم تُختبر إلا باستخدام عينات ورم من NSCLC من نوع T016 وT017

ز – بيكو جرام/ملليلتر

ح – عين

ط – جرانزيم B

الشكل 12

أ – 10×هيس

الشكل 13أ–ب

ج – المعيار
(2 ميكرو جرام/ميكرو لتر)

د – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

هـ – تخفيف

و – نشاط ربط FAP
(A450)

ز – مضاد لـ FAP IgG

ح – ناقل فارغ

ط – (طبق غير مغطى)

الشكل 14 أ

ب – وسط

ج – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

د – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية + NHDF

هـ – متوسط الفلورة الهندسي لـ CD69

الشكل 14ب

ب – وسط

ج – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

د – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية + NHDF

هـ – متوسط الفلورة الهندسي لـ CD25

الشكل 14ج

هـ – وسط

و – PMA/أيونوميسين

ز – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية + NHDF

الشكل 15

د– % للسمية الخلوية

هـ – عينة مقارنة من منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

و– وسط

الشكل 16– 17أ

أ– نوع متماثل

ب–% للخلايا

ج– الخلايا التائية

د– المريض

هـ– عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

و– تركيز FAB منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [نانو جرام/ملليلتر]

الشكل 17ب-ج

أ-% للسمية الخلوية

ب- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ج- العدّ

د- اسم العينة

هـ - موجب لـ EpCAM:: تكرار الأب

و- المتوسط الهندسي:

ز- غير مصبوغة

ح- نوع متماثل

ط- موجب EpCAM

الشكل 18أ-ب

أ- العدّ

ب-اسم العينة

ج- عينة مقارنة لنوع متماثل CHO

د-% للسمية الخلوية

هـ - خلايا تائية

و- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 19

أ- متوسط شدة الفلورة لـ CD69

ب- متوسط شدة الفلورة لـ CD25

هـ - خلايا تائية

و- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 20

أ- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ب-% للسمية الخلوية

ج- موجب لـ CD25، (%)

د- موجب لـ CD69، (%)

هـ- مجموعة فرعية

الشكل 21

د- CD25 (النسبة المئوية للعينات الموجبة)

هـ -(إجمالي) الخلايا التائية

و- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ز- خلايا موجبة لـ FAP

ح-أوساط

الشكل 22أ-ب

ج- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

د- جسيمات فيروسية/خلية

هـ - جينومات فيروسية/ملليلتر

و- خلايا قابلة للبقاء حيةً (%)

الشكل 23أ

ب-متوسط شدة الفلورة لـ CD69

ج-متوسط شدة الفلورة لـ CD25

الشكل 24

أ- تركيز FAP منشط خلايا تائية ثنائية النوعية [نانو جرام/ملليلتر]

ب- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ج- نواتج انحلال DLD مصابة بفيروس

د- عامل تخفيف

الشكل 26أ-ب

أ- مؤشر خلايا

ب- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ج- الزمن (ساعة)

د- غير مصابة بالفيروس الغدي

الشكل 27

أ- غير مصابة بالفيروس الغدي

ب- الزمن (ساعة)

ج-% لـ +CD69

د-% لـ+CD25 +

الشكل 28أ-ب

ج-% للخلايا التائية +CD25

د- الخلايا التائية

هـ - غير مصابة بالفيروس الغدي

و- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 29

أ- غير معالجة

ب- SKOV (غير مصبوغة)

ج- NHDF (حمراء)

د- صبغة كاسباس (فيروس أخضر-100 جسيم فيروسي/خلية)

الشكل 30

أ- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ب- SKOV (غير مصبوغة)

ج- NHDF (خضراء)

د- فيروس (REPأحمر) - تعدد العدوى لـ CMV، 10 لـ SA

الشكل 31

أ - غير مصابة بالفيروس الغدي

ب- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ج- مؤشر الخلايا

د- بإضافة خلايا تائية

هـ- بدون إضافة خلايا تائية

و- ساعة

الشكل 32أ-ب

ج- موجب لـ CD69، (%)

د- خلايا موجبة لـ FAP

هـ عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

و- غير معالجة

الشكل 33

أ- الأوساط

ب- سائل استسقاء

ج- الخلايا التائية (الإجمالي)

د- غير معالجة

هـ عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 34

أ- الأوساط

ب- سائل استسقاء

ج- موجب لـ CD25، (%)

د- غير معالجة

هـ عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 35

أ- الأوساط

ب- سائل استسقاء

ج- الخلايا التائية (الإجمالي)

د- غير معالجة

هـ -عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

و- خلايا موجبة لـ FAP

الشكل 36أ-ب

ج- الزمن (بالساعة)

د-(بيكو جرام/ملليلتر)

هـ- غير معالجة

و- مضاد لـ CD3/CD28

ز- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 37أ-ب

ج- موجب لـ CD107a، (%)

د- غير معالجة

هـ- مضاد لـ CD3/CD28

و- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ز- المجموعة الفرعية للخلايا التائية

الشكل 37ج-د

أ- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ب-غير معالجة

هـ -% للسمية الخلوية

و- موجب لـ CD25، (%)

ز- تركيز منشط خلايا تائية ثنائية النوعية (نانو جرام/ملليلتر)

الشكل 38أ-ب

ج- غير معالجة

د- المريض

هـ- خلايا +FAP القابلة للبقاء حية

و- خلايا +EpCAM القابلة للبقاء حية

الشكل 39أ-ب

هـ- المريض

و-غير معالجة

ز-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ح- موجب لـ CD25، (%)

ط-% للسمية الخلوية

الشكل 40 أ-ب-ج

د- العدّ

هـ- موجب لـ PD-1

و- غير معالجة

ز- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ح- موجب لـ CD25، (%)

ط-(بيكو جرام/ملليلتر)

الشكل 40د

أ- خلايا موجبة لـ FAP

ب- غير معالجة

ج- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 41أ-ب

ج- متوسط شدة الفلورة لـ PD1

د-% لخلايا +CD3 في العينة

الشكل 41ج-د

هـ - مؤشر الخلايا

و-(بيكو جرام/ملليلتر)

ز- الزمن (بالساعة)

ح- غير معالجة

ط- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ي- خلايا استسقاء

الشكل 42 أ-ب

ج- غير معالجة

د-خرز

هـ- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

الشكل 43 أ-ب

ج- غير معالجة

د- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

هـ- CD25 على الخلايا التائية

و- موجب لـ CD25، (%)

ز-(بيكو جرام/ملليلتر)

الشكل 43ج-د

أ- غير معالجة

د- عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

هـ -متوسط شدة الفلورة لـ CD64

و- متوسط شدة الفلورة لـ CD86

ز -متوسط شدة الفلورة لـ CD206

ح -متوسط شدة الفلورة لـ CD163

الشكل 44-45

أ-بروستاتا خبيثة

ب-شرائح الأنسجة

ج-بروستاتا حميدة

د-الزمن (باليوم)

ط-(بيكو جرام/ملليلتر)

و-غير معالجة

ز-عينة مقارنة منشط خلايا تائية ثنائية النوعية

ح-كودون إيقاف

ط-كودون بدء

ي-متوالية كوزاك

ك-مستقبِل شرائح

م-رابط GS

ن-بولي (A)

الشكل 46

أ- جينومات لكل خلية

الشكل 47 أ-ب-ج-د-هـ

هـ -ساعة

و-% لخلايا تائية تعبر عن

الشكل 48أ-ب-ج-د-هـ

هـ -ساعة

و-% لخلايا تائية تعبر عن

الشكل 49

أ- نوع متماثل

الشكل 50أ-ب

أ-(نانو خلايا تائية جرام)/

ب-ساعة

الشكل 51 أ-ب

ج - حجم الورم (مم3)

د - اليوم بعد إعطاء الجرعة

هـ - نسبة CD8 إلى CD5 في نسيج الورم

الشكل 52

ك- جينومات لكل خلية

الشكل 53 أ-ب-ج

د-(نانو جرام)/خلايا تائية

الشكل 54 أ-ب-ج-د-هـ

هـ -ساعة

و-% لخلايا تائية تعبر عن

الشكل 55

ك-ساعة

ل-(نانو جرام)/خلايا تائية

عناصر الحماية

1. فيروس غدّي يشتمل على متوالية لها الصيغة (I):

$$5'ITR\text{-}B_1\text{-}B_A\text{-}B_2\text{-}B_X\text{-}B_B\text{-}B_Y\text{-}B_3\text{-}3'ITR \ (\mathbf{I})$$

حيث:

B_1 تكون عبارة عن رابطة وتشتمل على: E1A، E1B أو E1A-E1B؛

B_A تشتمل على E2B-L1-L2-L3-E2A-L4؛

B_2 تكون عبارة عن رابطة وتشتمل على: E3؛

B_X تكون عبارة عن رابطة أو متوالية حمض نووي حيث تشتمل على: موقع تقييد، واحد أو أكثر من الجينات المتحورة أو كليهما؛

B_B تشتمل على L5؛

B_Y تشتمل على طقم جينات متحورة يتضمن أربع جينات متحورة، وتشفر الجينات المذكورة FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، CXCL10، CXCL9، وIFNα؛

B_3 تكون عبارة عن رابطة وتشتمل على: E4.

2. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يشتمل FAB- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية المشفر على مضاد لـ CD3 المبين في المتوالية رقم: 5 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل مع المتوالية رقم: 5.

3. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2 حيث يشتمل FAP- منشط خلايا تائية ثنائية النوعية على مضاد لـ FAP المبين في المتوالية رقم: 9 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل مع المتوالية رقم: 9

4. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يشتمل FAB- منشط خلايا تائية ثنائية

النوعية المشفر على متوالية يتم اختيارها من المتوالية رقم: 75، 76 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% مع أي منها.

5. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يشفر طقم الجين المتحور CXCL10 المبين في المتوالية رقم: 100 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل مع المتوالية رقم: 100.

6. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يشفر طقم الجين المتحور CXCL9 المبين في المتوالية رقم: 99 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل مع المتوالية رقم: 99.

7. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يشفر طقم الجين المتحور IFNα المبين في المتوالية رقم: 98 أو متوالية متطابقة بنسبة 95% على الأقل مع المتوالية رقم: 98.

8. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية1 أو 2، حيث يتم ربط الجينات المتحورة وظيفيًا.

9. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يتم فصل الجينات المتحورة بثلاث ببتيدات شطر ذاتي مختلفة عالية الفعالية.

10. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 9، حيث يتم اختيار ببتيدات الشطر الذاتي بشكل مستقل من E2A، F2A، P2A وT2A.

11. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يكون الترتيب النسبي للجينات المتحورة من L5 إلى E4 عبارة عن FAP– منشط خلايا تائية ثنائية النوعية، CXCL10، CXCL9 وIFNα.

12. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يتضمن طقم الجينات المتحورة متوالية بولي نوكليوتيد المبين في المتوالية رقم: 95 أو بولي نوكليوتيد يشفر نفس متوالية الحمض الأميني، بشكل محدد المتوالية رقم: 95.

13. فيروس غدي لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يشتمل الفيروس الغدي المتوالية رقم: 84.

14. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يُعد الفيروس الغدي مؤهلا للانتساخ.

15. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يُعد الفيروس الغدي حالّ للورم.

16. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يشتمل الفيروس على هكسون وليفة من Ad11.

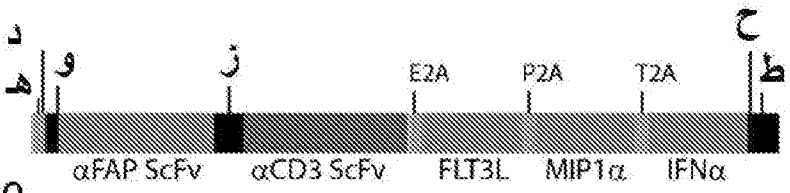
17. تركيبة صيدلية تشتمل على فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 وسواغ، مادة مخففة أو مادة حاملة.

18. فيروس غدي وفقًا لعنصر الحماية 1 أو 2، للاستخدام في علاج السرطان.

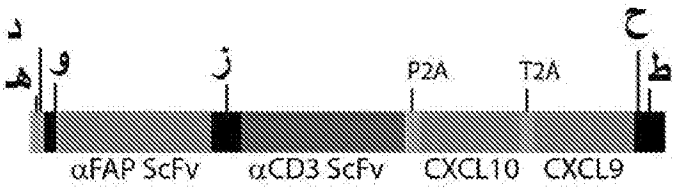
19. تركيبة صيدلية وفقًا لعنصر الحماية 17، للاستخدام في علاج السرطان.

شكل ١

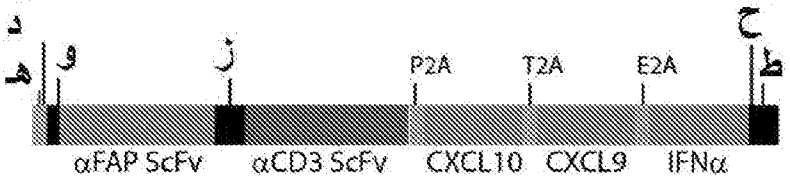
أ NG-615



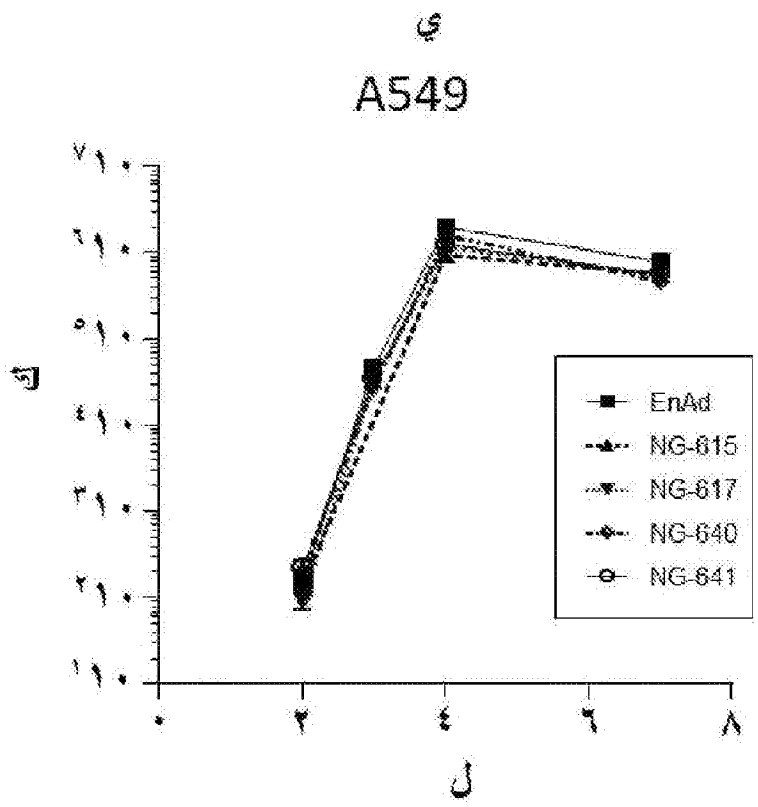
ب NG-640



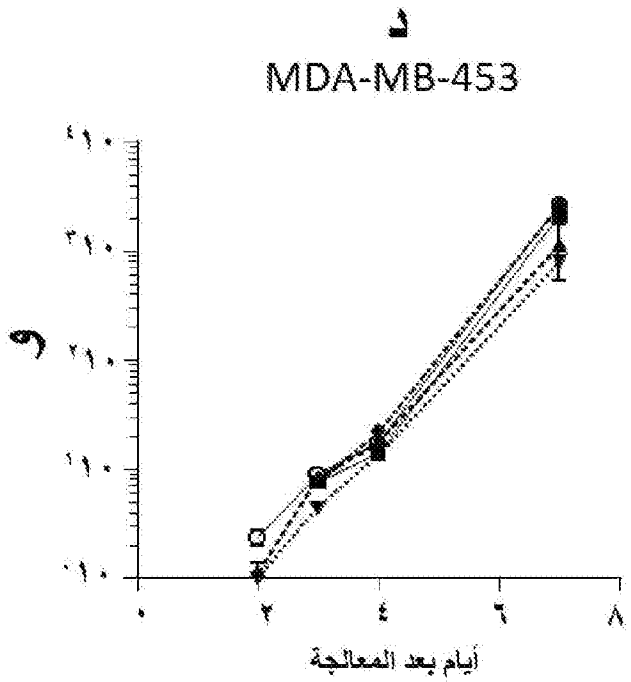
ج NG-641



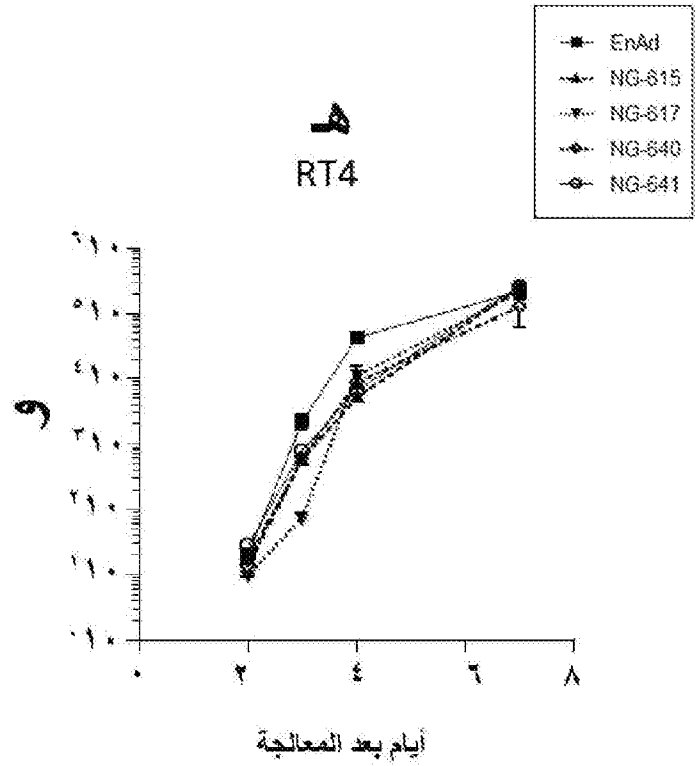
شكل ١٢أ


ي
A549
٧١٠
٦١٠
٥١٠
٤١٠
٣١٠
٢١٠
١١٠
ك
٠
٢
٤
٦
٨
ل
EnAd
NG-615
NG-617
NG-640
NG-641

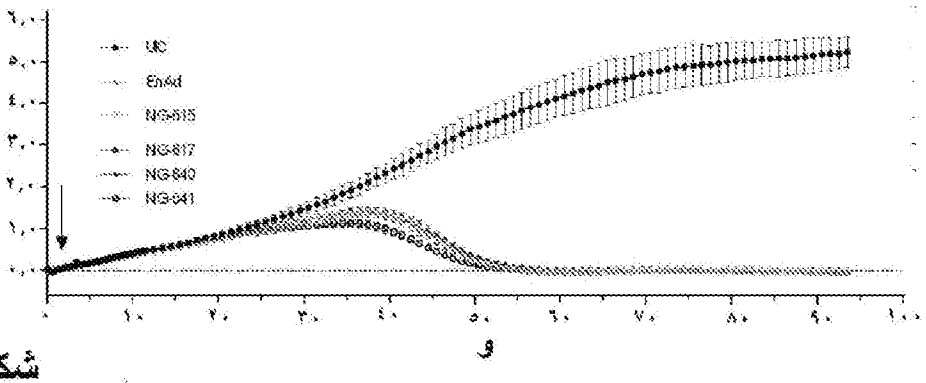
شكل ٢ب


د
MDA-MB-453
٤١٠
٣١٠
٢١٠
١١٠
٠١٠
و
٠
٢
٤
٦
٨
أيام بعد المعالجة

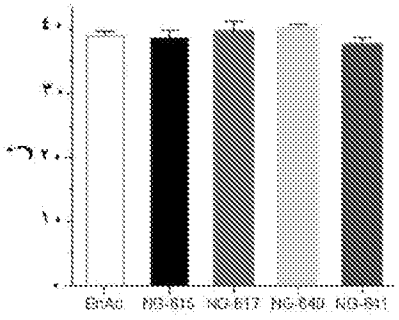
شكل ٢ج


EnAd
NG-615
NG-617
NG-640
NG-641
هـ
RT4
٦١٠
٥١٠
٤١٠
٣١٠
٢١٠
١١٠
٠١٠
و
٠
٢
٤
٦
٨
أيام بعد المعالجة

شكل ١٣أ

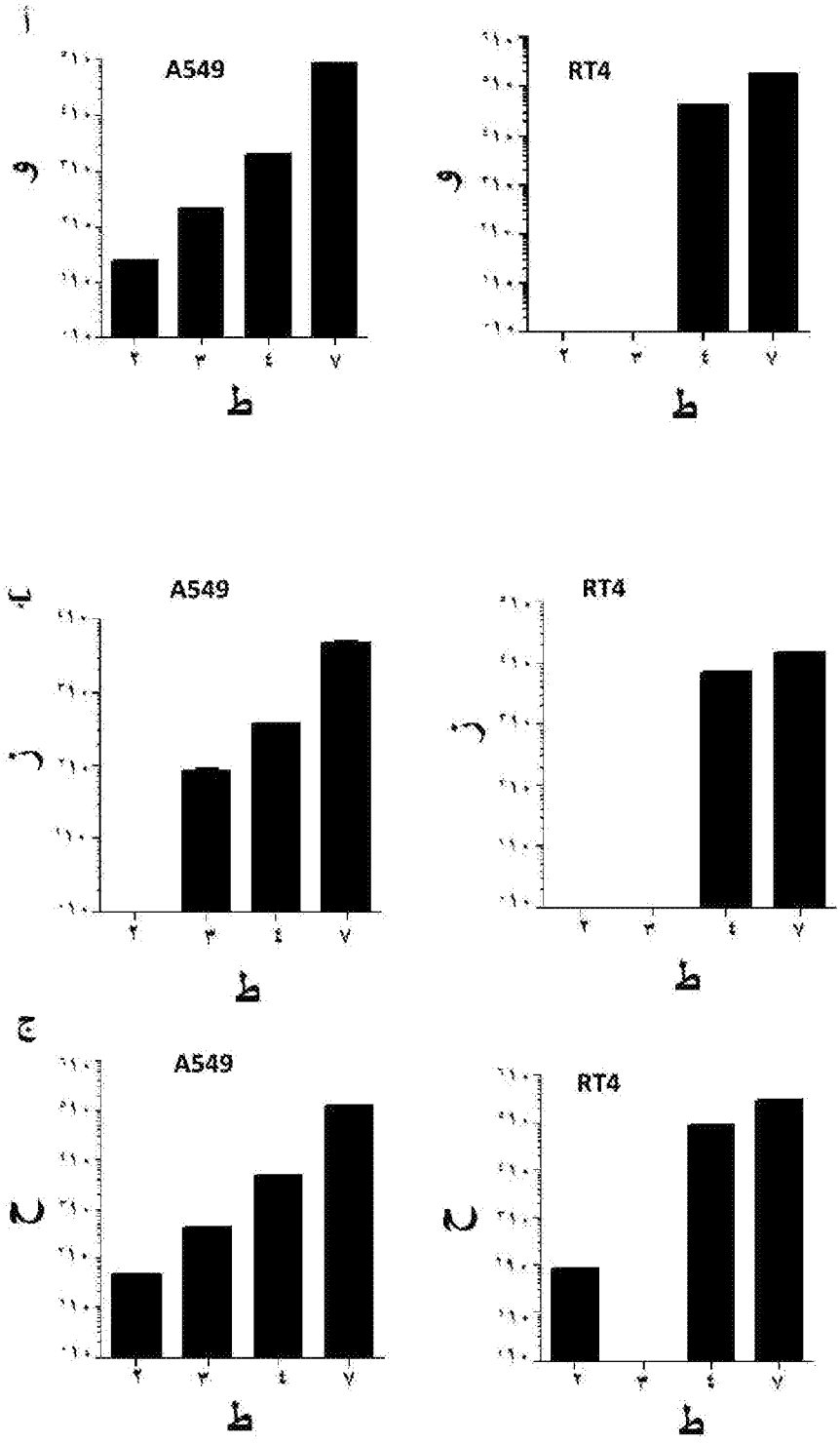


شكل ٣ب

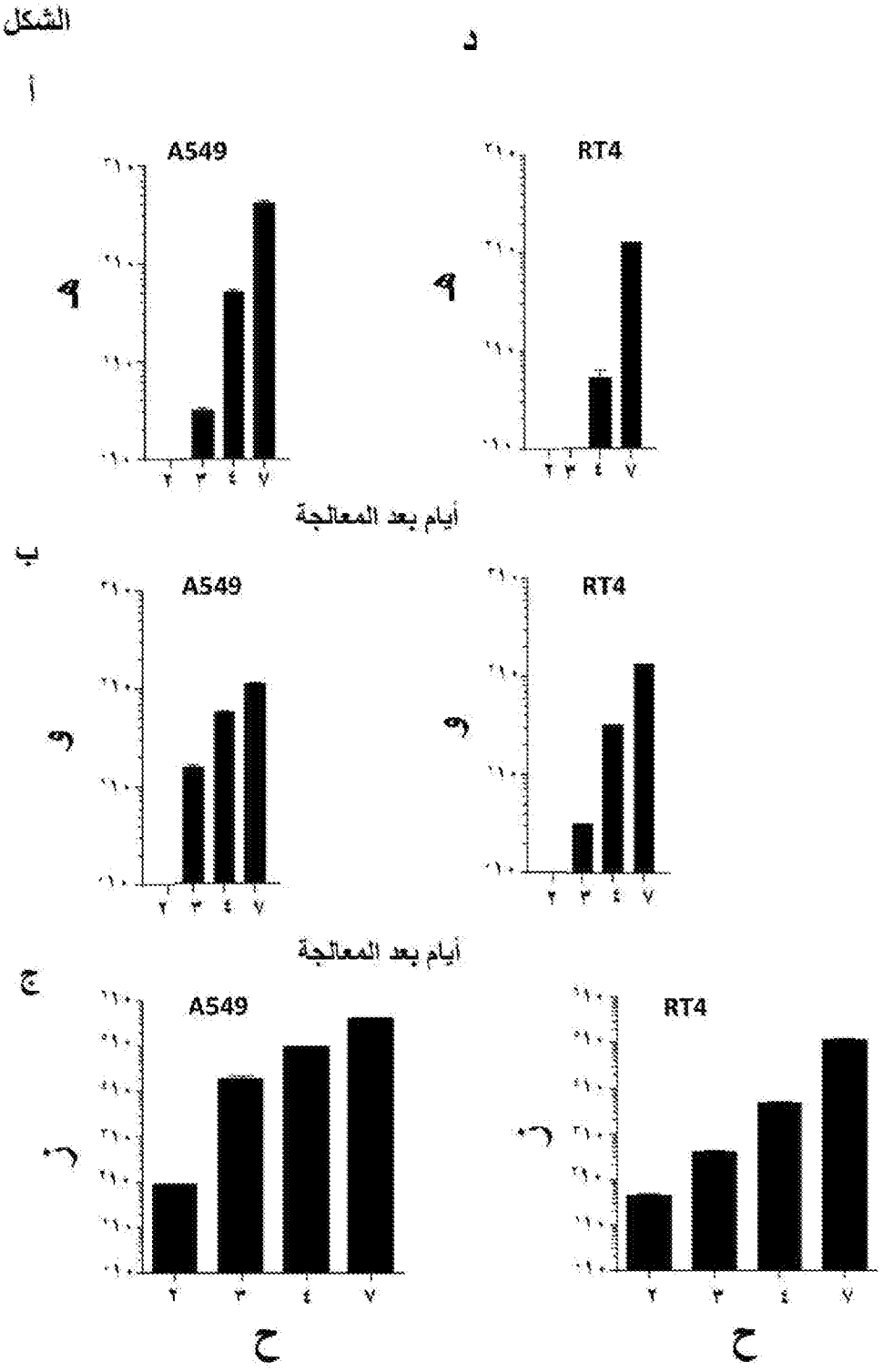


شكل ٤

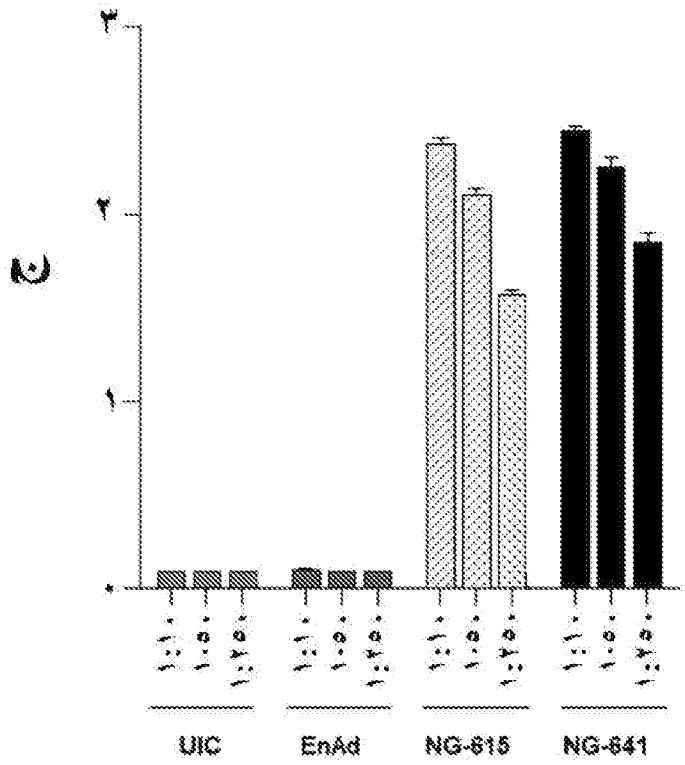
هـ



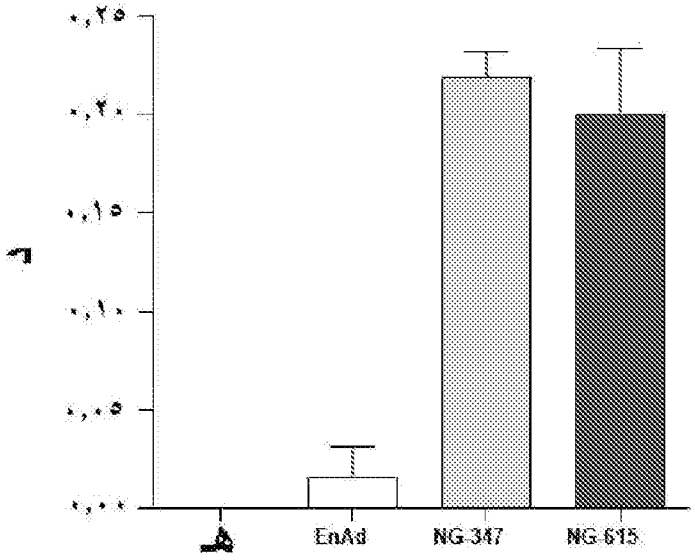
الشكل ٥


أ
A549
RT4
د
ب
A549
RT4
و
أيام بعد المعالجة
ج
A549
RT4
ز
ح
أيام بعد المعالجة
ح

شكل ٦أ

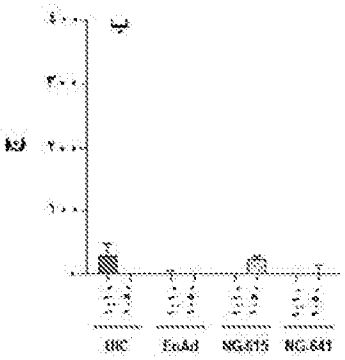

٣
٢
١
٠
UIC
EnAd
NG-615
NG-641

شكل ٦ب

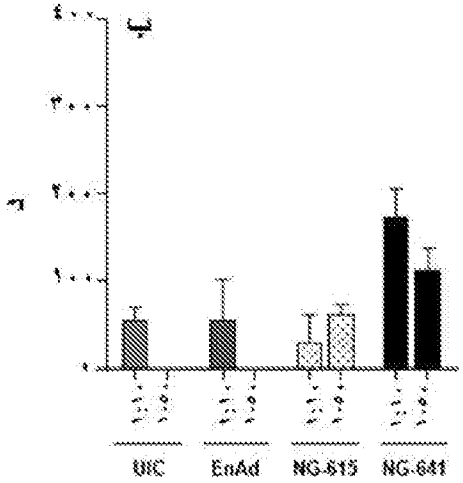

٠,٢٥
٠,٢٠
٠,١٥
٠,١٠
٠,٠٥
٠,٠٠
EnAd
NG-347
NG-615

شكل ٧

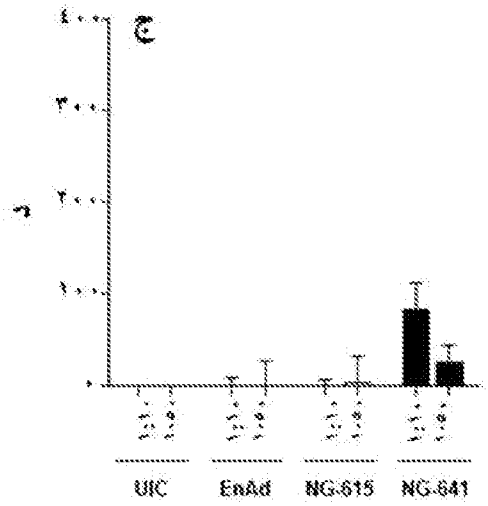
أ



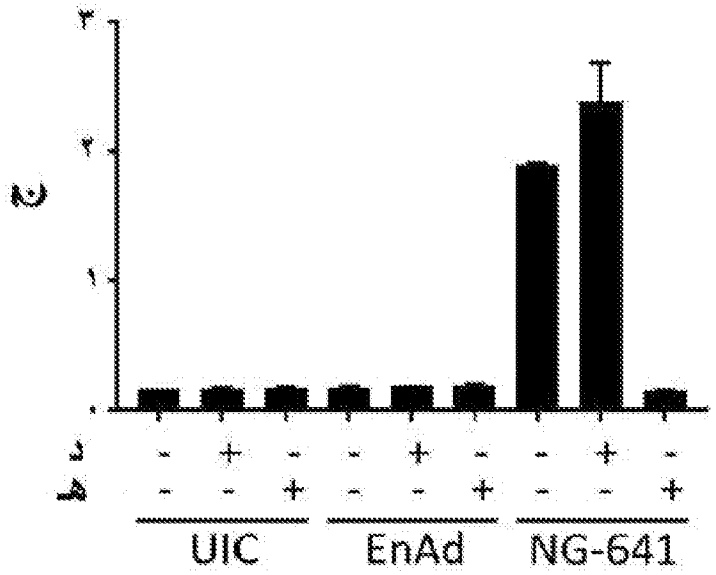
ب



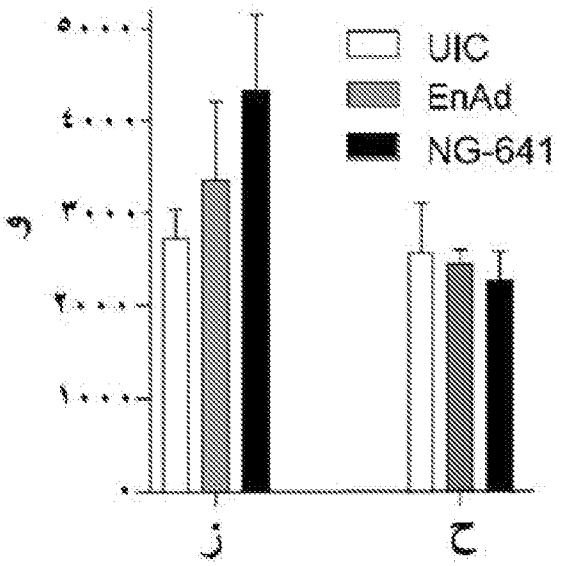
شكل ٧ج



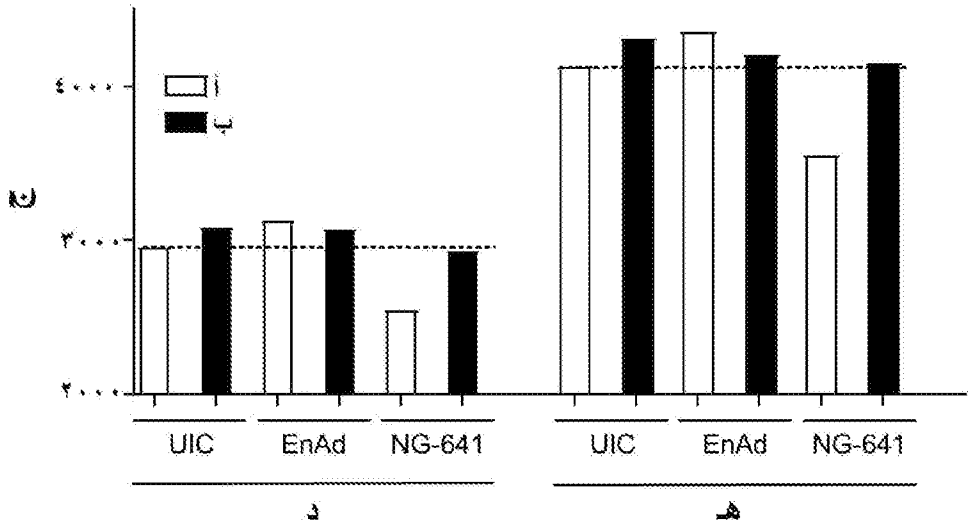
شكل ٨أ


٣
٢
١
٠
د
هـ
UIC
EnAd
NG-641

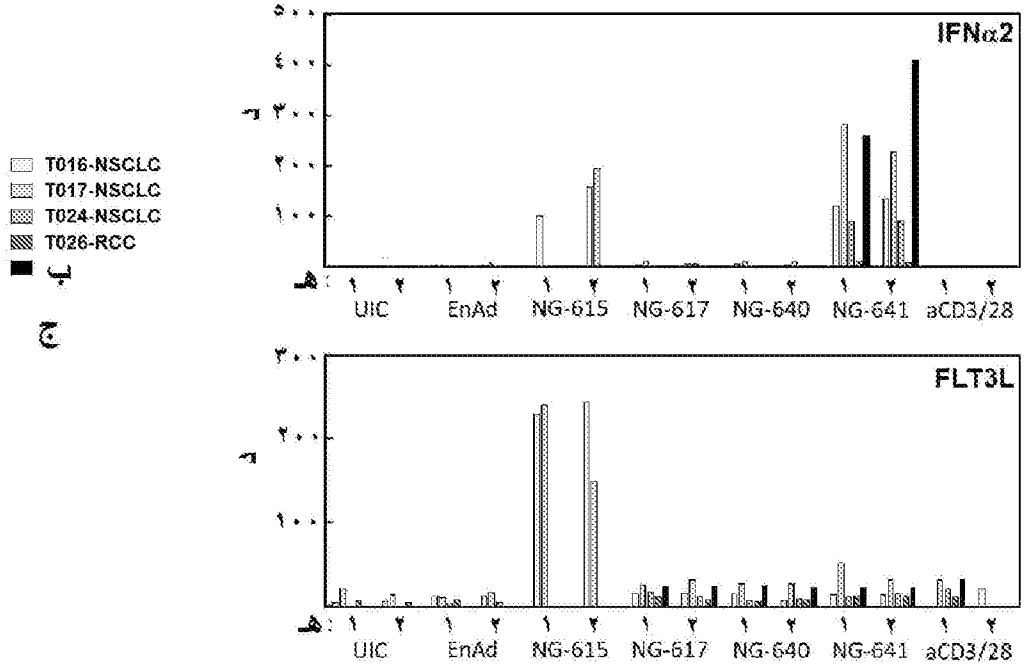
شكل ٨ب


٥٠٠٠
٤٠٠٠
٣٠٠٠
٢٠٠٠
١٠٠٠
٠
UIC
EnAd
NG-641
ز
ح

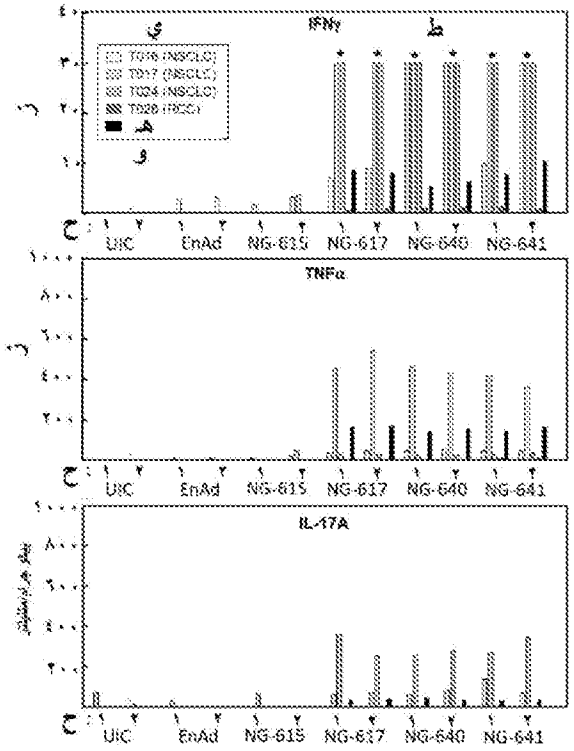
شكل ٩


أ
ب
UIC
EnAd
NG-641
UIC
EnAd
NG-641
د
هـ

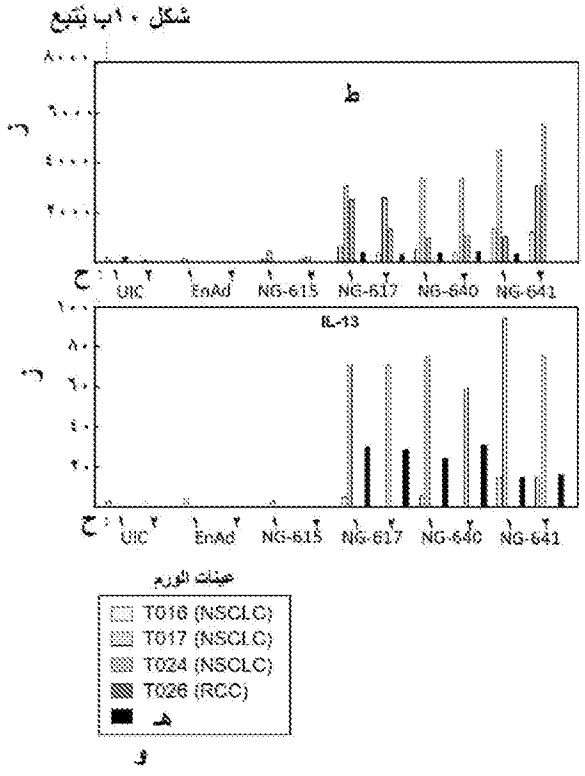
شكل ١٠أ


T016-NSCLC
T017-NSCLC
T024-NSCLC
T026-RCC
ب
ج
IFNα2
UIC
EnAd
NG-615
NG-617
NG-640
NG-641
aCD3/28
FLT3L
UIC
EnAd
NG-615
NG-617
NG-640
NG-641
aCD3/28

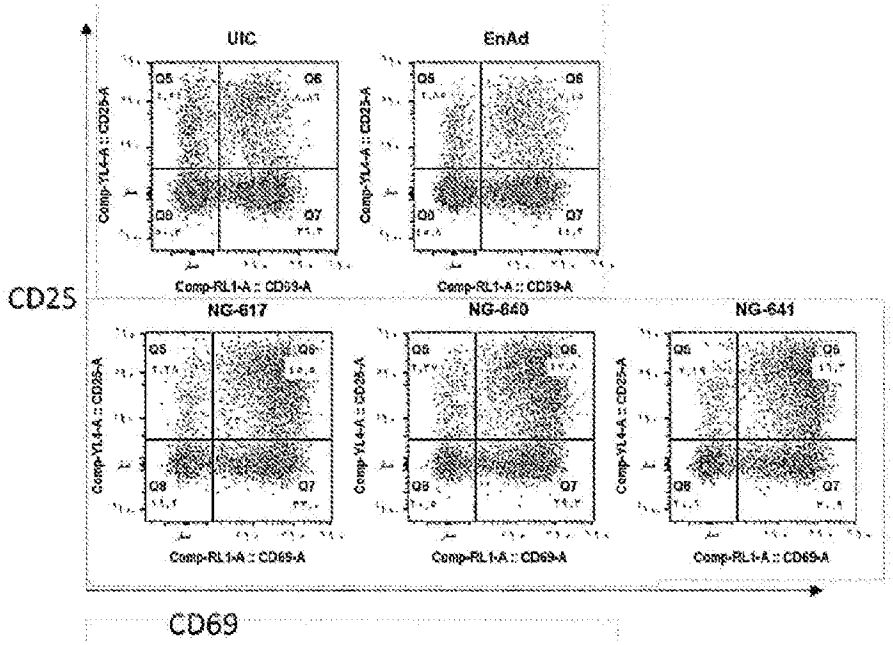
شكل ١٠ب



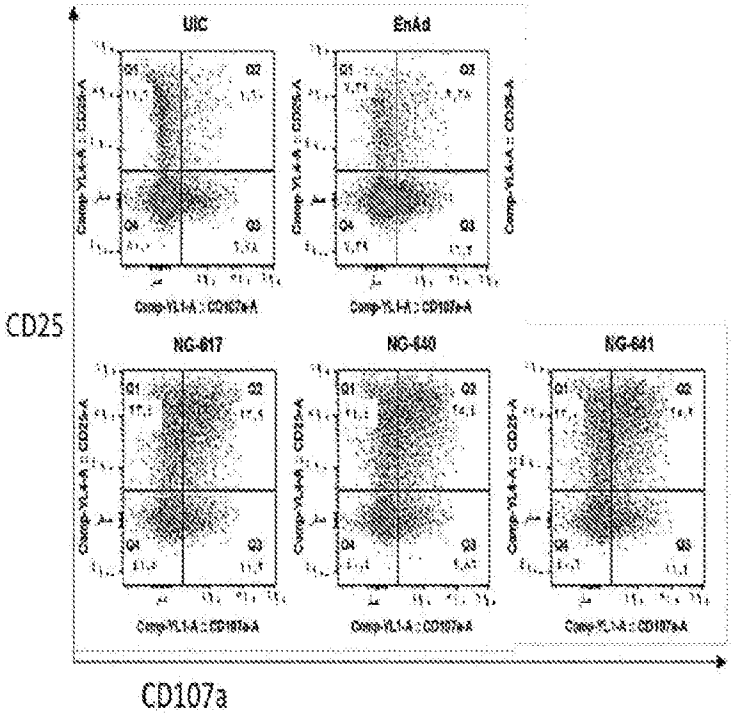
شكل ١٠ب يتبع



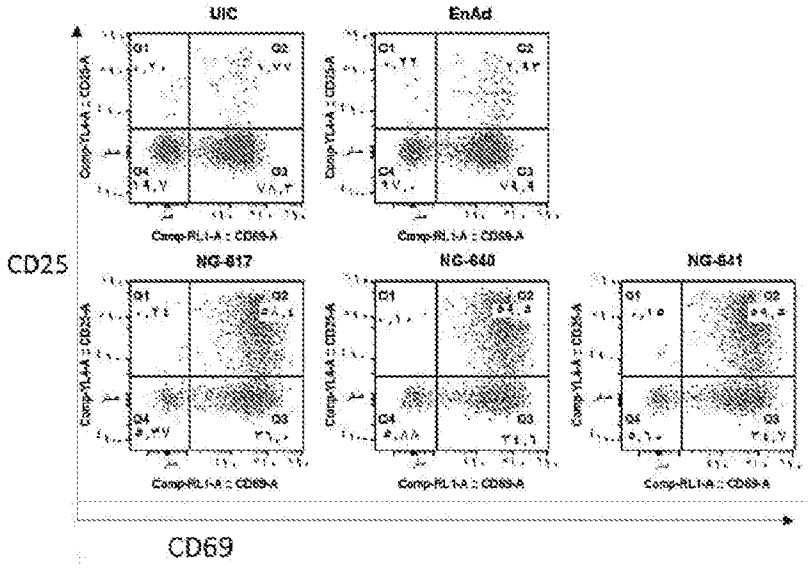
الشكل ١١أ (المحور X يمثل Comp-RL1-A:CD69-A ، المحور Y يمثل Comp-YL4-A: CD25-A)



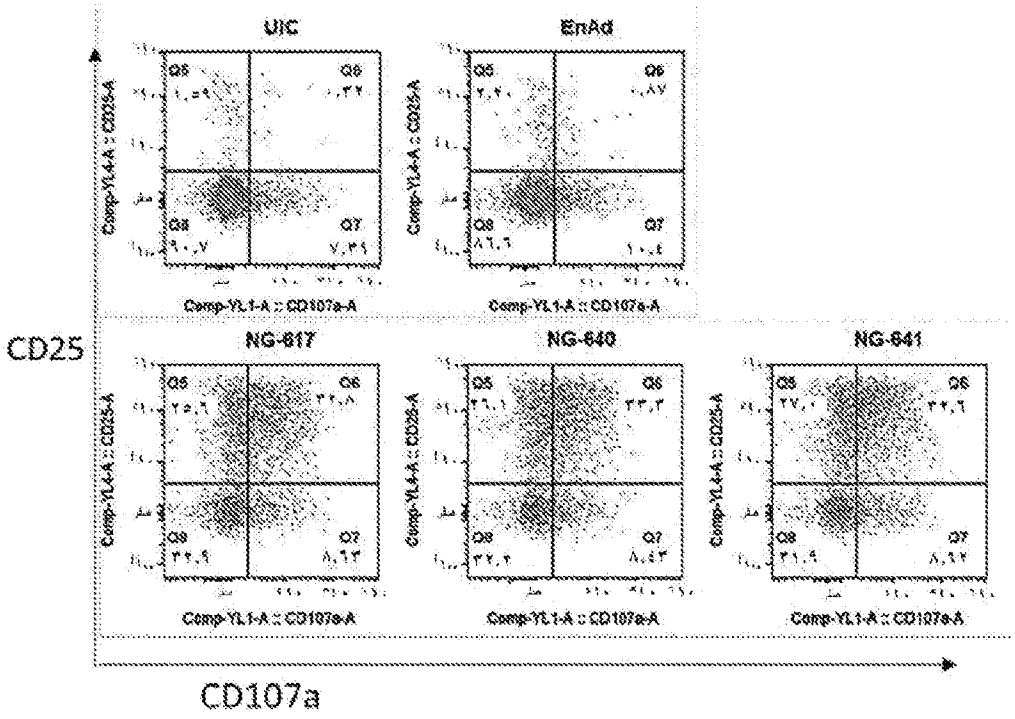
الشكل ١١أ يتبع (المحور X يمثل Comp- YL1A:107a-A ، المحور Y يمثل Comp-YL4-A: CD25-A)



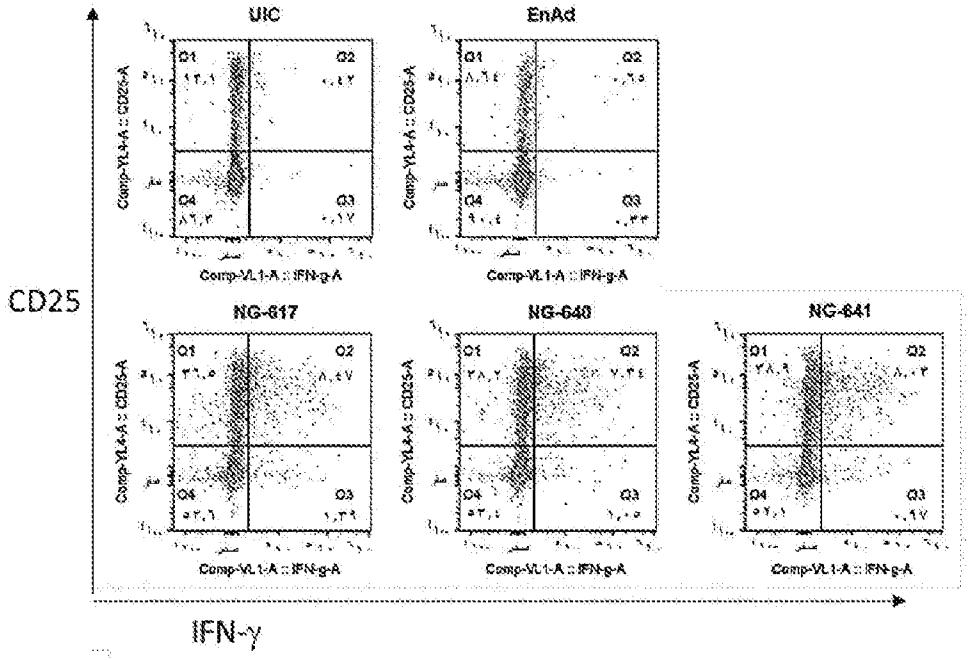
الشكل ١١ب (المحور X يمثل Comp-RL-A:CD69-A، المحور Y يمثل Comp-YL4-A: CD25-A)



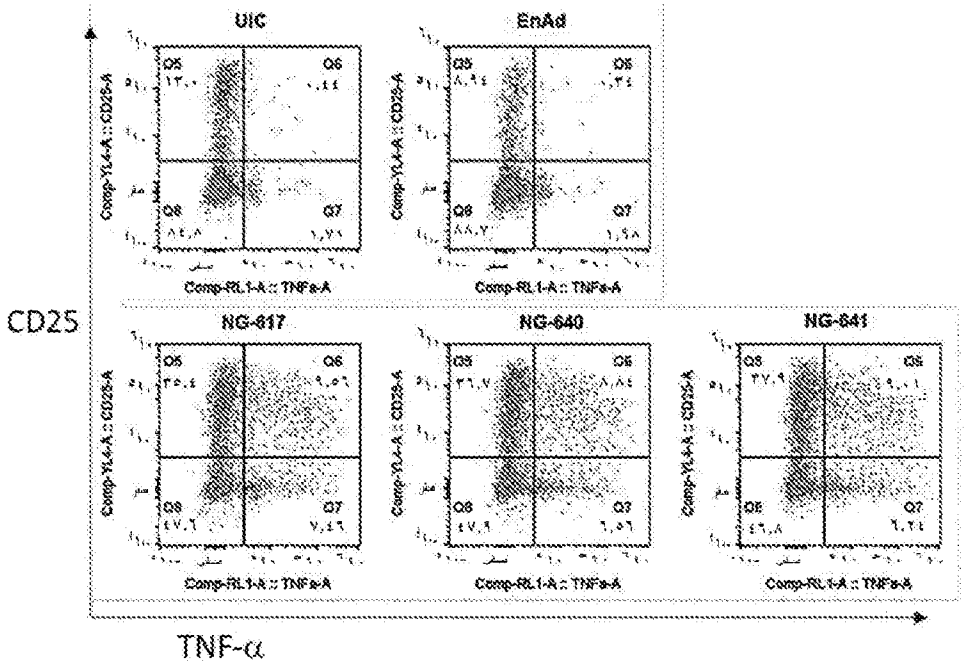
الشكل ١١ب يتبع (المحور X يمثل Comp-YL1-1:CD107-a-A ، المحور Y يمثل Comp-YL4-A: CD25-A)



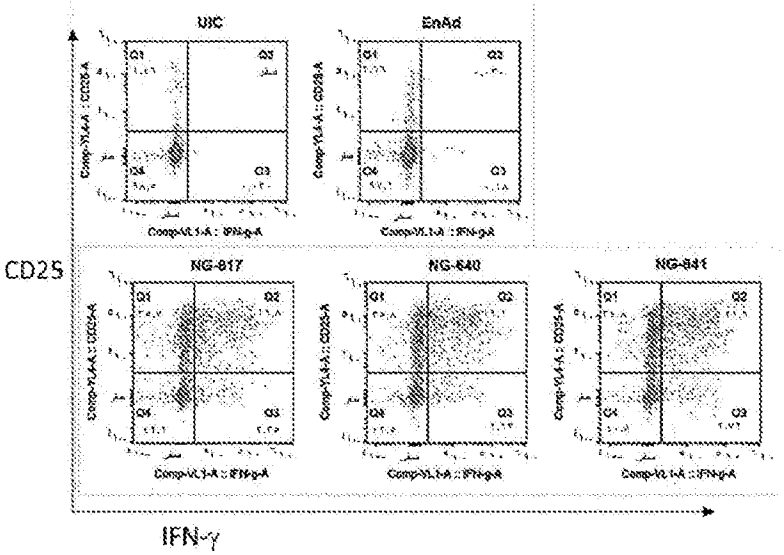
الشكل ١١ج (المحور X يمثل Comp-VL-A: IFN-g-A، المحور Y يمثل Comp-YL4-A: CD25-A)



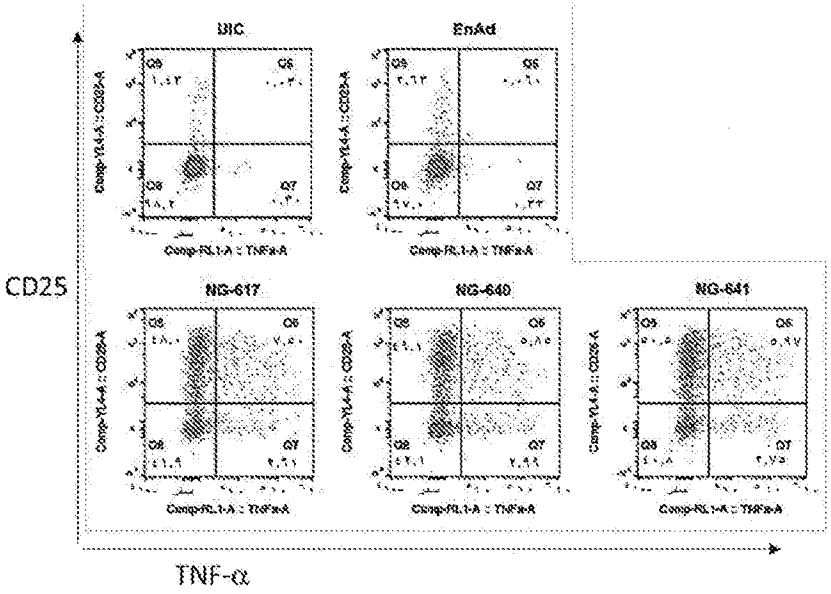
الشكل ١١ج يتبع (المحور X يمثل Comp-YL4-A: CD25-A، المحور Y يمثل Comp-RL1-A:TNF-a-A)



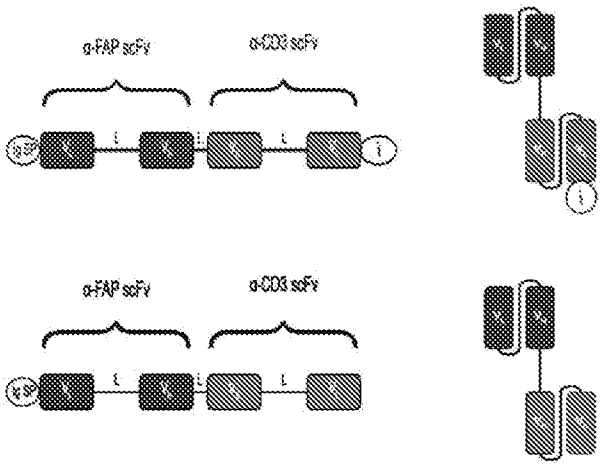
الشكل ١١د (المحور X يمثل Comp-VL-A: IFN-g-A ، المحور Y يمثل Comp-VL4-A: CD25-A)



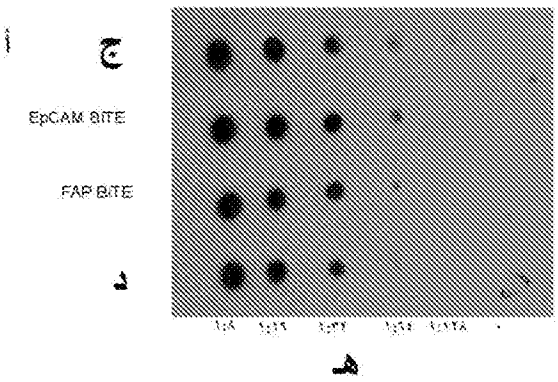
الشكل ١١د يتبع (المحور X يمثل Comp-RL1-A:TNF-a-A ، المحور Y يمثل Comp-VL4-A: CD25-A)

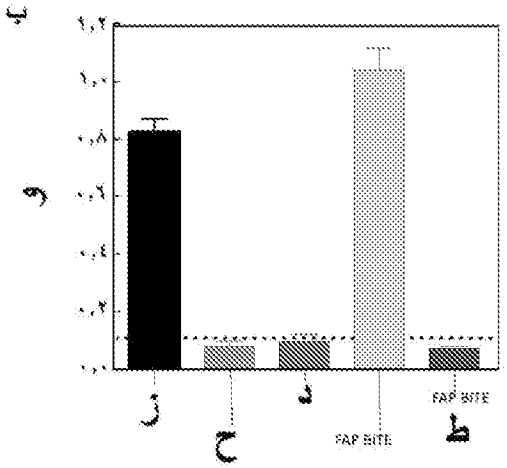


شكل ١٢

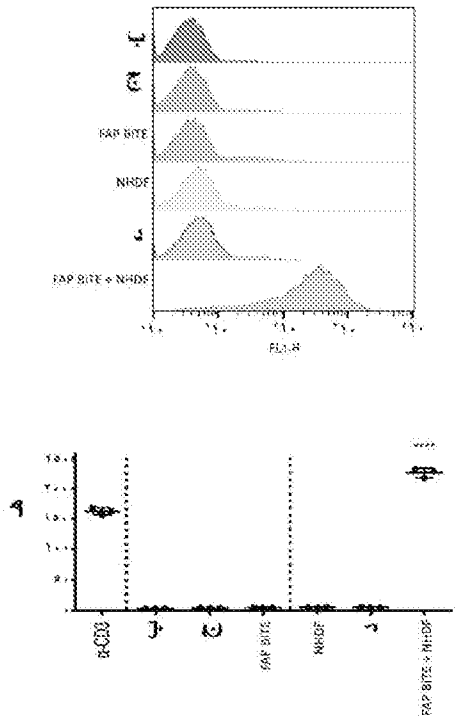

α-FAP scFv
α-CD3 scFv
α-FAP scFv
α-CD3 scFv

شكل ١٣

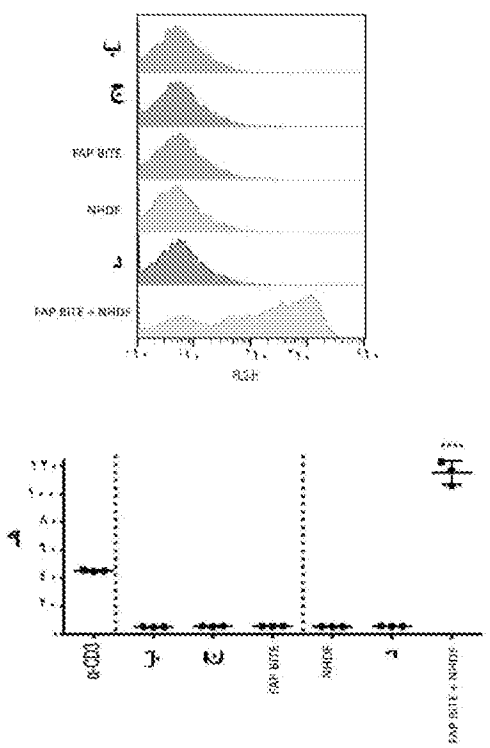

أ
ج
EpCAM BITE
FAP BITE
د
هـ


ب
و
ز
ح
د
FAP BITE
ط
FAP BITE

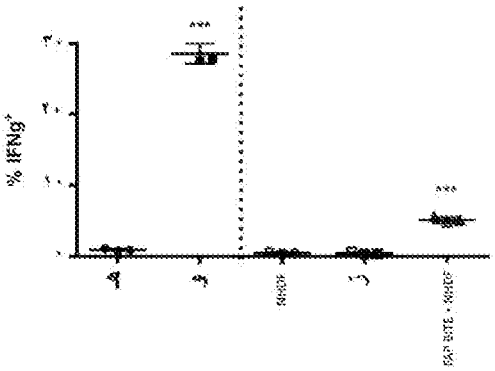
شكل ١٤أ



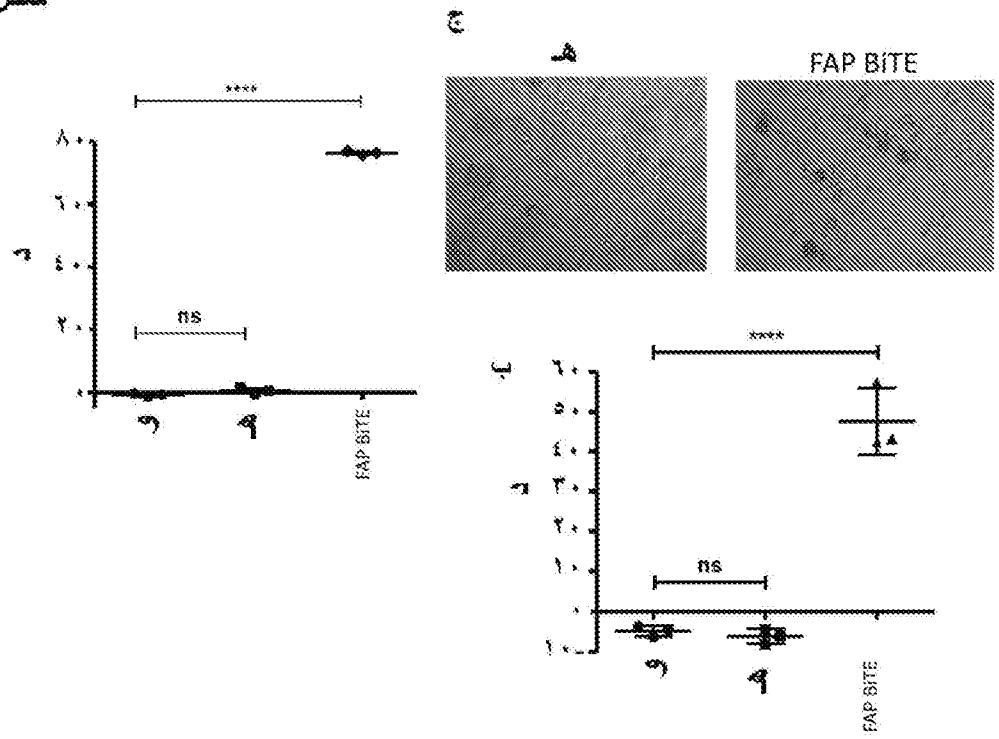
شكل ١٤ب



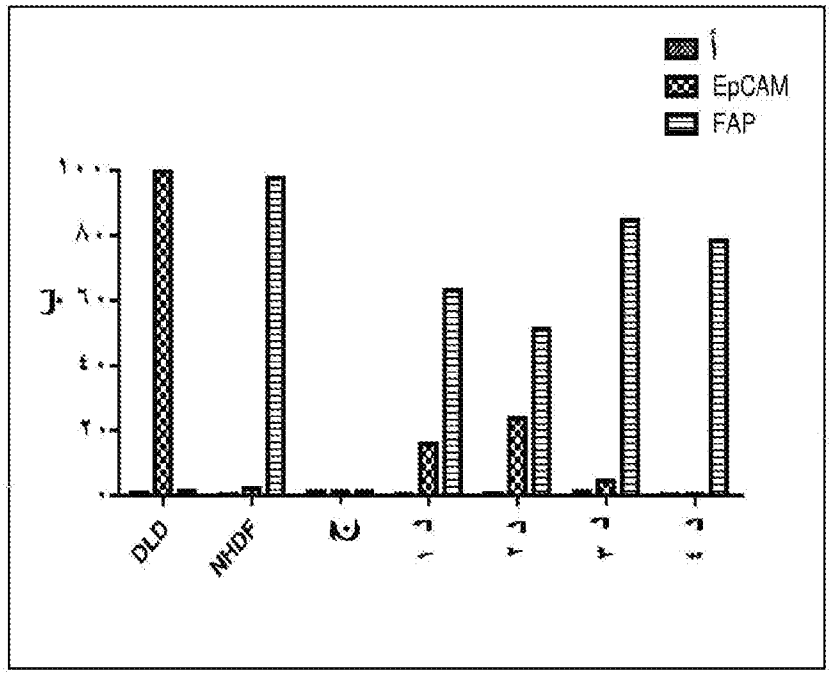
شكل ١٤ج



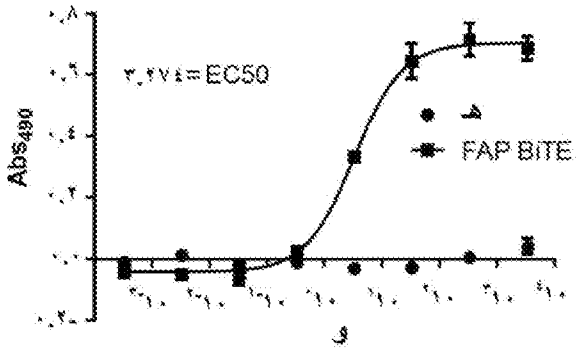
شكل ١٥



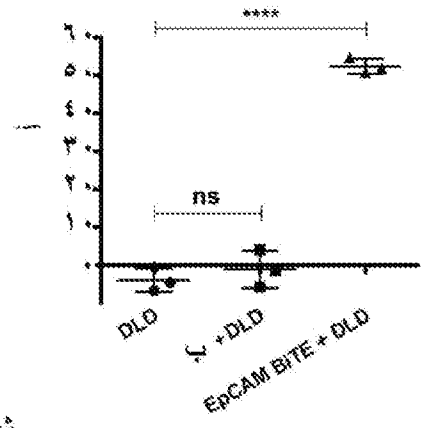
شكل ١٦



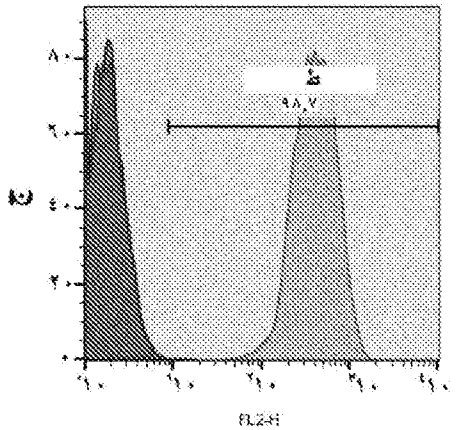
شكل ١٧أ



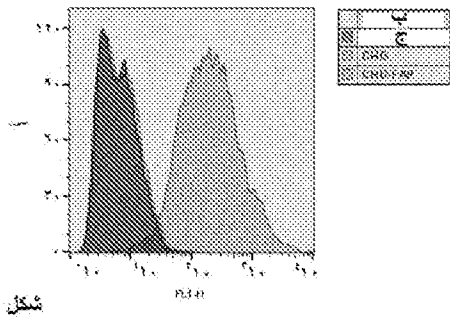
شكل ١٧ب



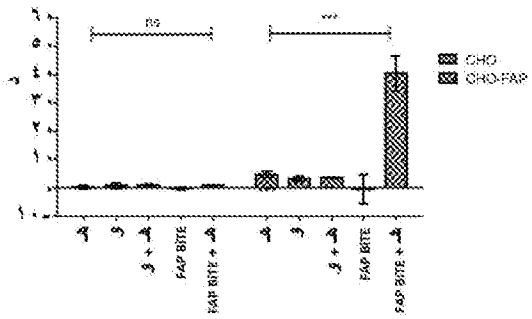
شكل ١٧ج



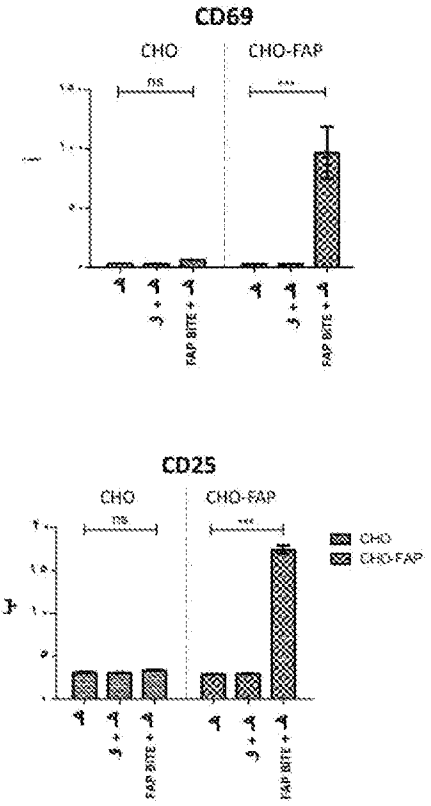
شكل ١٨أ

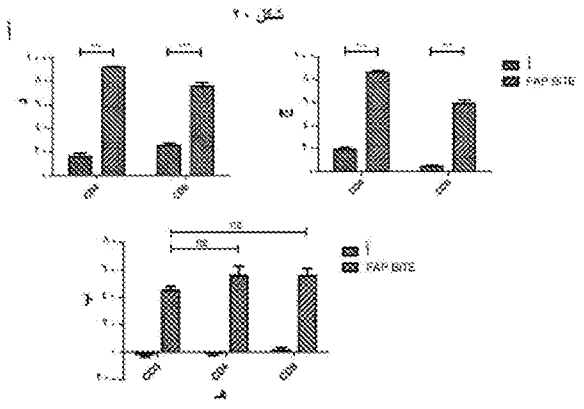


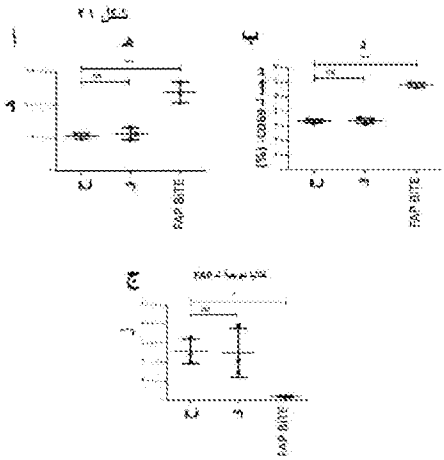
شكل ١٨ب



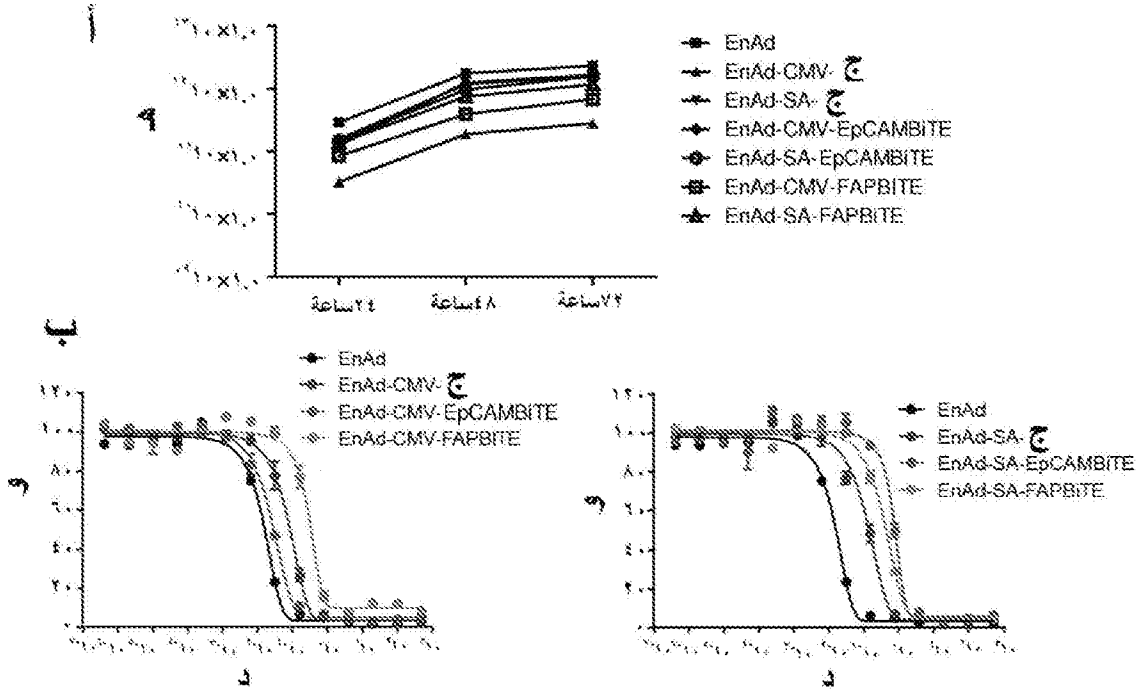
شكل ١٩



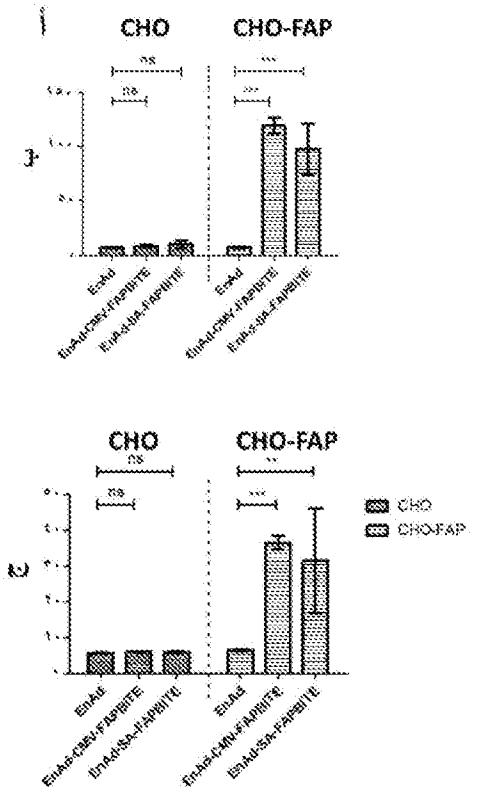




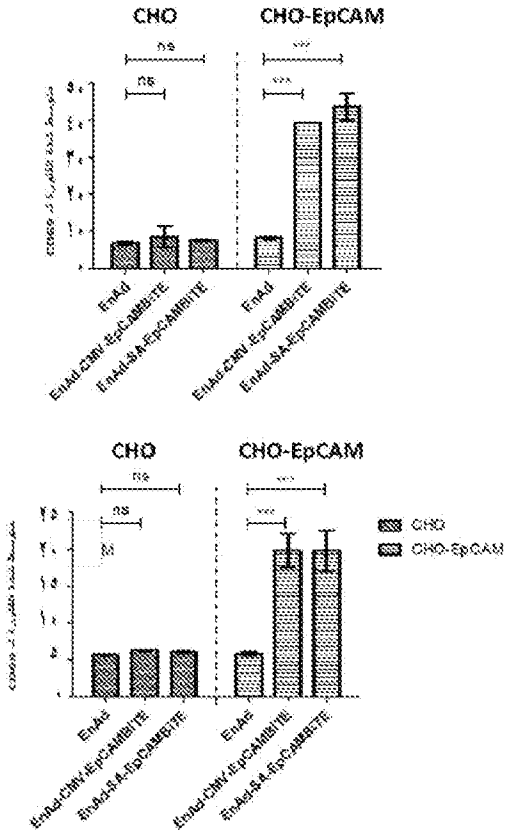
شكل ٢٢


أ
ب
ج
د
EnAd
EnAd-CMV-
EnAd-SA-
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA-EpCAMBiTE
EnAd-CMV-FAPBiTE
EnAd-SA-FAPBiTE
٢٤ساعة
٤٨ساعة
٧٢ساعة

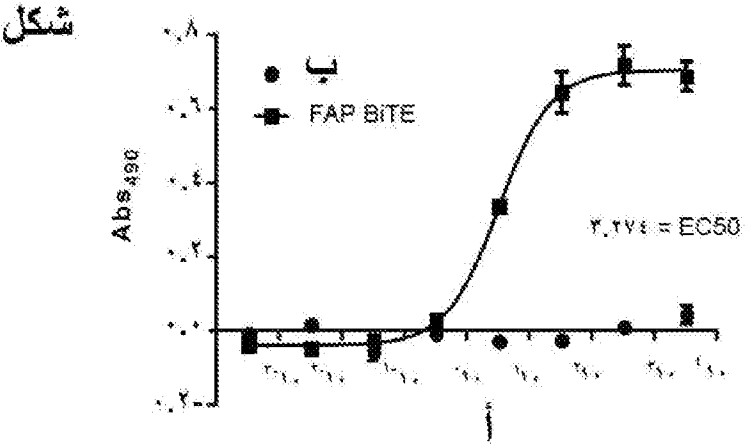
شكل ٢٣أ



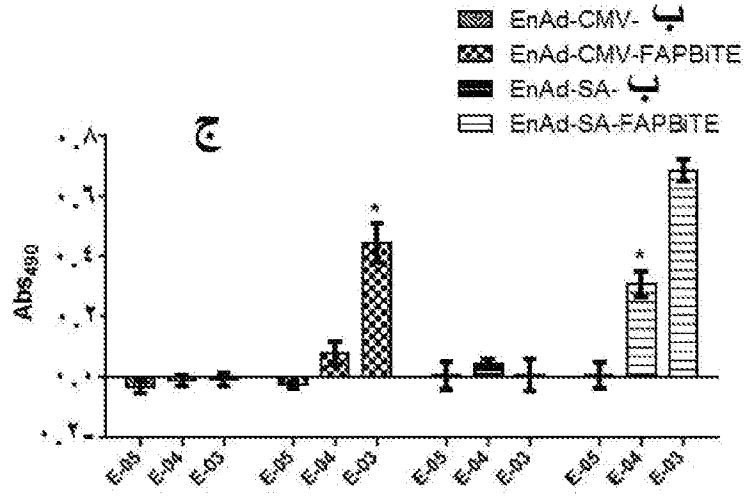
الشكل ٢٣ب



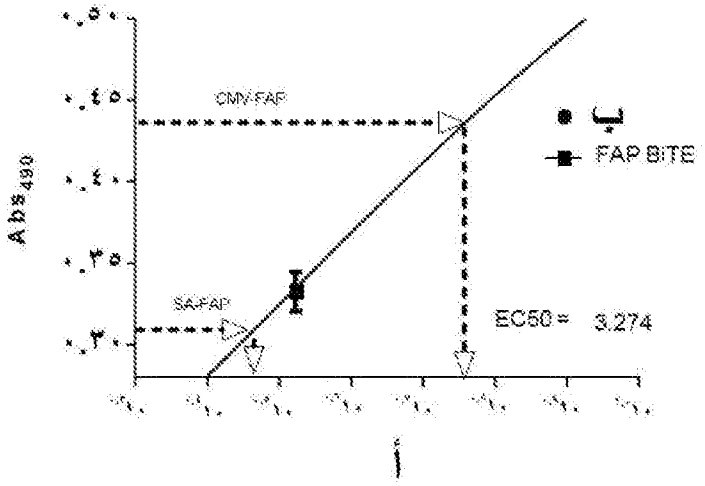
شكل ٢٤


ب
FAP BiTE
Abs490
EC50 = ٣,٢٧٤

أ

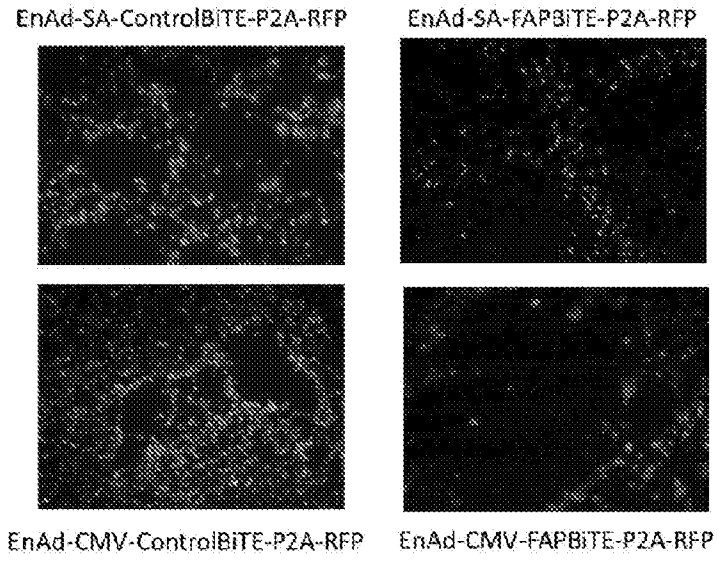

ب EnAd-CMV-
EnAd-CMV-FAPBiTE
ب EnAd-SA-
EnAd-SA-FAPBiTE
ج
Abs490
E-05
E-04
E-03

د

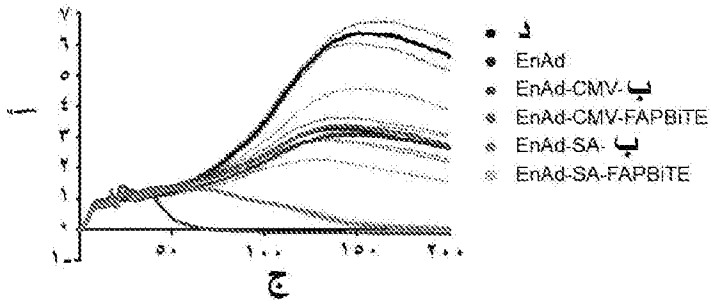

CMV-FAP
SA-FAP
ب
FAP BiTE
Abs490
EC50 = 3.274

أ

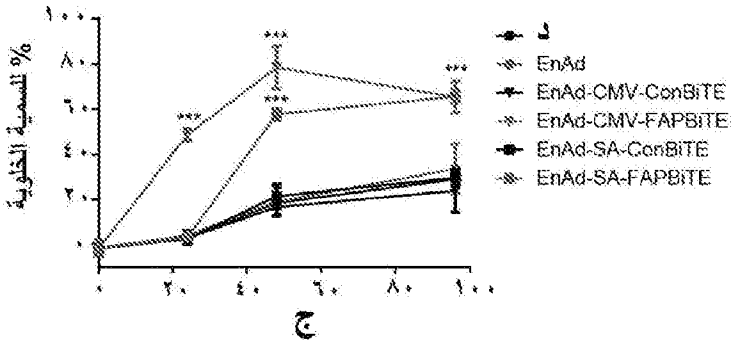
شكل ٢٥



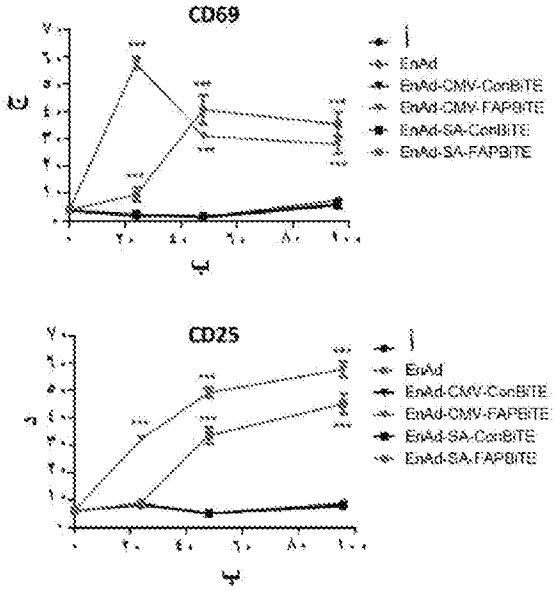
شكل ٢٦أ



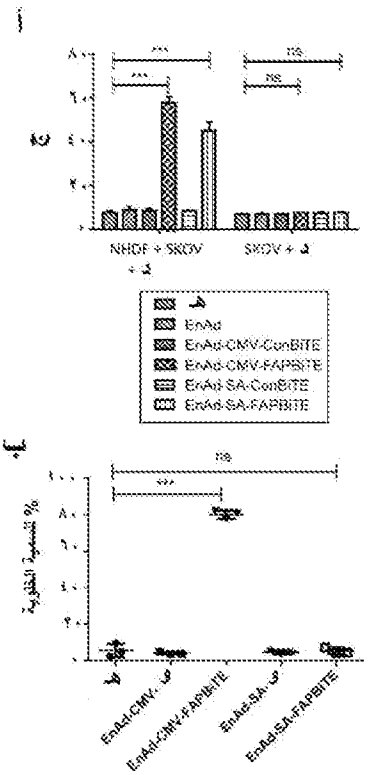
شكل ٢٦ب



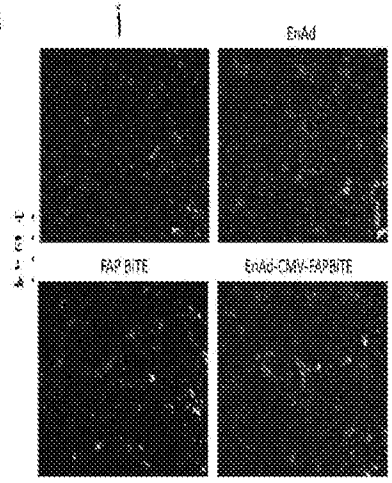
شكل ٢٧


CD69
CD25
EnAd
EnAd-CMV-ConBITE
EnAd-CMV-FAPBITE
EnAd-SA-ConBITE
EnAd-SA-FAPBITE

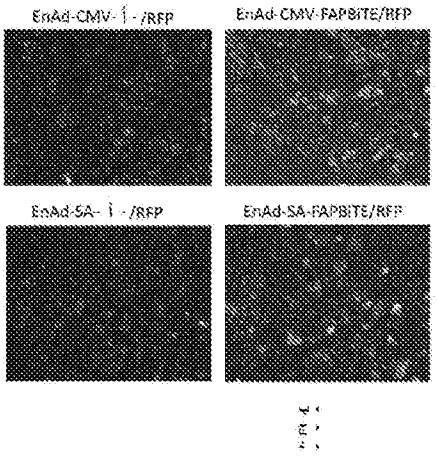
شكل ٢٨


NHDF + SKOV
SKOV
EnAd
EnAd-CMV-ConBITE
EnAd-CMV-FAPBITE
EnAd-SA-ConBITE
EnAd-SA-FAPBITE

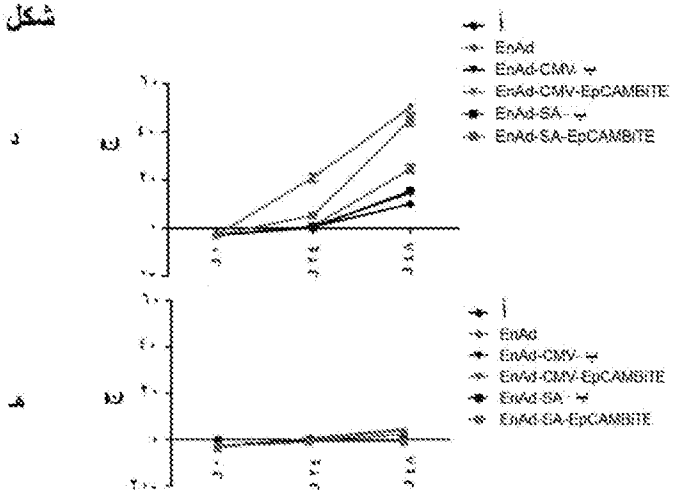
شكل ٢٩


EnAd
FAP BITE
EnAd-CMV-FAPBITE

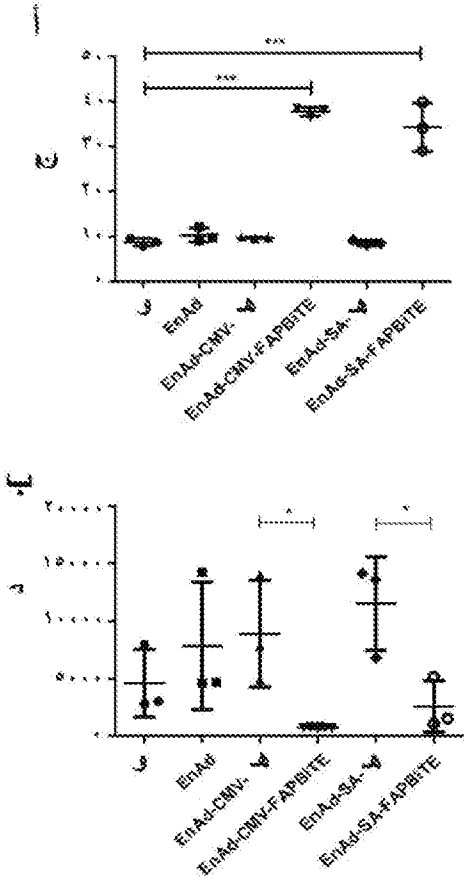
شكل ٣٠


EnAd-CMV-FAPBiTE/RFP
EnAd-SA-FAPBiTE/RFP

شكل ٣١

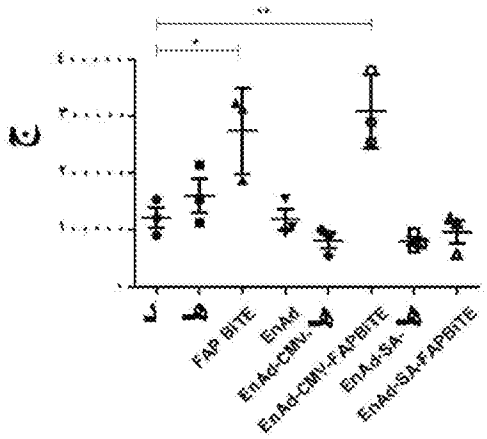

أ
EnAd
EnAd-CMV-ب
EnAd-CMV-EpCAMBITE
EnAd-SA-ب
EnAd-SA-EpCAMBITE
د
ج
هـ

شكل ٣٢

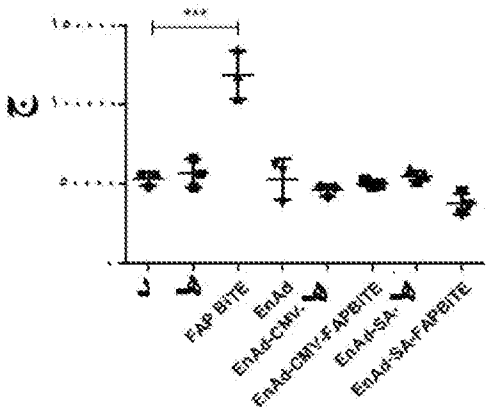

أ
ج
و
EnAd
هـ
EnAd-CMV-
EnAd-CMV-FAPBITE
EnAd-SA-
EnAd-SA-FAPBITE
ب
د

شكل ٣٣

أ

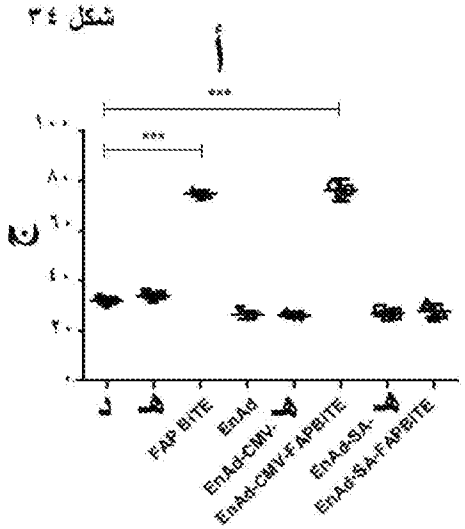


ب

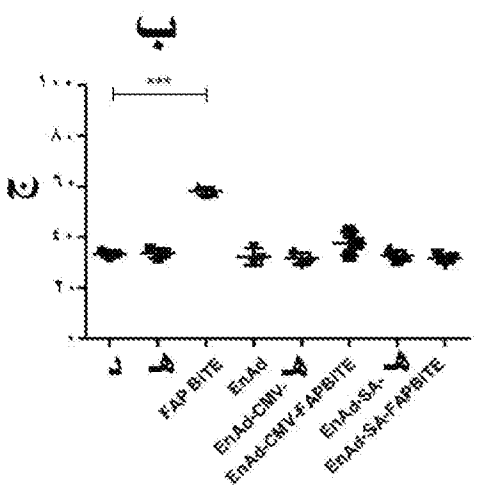


شكل ٣٤

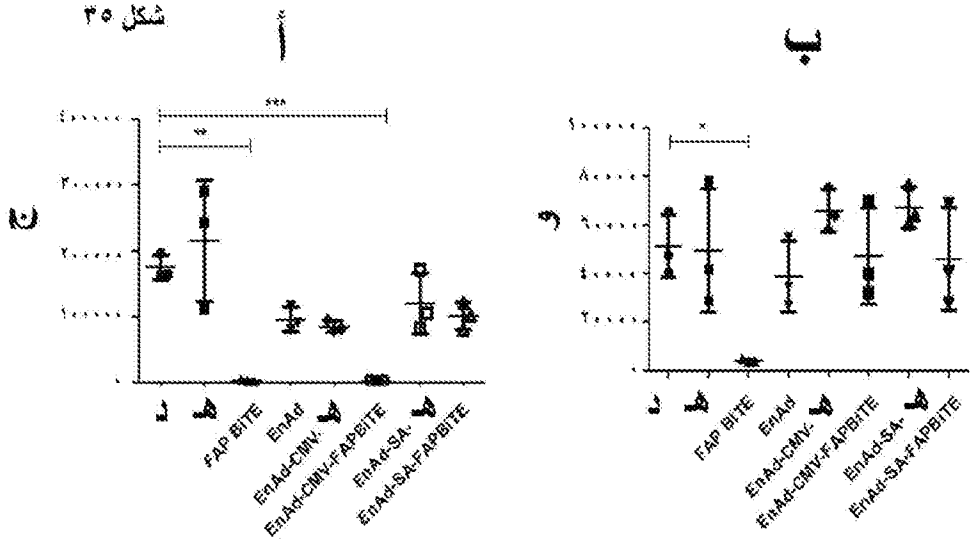
أ



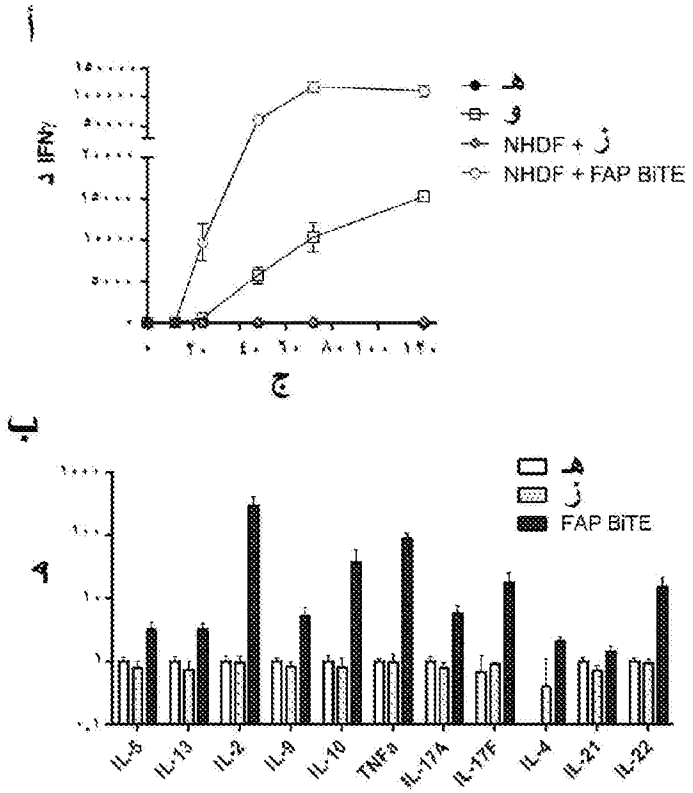
ب



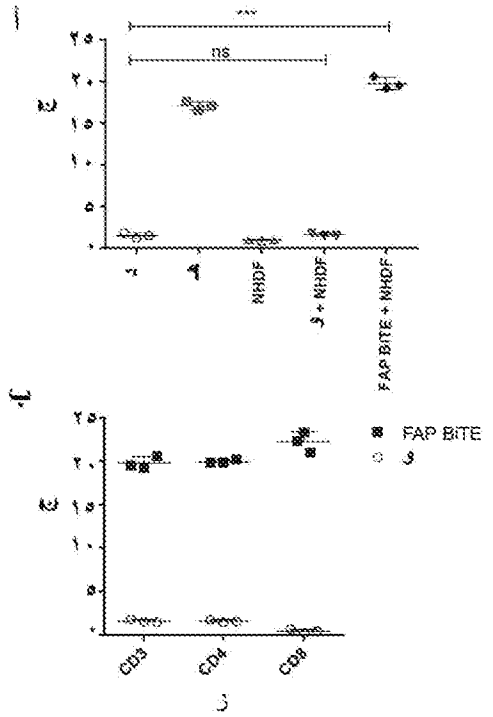
شكل ٣٥


أ
ب
ج
د
هـ
FAP BITE
EnAd
EnAd-CMV-
EnAd-CMV-FAPBITE
EnAd-SA-
EnAd-SA-FAPBITE

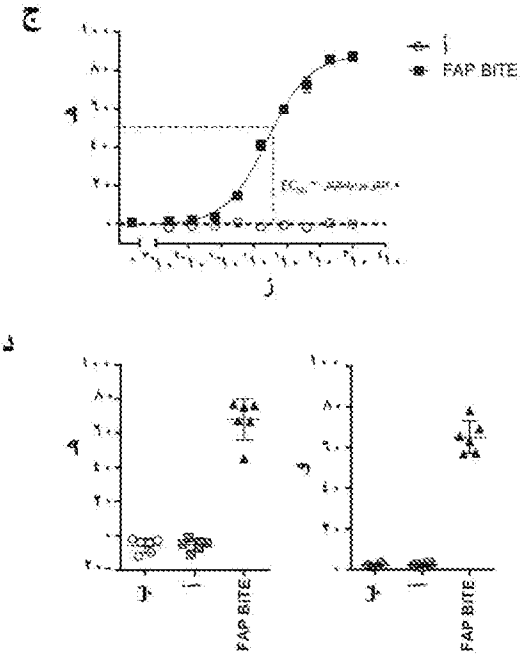
شكل ٣٦

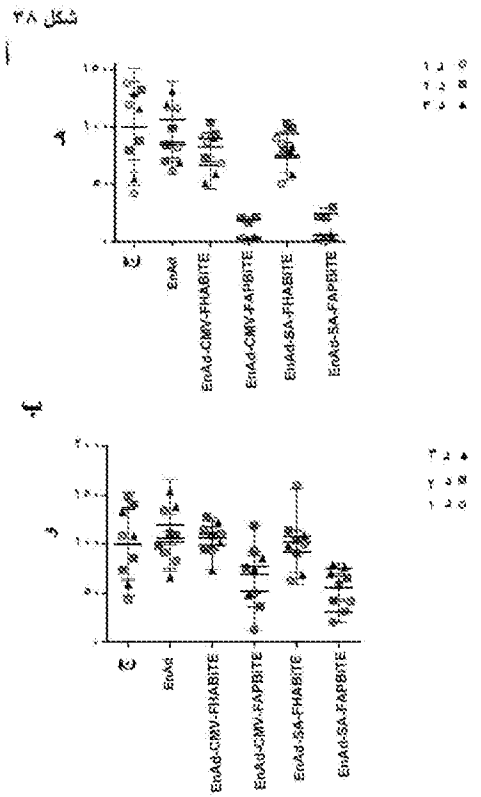

أ
ب
ج
د IFNγ
هـ
و
NHDF + ز
NHDF + FAP BITE
ز
FAP BITE
IL-5
IL-13
IL-2
IL-9
IL-10
TNFα
IL-17A
IL-17F
IL-4
IL-21
IL-22

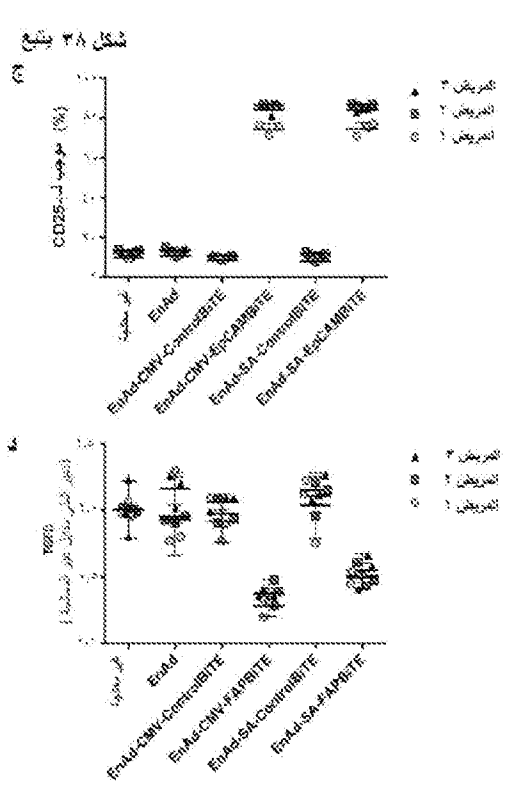
شكل ٣٧



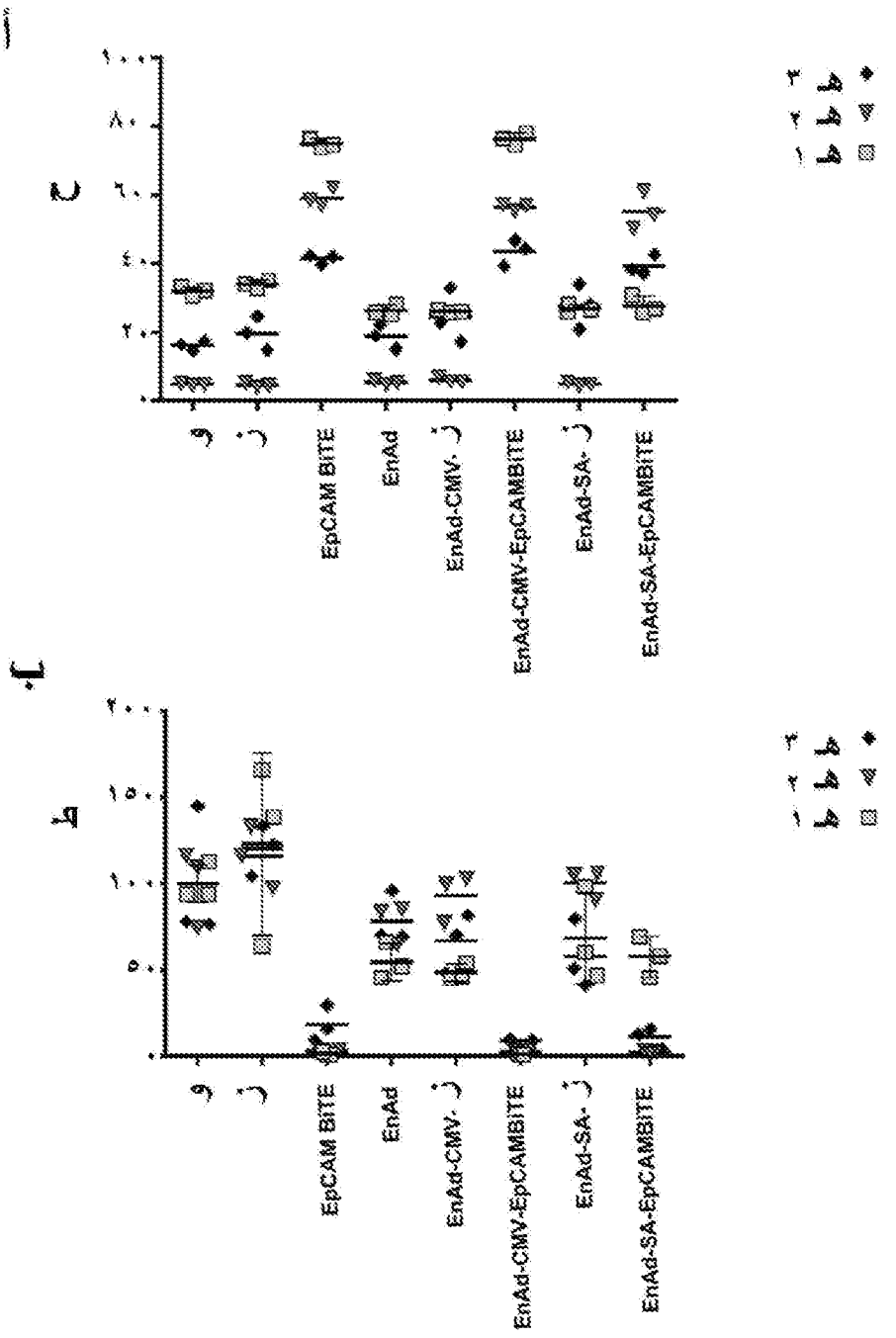
شكل ٣٧ يتبع

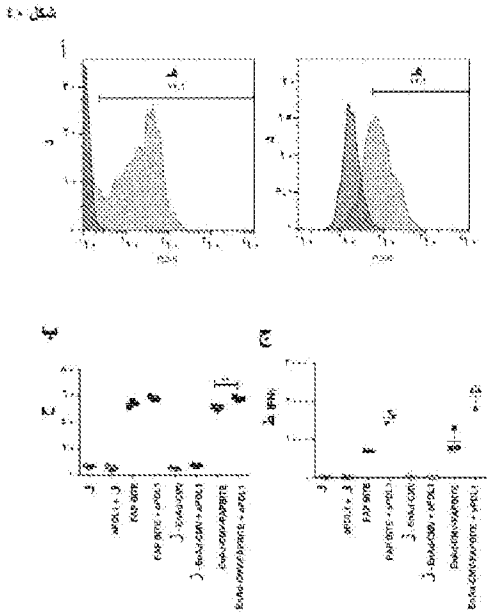




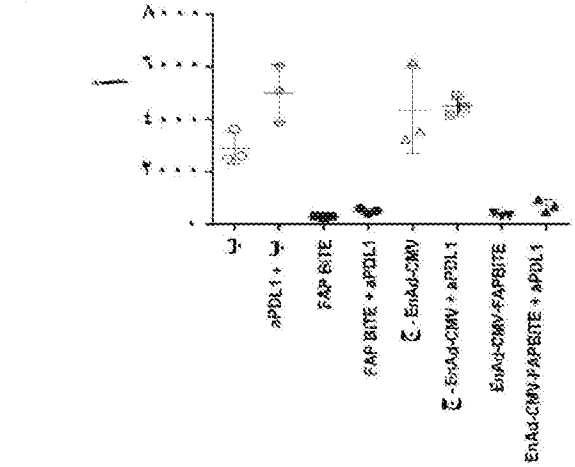


شكل ٣٩

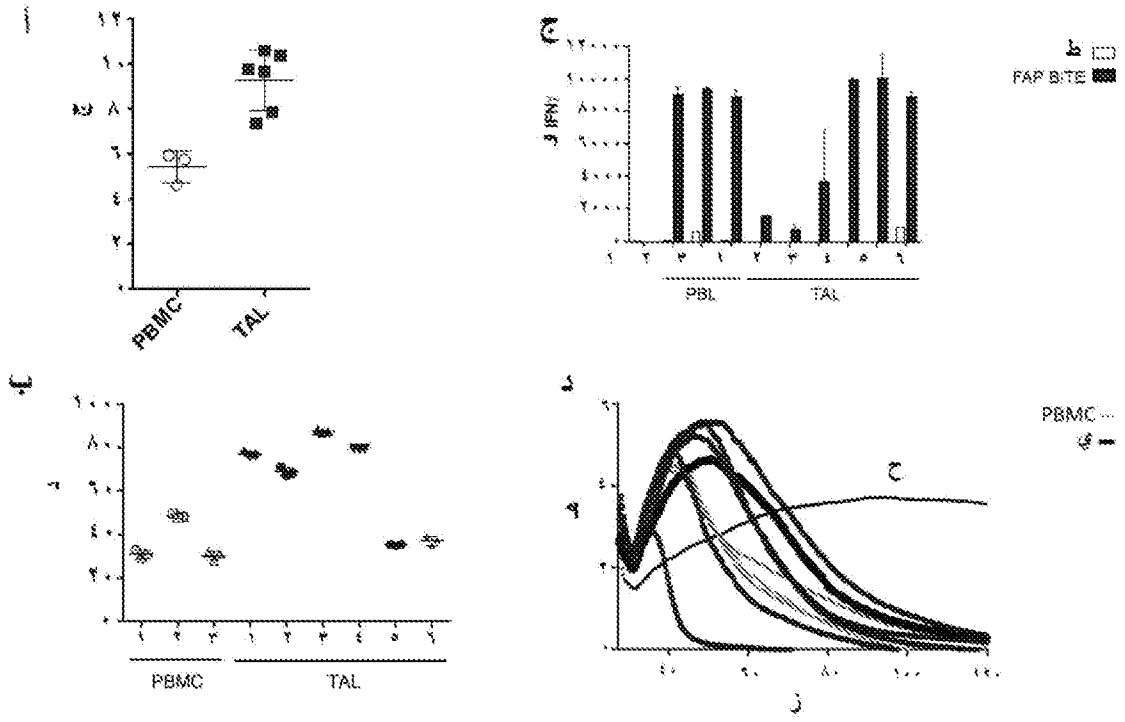

أ
ج
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
و
ز
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV- ز
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA- ز
EnAd-SA-EpCAMBiTE
١
٢
٣
ب
ط
٢٠٠
١٥٠
١٠٠
٥٠
٠
و
ز
EpCAM BiTE
EnAd
EnAd-CMV- ز
EnAd-CMV-EpCAMBiTE
EnAd-SA- ز
EnAd-SA-EpCAMBiTE
١
٢
٣



شكل ٤٠ يتبع



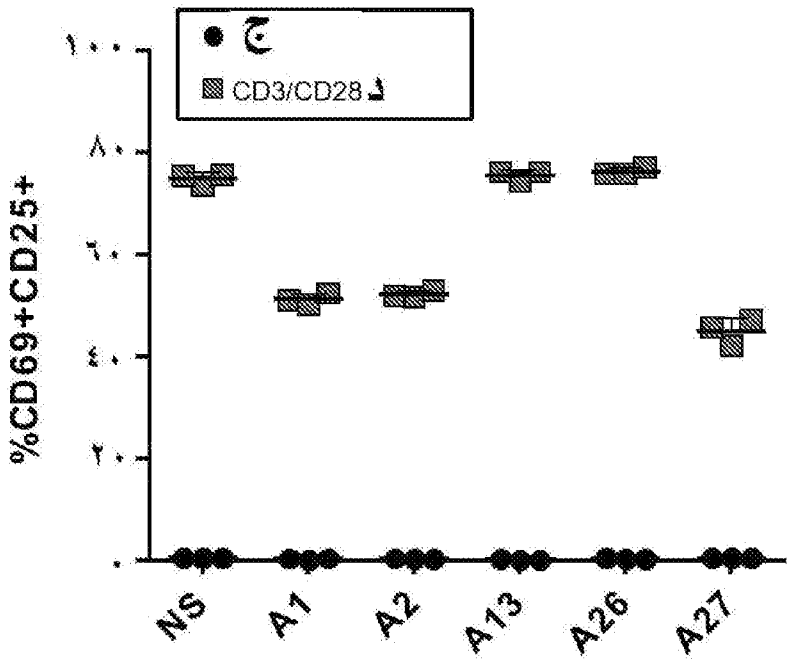
شكل ٤١



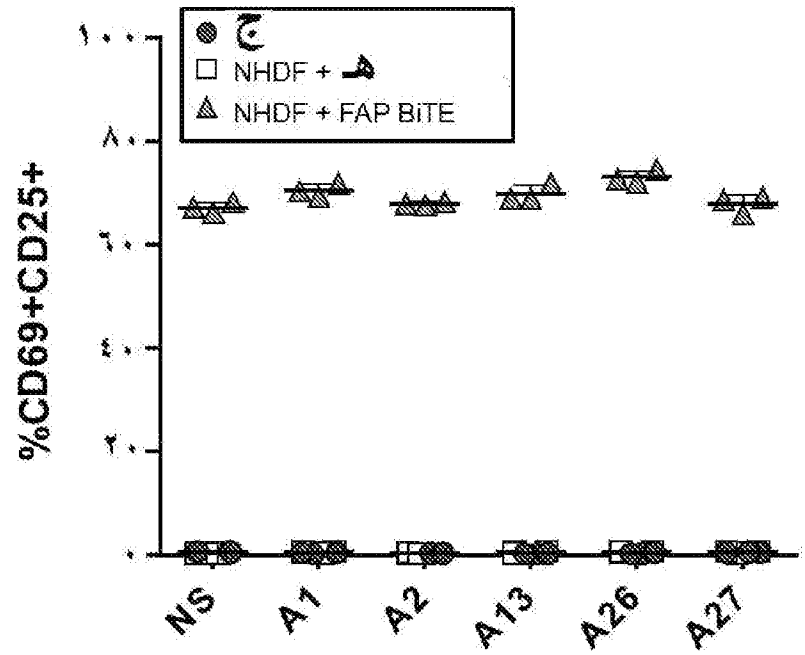
شكل ٤١ يتبع

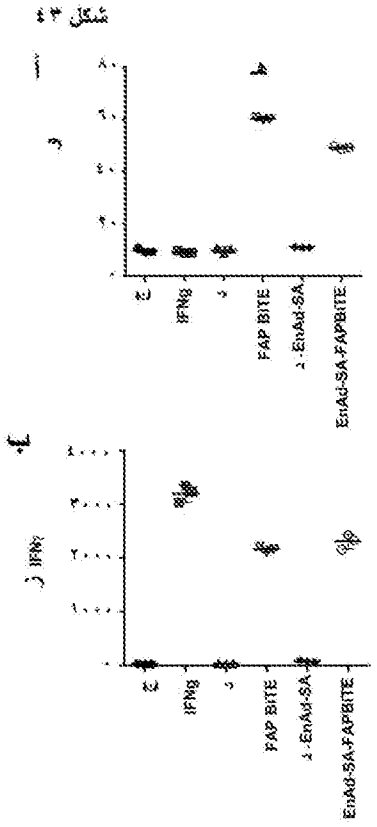
شكل ٤٢

أ

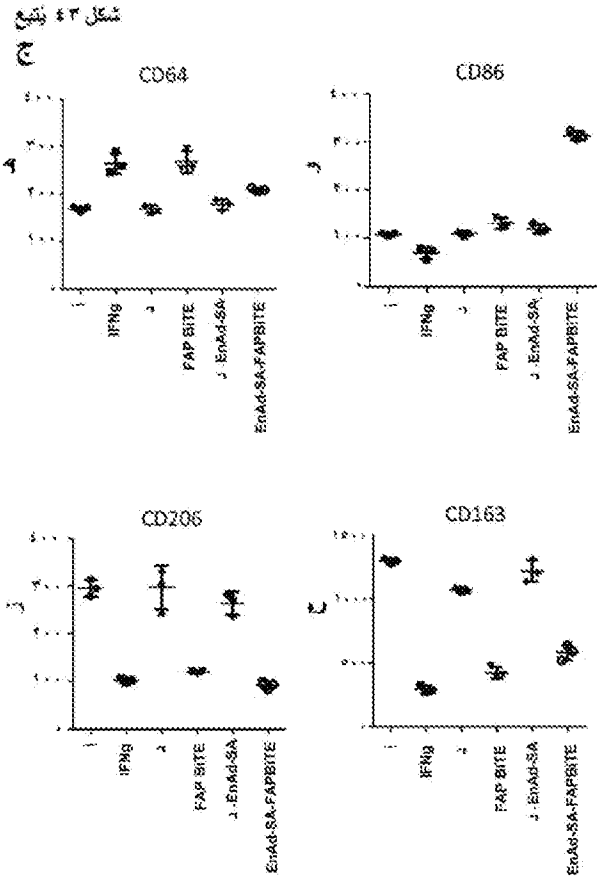

ج
د CD3/CD28
%CD69+CD25+
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
NS
A1
A2
A13
A26
A27

ب

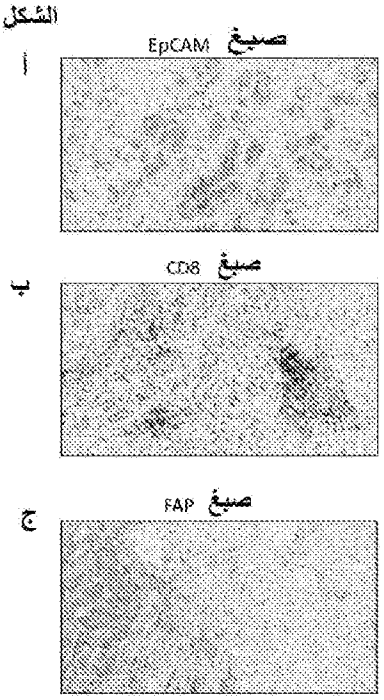

ج
هـ NHDF +
NHDF + FAP BiTE
%CD69+CD25+
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
NS
A1
A2
A13
A26
A27


IFNg
FAP BITE
EnAd-SA
EnAd-SA-FAPBITE

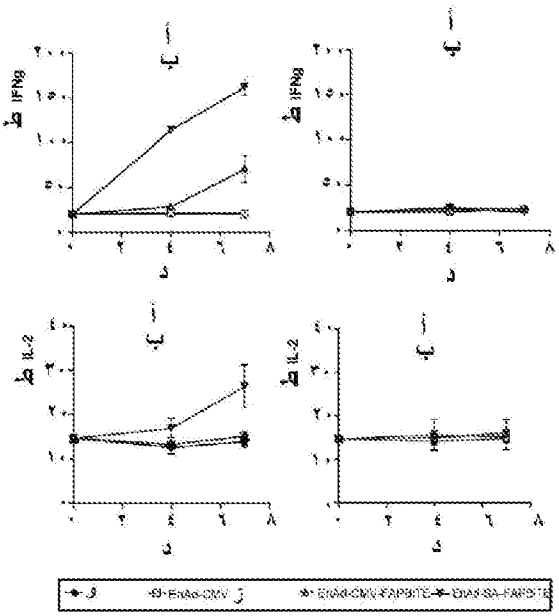
IFNg
FAP BITE
EnAd-SA
EnAd-SA-FAPBITE


CD64
CD86
CD206
CD163
IFNg
FAP BITE
EnAd-SA
EnAd-SA-FAPBITE

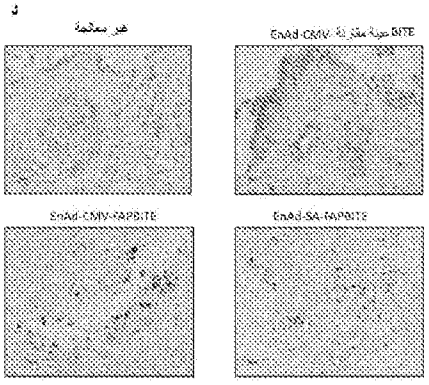
الشكل ٤٤



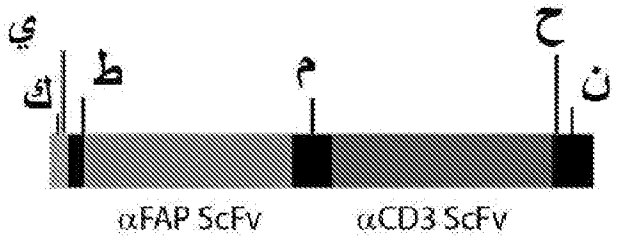
شكل ٤٤



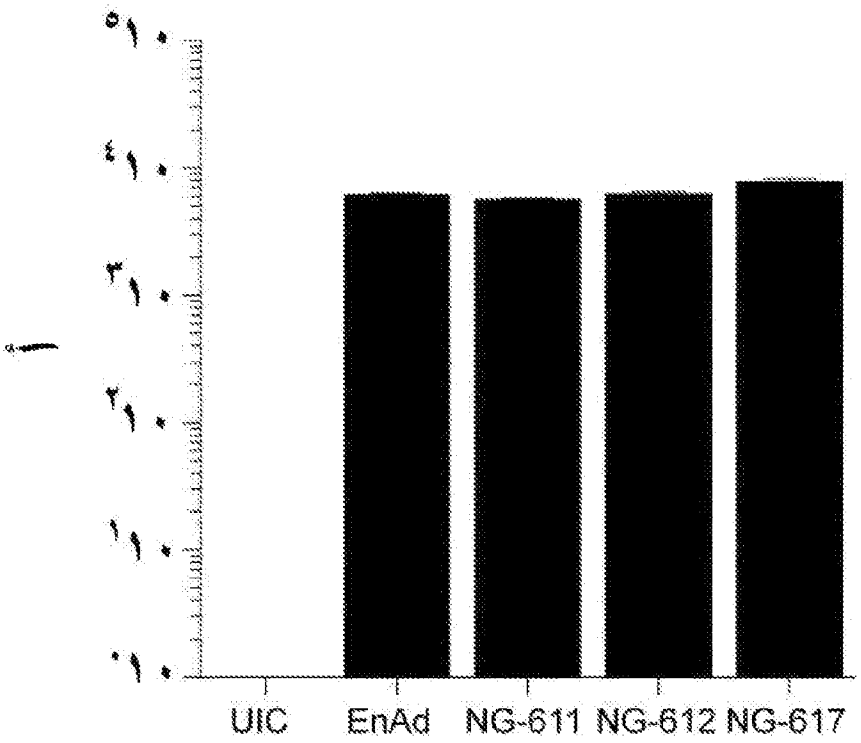
الشكل ٤٤ يتبع



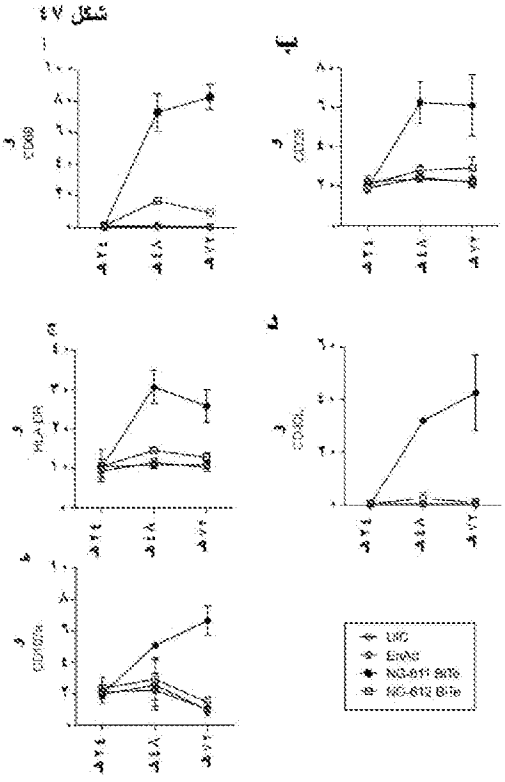
شكل ٤٥


ي
ك
ط
م
ح
ن
αFAP ScFv
αCD3 ScFv

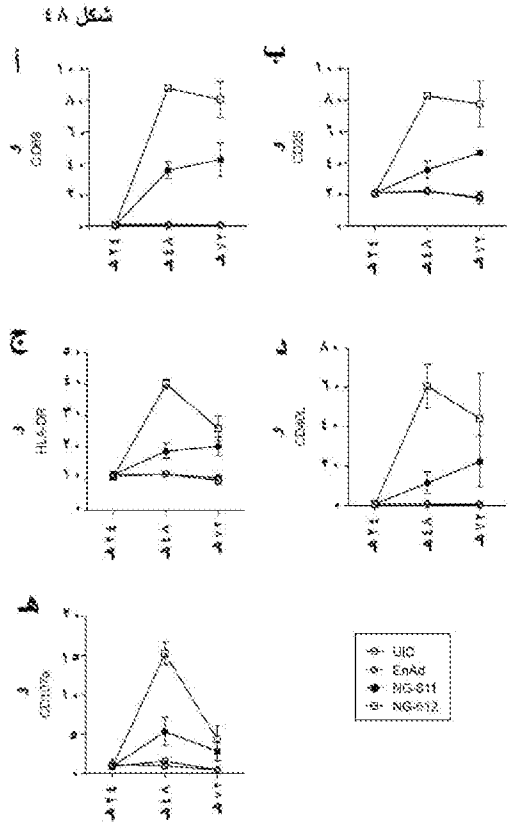
شكل ٤٦


٥١٠
٤١٠
٣١٠
٢١٠
١١٠
٠١٠
UIC
EnAd
NG-611
NG-612
NG-617

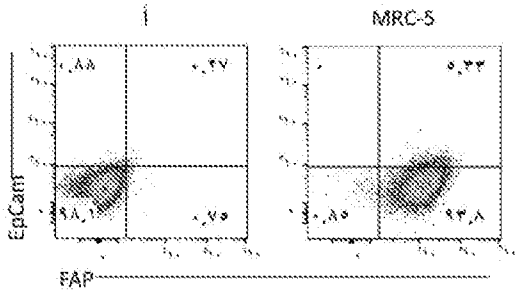
شكل ٤٧



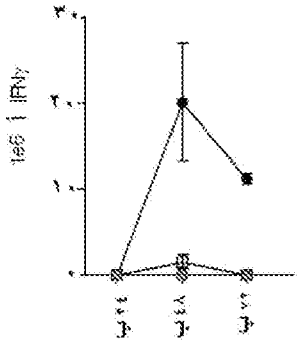
شكل ٤٨



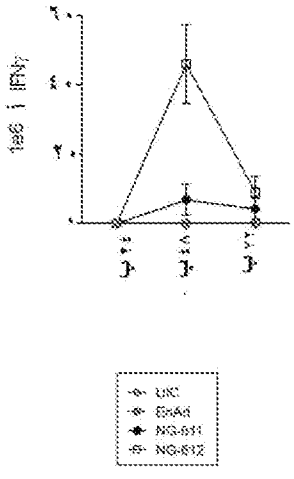
شكل ٤٩



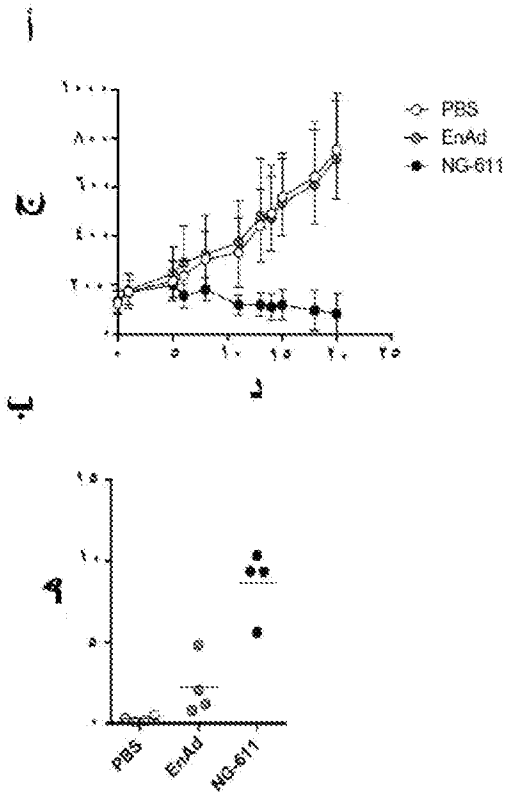
شكل ٥٠أ



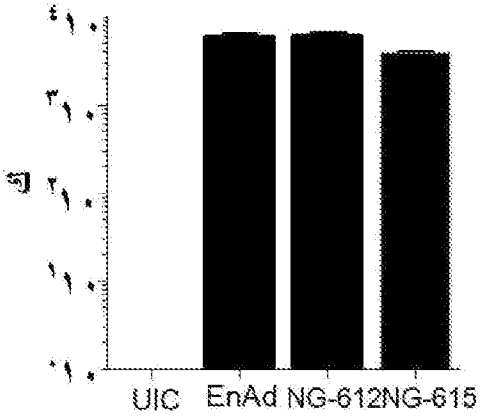
شكل ٥٠ب



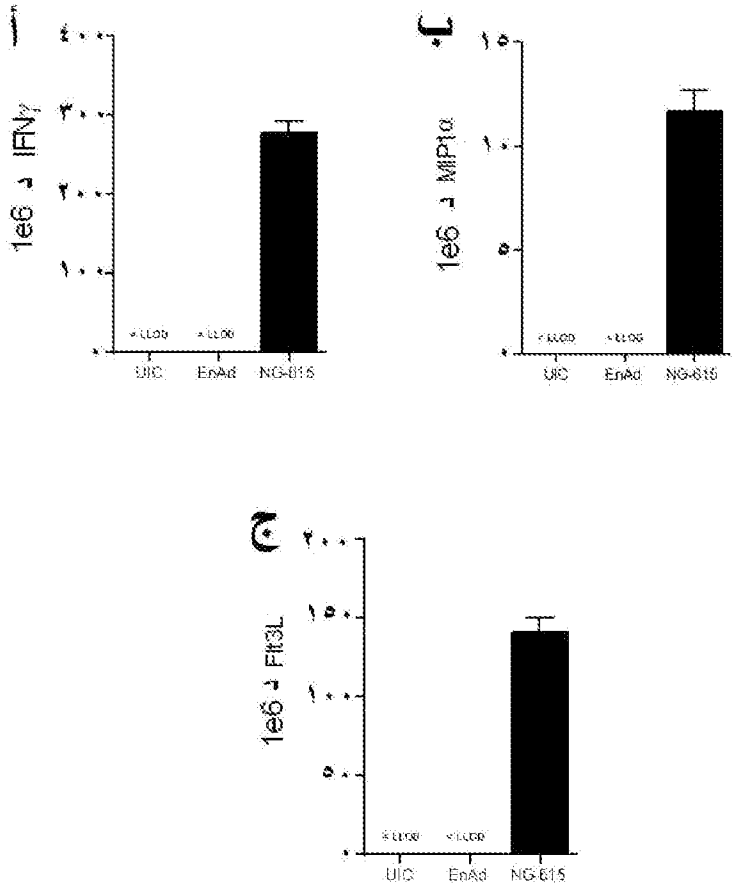
شكل ٥١



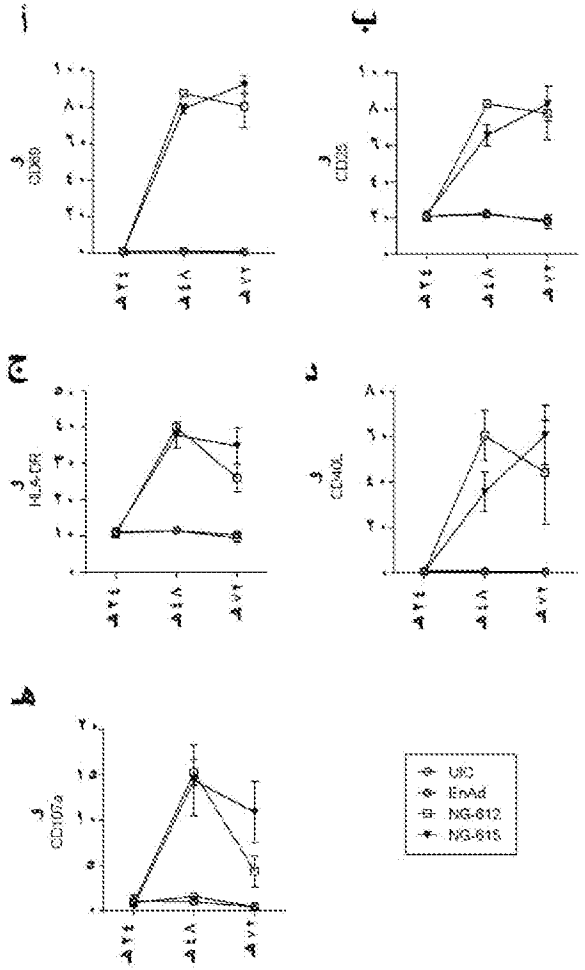
شکل ۵۲


UIC
EnAd
NG-612
NG-615

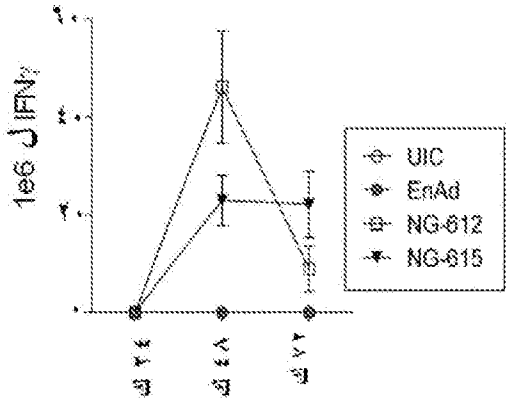
شکل ۵۳


أ
1e6 ل IFNγ
UIC
EnAd
NG-615
ب
1e6 ل MIP1α
UIC
EnAd
NG-615
ج
1e6 ل Flt3L
UIC
EnAd
NG-615

شكل ٤ه



شكل ٥ه



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