المملكة العربية السعودية
Kingdom of Saudi Arabia

الهيئة السعودية للملكية الفكرية
Saudi Authority for Intellectual Property

# براءة اختراع

إن الرئيس التنفيذي للهيئة السعودية للملكية الفكرية وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/27 وتاريخ 1425/05/29هـ والمعدل بقرار مجلس الوزراء رقم 536 وتاريخ 1439/10/19هـ، ولائحته التنفيذية.
يقرر منح:

سيليكتس
Cellectis

**براءة اختراع رقم:** SA 7361

**بتـــاريخ:** 1442/04/29 هـ
**الموافق:** 2020/12/14 م

## عن الاختراع المسمى:

مستقبل مولد المضاد الكيميري المتخصص CD19 وإستخداماته
**CD19 specific Chimeric Antigen Receptor and uses thereof**

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 7361 B

[12] **براءة اختراع**

[45] **تاريخ المنح:** 1442/04/29 هـ
**الموافق:** 2020/12/14 م

[21] رقم الطلب: 515370135
[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: 1437/01/30 هـ
الموافق: 2015/11/12 م
[30] بيانات الأسبقية:
PCT/US2013/040755 US 2013/05/13 م
13/892.805 US 2013/05/13 م
PCT/US2013/040766 US 2013/05/13 م
61/888.259 US 2013/10/08 م
[72] اسم المخترع: جوليان سميث، أندرو شارينبرغ، رومان جاليتو، سيسيل شيفير-مانيوي
[73] مالك البراءة: سيليكتس
عنوانه: 8 ريو دي لا كروا جاري ف-75013 باريس، فرنسا
جنسيته: فرنسية
[74] الوكيل: التميمي ومشاركوه للمحاماة والإستشارات القانونية
[86] رقم الطلب الدولي: PCT/EP2014/059662
تاريخ إيداع الطلب الدولي: 2014/05/12 م
[87] رقم النشر الدولي: WO 2014/184143 A1
تاريخ النشر الدولي: 2014/11/20 م
[51] التصنيف الدولي(IPC[8]):
C07K 014/725, C07K 019/000
C07K 016/028, C12N 015/063
C12N 009/022

[56] المراجع:
WO 2012129514
GRAZYNA LIPOWSKA-BHALLA ET AL: "Targeted immunotherapy of cancer with CART cells: achievements and challenges", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE,val. 61, no. 7, 22 April 2012 (2012-04-22), pages 953-962, XP03507437
PEIPP M ET AL: "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FAGS applications", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, Re Item V val. 285, no. 2, 15 February 2004 (2004-02-15), pages 265-280,XP004491170
Partow Kebriaei ET AL: "Infusing CD19-Directed T Cells to Augment Disease Control in Patients Undergoing Autologous Hematopoietic StemCell Transplantation for Advanced B-Lymphoid Malignancies", Human Gene Therapy, val. 23, no. 5, 1 May 2012 (2012-05-01 ), pages 444-450, XP055130799
Partow Kebriaei ET AL: "Chimeric antibody receptors (CARs): driving Tcell specificity to enhance anti-tumor immunity", Frontiers in bioscience (Scholar edition), 1 January 2012 (2012-01-01 ),page 520, XP055130773

الفاحص: خالد بن أحمد الحازمي

[54] اسم الاختراع: مستقبل مولد المضاد الكيميري المتخصص CD19 وإستخداماته

CD19 specific Chimeric Antigen Receptor and uses thereof

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بمستقبلات مولد مضاد كيميرية CARs. وتكون CARs قادرة على إعادة توجيه تخصص ونوعية الخلايا المناعية ونشاطها تجاه أهداف مختارة باستغلال خصائص نطاق الارتباط بالربيطة. وعلى نحو خاص يتعلق الاختراع الحالي بمستقبل مولد مضاد كيميري يشمل على الأقل نطاق ربط خارج خلوي واحد يرتبط بالربيطة، ويشمل scFV مشتق من جسم مضاد أحادي النسيلة CD19، ويفضل 4G7. يتعلق الاختراع الحالي أيضًا بعديد نيكليوتيد، ونواقل تحمل شيفرة لمستقبل CAR المذكور، وخلايا معزولة تعبر عن CAR المذكور على سطحها. يتعلق الاختراع الحالي بطرق للتعديل الوراثي للخلايا المناعية المعبرة عن 4G7 CAR على سطحها، والتي تعكس حالة "التنشيط" المطولة والممتدة على الخلايا المنقول لها المادة الوراثية. ويستخدم الاختراع الحالي خصيصًا بصورة نافعة في التطبيقات العلاجية مثل علاجات ليمفوما الخلايا بيتا، أو علاجات اللوكيميا.

عدد عناصر الحماية (20)، عدد الأشكال (6)

مستقبل مولد المضاد الكيميري المتخصص CD19 وإستخداماته

CD19 specific Chimeric Antigen Receptor and uses thereof

## الوصف الكامل

### خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمستقبلات مولدات المضاد الكيميري (CAR). يمكن لمستقبلات CARs إعادة توجيه نوعية الخلية المناعية وتفاعليتها نحو هدف محدد باستغلال خصائص النطاق الرابط للرابطة ligand-binding domain.على وجه الخصوص، يتعلق الاختراع الحالي بمستقبل مولد مضاد كيميري يكون فيها الارتباط الخارج خلوي بالرابطة مشتق منscFV مشتق من جسم مضاد لـ CD19أحادي النسيلة، ويفضل 4G7. يتعلق الاختراع الحالي أيضًا بعديدات نيكليوتيد وناقلات تحمل شيفرة لمستقبلات CAR المذكورة، وخلايا معزولة تعبر عن CAR على سطحها. ويتعلق الاختراع أيضًا بطرق للتعديل الوراثي للخلايا المناعية التي تعبر عن 4G7-CAR على سطحها، والتي يشار إليها باعتبارها في حالة "منشطة" مطولة على الخلية المعدلة وراثيًا بنقل الجينات transduced. يعد الاختراع الحالي مفيد خصوصًا في علاج ليمفوما ولوكيميا الخلايا البائية.

يعد العلاج المناعي المقتبس، الذي ينطوي على نقل الخلايا التائية الذاتية مولد المضادالمتولدة خارج الجسم الحي، استراتيجية واعدة لعلاج الالتهابات الفيروسية والسرطان. يمكن توليد الخلايا التائية المستخدمة في العلاج المناعي المقتبس إما عن طريق توسيع الخلايا التائية الخاصة بمولد المضاد أو إعادة توجيه الخلايا التائية من خلال الهندسة الوراثية(Park, Rosenberg et al. 2011). ويعد نقل الخلايا التائية الخاصة بمولدات المضاد الفيروسية إجراء راسخًا يستخدم في علاج العدوى الفيروسية المرتبطة بزرع الأعضاء والأورام الخبيثة النادرة المرتبطة بالفيروس. وبالمثل، فإن العزلة ونقل الخلايا التائية الخاصة بالورم أثبتت نجاحها في علاج سرطان الجلد.

تم توليد نوعية جديدة في الخلايا التائية بنجاح من خلال النقل الجيني لمستقبلات الخلايا التائية المعدلة وراثيا أو مستقبلات مولدات المضاد الكيميري(Jena, Dotti et al. 2010)(CARs). تعد CSRs مستقبلات صناعية تتكون من شق مستهدف، والذي يرتبط بواحد أو أكثر من نطاقات التأشير في في جزيء الدمج المنفرد. وعامة، يتكون شق الارتباط في CAR من نطاق ارتباط بمولد

المضاد للجسم المضاد منفرد السلسلة (scFv)، والذي يشمل على السلسلة الخفيفة والشدفات المتنوعة من الجسم المضاد أحادي النسيلة، مجموعة برابط مرن. وقد تم استخدام شقوق الارتباط القائمة على نطاقات المستقبل أو الرابط بنجاح أيضًا. نطاقات التأشير للجيل الأول من CARs مشتقة من المنطقة السيتوبلازمية من CD3zeta أو من سلاسل جاما Gamma لمستقبلFc. وقد اتضح أن نطاقات التأشير للجيل الأول من CARs تعيد توجيه السمية الخلوية للخلايا التائية بنجاح. ومع هذا، فقد فشلت في تزويد توسع ممتد ونشاط حيوي مضاد للأورام. فقد تمت إضافة نطاقات التأشير من الجزيئات مشتركة الحث والتي تتضمن CD28، وCD134) OX-40 ، و(CD137) 4-1BB ، وحدها (كجيل ثان) أو في مزيج (جيل ثالث) لتعزيز النجاة، وزيادة فرط التكاثر للخلايا التائية معدلة CAR. وقد سمحت CARs بإعادة توجيه الخلايا التائية بنجاح ضد مولدات المضاد المعبر عنها على سطح خلايا الأورام من مصادر خبيثة متنوعة، تتضمن الليمفوما، والأورام الصلبة (Jena, Dotti et al. 2010).

يعد CD19 هدفًا مهما للعلاج المناعي لأن الغالبية العظمى من اللوكيميا اللمفاوية الحادة – B (B-ALL) يتم فيها التعبير المنتظم عن CD19، حيث يغيب هذا التعبير في الخلايا غير المنتجة للدم، وكذلك في الخلايا النخاعية، والخلايا الدرقية، والخلايا التائية، والخلايا الجذعية لنخاع العظم. التجارب السريرية التي تستهدف CD19 على الأورام الخبيثة لخلايا B ما تزال قيد البحث، لكن نتائجها مشجعة للغاية من حيث الاستجابة المضادة للأورام. أغلب الخلايا التائية المسربة معدلة وراثيًا لتعبر عن مستقبلمولد مضاد كيميري(CAR) ذات تخصص نوعي مشتق من منطقة scFv للجسم المضاد أحادي النسيلة FMC63 النوعي للفأر CD19 ( Nicholson, Lenton et al. 1997; Cooper, Topp et al. 2003; Cooper, Jena et al. 2012) (الطلب الدولي رقم: WO2013/126712)، ومع هذا فما تزال هناك حاجة لتحسين بنية CARs بحيث تظهر توافقًا أكبر مع تكاثر الخلايا التائية، وهذا حتى تسمح للخلايا بالتعبير عن CARs هذه لتحقيق الوصول إلى منافع سريرية كبيرة.

**الوصف العام للاختراع**

لقد أنتج المخترعون CAR نوعي مخصص لـ CD19، وهو (4G7-CAR) يشمل scFV مشتقة من الجسم المضاد أحادي النسيلة النوعي CD19، و 4G7، وقد وجد بصورة مفاجآة أن تزويد 4G7-

CAR الناتج على الخلايا التائية الرئيسية يمكن أن يؤدي إلى حالة "منشطة" مطولة" في الخلايا التي ينتقل إليها بصورة مستقلة عن الارتباط بمولد الضد. وعقب التنشيط المعملي غير النوعي (مثلًا باستخدام حبيبات مغلفة بمضاد CD3/CD28، و IL2 مؤتلف)، فقد أظهرت هذه الخلايا زيادة في حجم الخلية (تكوين خلايا انفجارية) علاوة على التعبير عن محددات التنشيط (CD25) خلال فترة ممتدة من الزمن مقارنة بالخلايا التي تم نقل CAR مشابه إليها بحيث تشمل FMC63 scFV. يسمح هذا التنشيط طويل الأمد بتكاثر موسع، ويقدم آلية مستقلة عن مولد المضاد لتمديد وتوسعة خلايا 4G7-CAR معمليًا.

ومن ثم يقدم الاختراع الحالي مستقبلمولد مضاد كيميري يشمل على الأقل نطاق ارتباط ربيطة خارج خلوي واحد، ونطاق عبر غشائي، وعلى الأقل نطاق نقل إشارة واحد، حيث نطاق الارتباط الخارج خلوي المذكور يشمل scFV مشتق من جسم مضاد أحادي النسيلة نوعي 4G7. وخصوصًا أن CAR للاختراع الحالي، بمجرد نقلها إلى الخلية المناعية، تساهم في التنشيط المستقل عن مولد المضاد، وفي تكاثر الخلايا. يتعلق الاختراع الحالي أيضًا بحمض نووي، ونواقل تحمل شيفرة لمستقبلCAR التي تشمل ScFV مشتق من الجسم المضاد أحادي النسيلة4G7 النوعي تجاه CD19، وطرق للتعديل الوراثي للخلايا المناعية، بحيث تشتمل الطرق على تزويدCAR 4G7 بداخل الخلايا المذكورة. ويتعلق الاختراع الحالي أيضًا بخلايا مناعية معدلة وراثيًا للتعبير عن 4G7 على سطحها، وخصوصًا خلايا مناعية، تتكاثر بصورة مستقلة عن آلية مولد المضاد. وتستخدم الخلايا المناعية المعدلة وراثيًا للاختراع الحالي خصيصًا بصورة نافعة في التطبيقات العلاجية مثل علاجات ليمفوما الخلايا البائية، أو علاجات اللوكيميا.

## شرح مختصر للرسومات

الشكل 1:التكاثر الخلوي للخلايا التائية غير المنشطة TCR alpha(KO) المنقول لها المادة الوراثية بناقل 4G7-CAR lentiviral مقارنة بخلايا KOالتائية غير المنقول لها (NTD). تتم تتبع التكاثر الخلوي خلال 30 يومًا بعد (IL2+CD28) أو بغير (IL2) مع خطوة إعادة تنشيط باستخدام مضاد CD28 الذائب .

الشكل 2:تحليل تنشيط التعبير عن مميز CD25 على سطح الخلايا التائية غير المنشطة TCR alpha المنقول لها المادة الوراثية بناقل 4G7-CAR lentiviral، المبوبة على أساس التعبير عن (CAR+, CAR-) 4G7-CAR، ومقارنة بالتعبير عن CD25 على خلايا موجبة TCR alpha غير مثقبة كهربيًا(NEP) ، أو خلايا مضطربة TCR alpha، لكن غير منقول لها المادة الوراثية (NTD). تم تحليل التعبير عن CD25 بعد (IL2+CD28) أو بغير (IL2) مع خطوة إعادة تنشيط باستخدام مضاد CD28 الذائب .

الشكل 3: تحليل التعبير عنCAR على سطح الخلايا التائية المنقول لها المادة الوراثية بناقل lentiviralيحمل شيفرة إلى 4G7-CARأو إلىFMC63-CAR . تم إجراء التحليل عند 3 و 8 و 15 يومًا بعد نقل المادة الوراثية من خلال التدفق الخلوي. يشير NT إلى الخلايا التائية التي لم تنقل لها المادة الوراثية.

الشكل 4: تحليل التعبير عن CD25 على سطح الخلايا التائية المنقول لها المادة الوراثية بناقل lentiviralيحمل شيفرة إلى 4G7-CARأو إلىFMC63-CAR . تم إجراء التحليل عند 3 و 8 و 15 يومًا بعد نقل المادة الوراثية من خلال التدفق الخلوي. يشير NT إلى الخلايا التائية التي لم تنقل لها المادة الوراثية.

الشكل 5: التحليل الحجمي للخلايا التائية المنقول لها المادة الوراثية بناقل lentiviralيحمل شيفرة إلى 4G7-CARأو إلىFMC63-CAR . تم إجراء التحليل عند 3 و 8 و 15 يومًا بعد نقل المادة الوراثية من خلال التدفق الخلوي. يشير NT إلى الخلايا التائية التي لم تنقل لها المادة الوراثية.

الشكل6: تكاثر الخلايا التائية المنقول لها 4G7-CAR مقارنة بـ FMC63 من خلال ناقل lentiviral. تمت متابعة التكاثر لمدة 20 يومًا عقب (CD28) أو بدونه (-)مع خطوة إعادة تنشيط باستخدام مضاد CD28الذائب.يشير NT إلى الخلايا التائية التي لم تنقل لها المادة الوراثية.

**<u>الوصف التفصيلي:</u>**

ما لم يتم التعريف بشكل محدد هنا، فإن جميع المصطلحات التقنية والعلمية المستخدمة لها نفس المعنى الذي يفهمه عادةً المتخصصون المهرة في نطاقات العلاج الجيني، والكيمياء الحيوية، وعلم الوراثة، والبيولوجيا الجزيئية.

يمكن استخدام جميع الطرق والمواد المشابهة أو ما يعادلها من المواد والطرق الموصوفة هنا في تطبيق أو اختبار الاختراع الحالي، مع الطرق والمواد المناسبة الموصوفة هنا. جميع المنشورات، طلبات براءات الاختراع، براءات الاختراع، وغيرها من المراجع المذكورة هنا تم إدراجها بكامل محتواها هنا. في حالة التعارض، ستسود المواصفات الحالية، بما في ذلك التعريفات. علاوة على ذلك، فإن المواد والطرق والأمثلة الواردة هنا توضيحية فقط ولا يقصد منها أن تكون محددة للاختراع ، ما لم ينص على خلاف ذلك.

يستخدم في تطبيق الاختراع الحالي التقنيات التقليدية للخلايا في الأحياء – ما لم يوضح خلاف ذلك– وزراعة الخلايا، والأحياء الجزيئية، وأحياء نقل الجينات الوراثية، وعلم الكائنات الدقيقة، و DNAالمؤتلف، وعلوم المناعة، وهو مما يعد في نطاق المهارة العادية في الفن. وهذه التقنيات مشروحة تفصيلًا في المراجع، ومنها على سبيل المثال Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames& S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds.–in–chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols.154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular

Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring و ؛C. Blackwell, eds., 1986) .Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)

مستقبل مولد المضاد CD19 الكيميري النوعي

يتعلق الاختراع الحالي بمستقبل مولد مضاد كيميري (CAR) تشمل نطاق ارتباط ربيطة خارج خلوي، ونطاق نقل إشارة.

المصطلح " نطاق ارتباط بربيطة خارج خلوي" يستخدم هنا كما يتم تعريفه باعتباره قليل ببتيد أو عديد ببتيد قادر على الارتباط بربيطة. ويفضل نطاق يكون قادر على التفاعل مع جزيء سطح الخلية. على سبيل المثال يمكن أن يتم اختيار نطاق ارتباط بربيطة خارج خلوي ليتعرف على الربيطة التي تعمل كواسمة على سطح الخلية للخلية المستهدفة فيما يتعلق بحالة مرضية معينة خصيصًا.

في تجسيد مفضل، يشمل نطاق الارتباط بربيطة الخارج خلوي على شدفة سلسلة منفردة من جسم مضاد(scFv) تشمل الشدفات المتنوعة الخفيفة(VL) ، والثقيلة (VH) لمولد المضاد المستهدف النوعي للجسم المضاد أحادي النسيلة مجموعة برابط مرن. وفي تجسيد مفضل تكونscFV المذكورة مشتقة منجسم مضاد 4G7أحادي النسيلةCD19 (Peipp, Saul et al. 2004)، ويفضل scFV المذكور للاختراع الحالي يشمل جزء من السلسلة الثقيلة غاما 1 للغلوبيولين المناعي من الجسم المضاد 4G7 أحادي النسيلة(GenBank: CAD88275.1؛ سياق برقم تعريف 1) وجزء من سلسلة كابا الخفيفة للغلوبيولين المناعي من الجسم المضاد 4G7أحادي النسيلة CD19 (GenBank: CAD88204.1؛ سياق برقم تعريف2)، ويفضل مرتبطان سويًا من خلال رابط مرن. وفي تجسيد مفضل يشمل scFV المذكور للاختراع الحالي على شدفات متنوعة من السلسلة الثقيلة غاما 1 للغلوبيولين المناعي من الجسم المضاد 4G7أحادي النسيلة CD19 (تميز السياق رقم 3)، وعلى شدفات متنوعة من سلسلة كابا الخفيفة للغلوبيولين المناعي من الجسم المضاد

4G7 أحادي النسيلة CD19 (سياق برقم تعريف 4 أو سياق برقم تعريف 5) مرتبطان سويًا برابط مرن. وفي تجسيد خاص يشملس الرابط المرن بسيق حمض أميني (سياق برقم تعريف 6).

بعبارة أخرى، يشمل CAR المذكور على نطاق ارتباط ربيطة خارج خلوي والذي يشمل على سلسلة FV منفردة مشتقة من الجسم المضاد 4G7أحادي النسيلة النوعي ضد CD19. وفي تجسيد مخصص، يشمل scFV المذكور على جزء من سياقات الحمض الأميني المختارة من مجموعة تتكون من سياق برقم تعريف 1 إلى 5. وفي تجسيد مفضل تشمل scFVله تطابق سياق يبلغ على الأقل 70%، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، 95، 97%، أو 99%، مع سياق الحمض الأميني يتم اختياره من مجموعة تتكون من سياق برقم تعريف 7 وسياق برقم تعريف 8.

نطاق نقل التأشير أو نطاق التأشير الداخل خلوي لمستقبلCAR وفقًا للاختراع الحالي يكون مسؤولًا عن التأشير الداخل خلوي عقب ارتباط نطاق الارتباط بالربيطة الخارج خلوي بالهدف، مما ينتج عنه تنشيط الخلية المناعية والاستجابة المناعية. بعبارة أخرى، فإن نطاق نقل الإشارة يكون مسؤولًا عن تنشيط على الأقل واحد من وظائف المفعلات الطبيعية للخلايا المناعية التي يتم فيها التعبير عن CAR. على سبيل المثال وظيفة المفعل للخلية التائية يمكن أن تكون نشاط محلل للخلية أو نشاط مساعد يتضمن إفراز السيتوكينات cytokines. ومن ثم فإن المصطلح "نطاق ناقل للإشارة" يشير إلى جزء من بروتين ينقل وظيفة إشارة التفعيل، ويوجه الخلية نحو إجراء وظيفة متخصصة.

الأمثلة المفضلة للنطاق الناقل للإشارة للاستخدام في مستقبلات CAR يمكن أن يكون السياق السيتوبلازمي لمستقبل الخلايا التائية والمستقبلات المشاركة التي تعمل في تناغم لبدء نقل الإشارة عقب ارتباط المستقبل بمولد المضاد، علاوة على أي مشتق أو شكل مغاير من هذه السياقات، وأي سياق صناعي يتميز ببعض القدرة الوظيفية. يشمل نطاق نقل الإشارة على طائفتين مميزتين من سياقات التأشير السيتوبلازمي، وهما ذلك الذي يبدأ التنشيط الأولي التابع لمود المضاد، وذلك الذي يعمل بطريقة مستقلة عن مولد المضاد لتزويد إشارة ثانوية أو إشارة حس مشتركة. يمكن أن يشمل سياق التأشير السيتوبلازمي الأولي على أجزاء تأشير، وهي معروفة باعتبارها أجزاء تنشيط المستقبل المناعية القائمة على tyrosine من ITAMs. ITAMs عبارة عن أجزاء تأشير معرفة جيدًا توجد في الذيل الداخل سيتوبلازمي للعديد من المستقبلات المتنوعة التي تخدم موقع الارتباط

من طائفة syk/zap70 لإنزيمات tyrosine kinases. يمكن أن تتضمن امثلة ITAM المستخدمة في الاختراع على سبيل المثال لا الحصر تلك المشتقة من TCRzeta، أو FcRgamma، أو FcRbeta، أو FcRepsilon، أو CD3gamma، أو CD3delta، أو CD3epsilon، أو CD5، أو CD22، أو CD79a، أو CD79b، أو CD66d. وفي تجسيد مفضل فإن نطاق نقل الإشارة من CAR يمكن أن يشمل نطاق تأشير CD3zeta، والذي يتميز بسياق حمض أميني له تطابق سياق يبلغ على الأقل 70%، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، 95%، 97%، أو 99% مع سياق الحمض الأميني يختار من مجموعة تتكون من (سياق برقم تعريف: 10).

وفي تجسيد مفضل فإن نطاق نقل الإشارة من CAR من الاختراع الحالي يشمل جزيء حث مشترك للإشارة. جزيء الحس المشترك هو جزيء سطح خلية غير مستقبلات مولد المضاد و ربيطاتها، وهو ضروري للاستجابة المناعية الفعالة. تشير "ربيطة حس مشترك" إلى جزيء على الخلية المقدمة لمود المضاد، يرتبط خصيصًا بجزيء قريب من جزيء الحث المشترك على الخلايا التائية، ومن ثم يقدم إشارة والتي بالإضافة إلى الأشارة الرئيسية المقدمة من جانبها، على سبيل المثال الارتباط بمعقد TCR/CD3 مع جزيء MHC المحمل بالببتيد، ينشأ استجابة الخلايا التائية، والتي تتضمن على سبيل المثال لا الحصر، تنشيط التكاثر، والتمايز، وما شابه. ويمكن أن تتضمن ربيطة الحث المشترك على سبيل المثال لا الحصر (CD80) B7-1, CD7، أو B7-2 (CD86)، أو PD-L1، أو PD-L2، أو 4-1BBL، أو OX40L، أو ربيطة الحث المشتركة المستحثة (ICOS-L)، أو جزيء الالتصاق الداخل خلوي (ICAM، أو CD30L، أو CD40، أو CD70، أو CD83، أو HLA-G، أو MICA، أو M1CB، أو HVEM، أو مستقبلاالليمفوتوكسين بيتا، أو 3/TR6، أو ILT3، أو ILT4، أو مناهض أو جسم مضاد يرتبط بمستقبل ربيطة Toll، وربيطة ترتبط خصيصًا بـ B7-H3). تتضمن ربيطة الحث المشترك أيضًا، بالتبادل فيما بينها، جسم مضاد يرتبط خصيصًا بجزيء حث مشترك مقدم على الخلايا التائية، يتضمن مثلًا على سبيل المثال لا الحصر CD27، أو CD28، أو 4-1BB، أو OX40، أو CD30، أو CD40، أو PD-1، أو ICOS، أو مولد المضاد المرتبط بوظيفة خلايا اللمف - 1 (LFA-1)، أو CD2، أو CD7، أو LTGHT، أو NKG2C، أو B7-H3، أو ربيطة ترتبط خصيصًا بـ CD83.

يشير "جزيء الحث المشترك" إلى شريك ارتباط قريب على الخلايا التائية، حيث يرتبط خصيصًا بربيطة حث مشترك، ومن ثم يبدأ استجابة حث مشترك من خلال الخلية، ومنها مثلًا على سبيل المثال لا الحصر: التكاثر الخلوي. وتتضمن جزيئات الحث المشترك على سبيل المثال لا الحصر طائفةI من جزيئاتMHC، ومستقبل ربيطة Toll. وتتضمن أمثلة جزيئات الحث المشترك CD27، أو CD28، أو 4-1BB، أو OX40، أو CD30، أو CD40، أو PD-1، أو ICOS، أو مولد المضـــاد المرتبط بوظيفة خلايا اللمف - 1 (LFA-1)، أو CD2، أو CD7، أو LTGHT، أو NKG2C، أو B7-H3، أو ربيطة ترتبط خصيصًا بـ CD83 وما شابه.

في تجسيد مفضل، يشمل نطاق نقل الإشارة لمستقبلCAR للاختراع الحالي على جزء من جزيء الحث المشـــترك المختـار من مجموعـة تتكون من شـــدفـة من :GenBank) 4-1BB (.AAA53133، و(NP_006130.1) CD28. وخصـــوصًـــا يشـــمل نطاق نقل الإشـــارة من مســـتقبلCAR من الاختراع الحالي ســياق حمض أميني، والذي له تطابق ســياق يبلغ على الأقل 70%، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، 95%، 97%، أو 99% مع ســياق الحمض الأميني يتن اختياره من مجموعة من تتكون من ســياق برقم تعريف: 11، وســياق برقم تعريف: 12.

يتم التعبير عن CAR للاختراع الحالي على سطح الغشاء الخلوي. ومن ثم يمكن أن يشمل CAR على نطاق عبر غشـائي. الخصـائص المميزة للنطاق العبر غشـائي المناسـب تشـمل القدرة على التعبير عنه على سـطح الخلية، ويفضـل في الاختراع الحالي أن تكون الخلية مناعية، وخصـوصًـا خلايا اللمف أو خلايا القاتلات الطبيعية (NK)، وأن يتفاعلا سويًا لتوجيه الاستجابة الخلوية للخلية المناعية ضد خلية هدف محددة مسبقًا. يمكن أن يكون النطاق عبر الغشائي مشتق إما من مصدر طبيعي أو مخلق. يمكن أن يكون النطاق عبر الغشـائي مشـتق من أي بروتين مرتبط بالغشـاء أو عبر غشـائي. وعلى سـبيل الأمثلة لا بغرض الحصـر، يمكن أن يكون عديد الببتيد عبر الغشـائي وحدة فرعية من مستقبل الخلايا التائية مثل α, β, γ أو ، أو عديد ببتيد يتكون من معقد CD3 أو مسـتقبلIL2 p55 (سـلسـلة α)، أو p75 (سـلسـلة β) أو سـلسـلة γ، أو وحدة فرعية من سـلسـلة مسـتقبلا Fc، وخصـوصًـا مسـتقبلIII Fcγ، أو بروتينات CD. وبالتبادل يمكن أن يكون البروتين عبر الغشائي مخلق، ويمكن أن يشمل شقات كارهة للماء بصورة سائدة مثل leucine، وvaline.

وفي تجسيد مفضل فإن النطاق عبر الغشائي يكون مشتق من خلايا سلسلة CD8 alpha بشرية (مثل NP_001139345.1). ويمكن أن يشمل النطاق عبر الغشائي منطقة سويقة فيما بين نطاق الارتباط بالربيطة الخارج خلوي المذكور، والنطاق عبر الغشائي. المصطلح "منطقة سويقة" يستخدم هنا عامة ليعني أي قليل ببتيد او عديد ببتيد يعمل في وظيفة الربط بين النطاق عبر الغشائي وبين نطاق الارتباط بالربيطة الخارج خلوي. وخصوصًا فإن مصطلح منطقة السويقة، يستخدم هنا ليقدم مرونة أكبر و قابلية وصول لنطاق الارتباط بالربيطة الخارج خلوية، وتشمل منطقة السويقة ما يقرب من 300 حمض أميني، ويفضل من حوالي 10 إلى 100 حمض أميني، والأكثر تفضيلًا من 25 إلى 50 حمض أميني. ويمكن أن تكون منطقة السويقة مشتقة كليًا أو جزئيًا من جزيئات موجودة بصورة طبيعية، مثل أن تكون مشتقة كليًا أو جزئيًا من المنطقة الخارج خلوية CD8، أو CD4، أو CD28، أو مشتقة كليا أو جزئيًا من المنطقة الثابتة للجسم المضاد. وبالتبادل يمكن ان تكون منطقة السويقة سياقًا صناعيًا يناظر سياق سويقة موجود بصورة طبيعية، أو قد تكون عبارة عن سياق سويقة صناعي بالكامل. وفي تجسيد مفضل، تكون منطقة السويقة المذكورة عبارة عن سلسلة CD8 alpha بشرية (مثل NP_001139345.1). وفي تجسيد آخر مخصص، فإن النطاقات عبر الغشائية، والنطاقات المفصلية تشمل جزء من سلسلة CD8 alpha بشرية، ويفضل التي لها تطابق سياق يبلغ على الأقل على 70 %، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، 95%، 97%، أو 99% مع سياق الحمض الأميني الذي يتم اختياره من مجموعة متكونة منسياق برقم تعريف: 13.

وفي تجسيد مخصص، فإن مستقبلمولد المضاد الكيميري المذكور في الاختراع الحالي تشتمل على scFV مشتق من جسم مضاد 4G7أحادي النسيلةCD19، ومن نطاق مفصلي وعبر غشائي من CD8 alpha البشري، ونطاق إشارة CD3 zeta، ونطاق إشارة 4-1BB. ويفضل أن يكون لـ4G7 CARوفقا للاختراع الحالي تطابق يبلغ على الأقل على 70 %، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، 95%، 97%، أو 99% مع سياق الحمض الأميني المختار من مجموعة متكونة من سياق برقم تعريف: 14 و 15.

عادة ما يتم ملاحظة نقص التحكم أو الإطفار لمولد المضادات المستهدفة في خلايا السرطان، مما يخلق إفلات أشكال مغايره بفقد مولد المضاد. ومن ثم لإيقاف قدرة الورم على الإفلات escape،

ولجعل الخلية المناعية أكثر نوعية ضد أهداف بعينها، يمكن لـــ CAR النوعية ضد CD19 أن تشمل نطاقات ارتباط بربيطة خارج خلوية أخرى، لترتبط بالتزامن بعناصر مختلفة في الهدف، ومن ثم تزيد من تنشيط الخلية المناعية ووظيفتها. وفي أحد التجسيدات، يمكن وضع نطاقات الارتباط بالربيطة الخارج خلوية بالتزامن على نفس عديد الببتيد عبر الغشائي، واختياريا يمكن فصلها برابط. وفي تجسيد آخر، يمكن وضع نطاقات الارتباط بالربيطة الخارج خلوية المختلفة المذكورة على عديد ببتيد عبر غشائي مختلف مكون لمستقبل CAR. وفي تجسيد آخر، يتعلق الاختراع الحالي بمجموعة CARs يشمل كل منها نطاق واحد من نطاقات الارتباط بالربيطة الخارج خلوية. وخصوصًا يتعلق الاختراع الحالي بطريقة للتعديل الوراثي للخلايا المناعية التي تشمل على تزويد الخلية المناعية، والتعبير على سطح الخلية المذكورة عن مجموعة CAR حيث يشمل كل واحد نطاقات ارتباط بربيطة خارج خلوية مختلفة. وفي تجسيد آخر، يتعلق الاختراع الحالي بطريقة للتعديل الوراثي لخلية مناعية تشمل توفير الخلية المناعية وإدخال عديدات نيكليوتيدتحمل شيفرة لعديد الببتيد المكون لمجموعةCAR إلى هذه الخلية، حيث كل مستقبل واحدة تشمل على نطاقات ارتباط بربيطة خارج خلوية مختلفة. ونعني بمصطلح مجموعةCARs على الأقل اثنين أو ثلاثة أو أربعة أو خمسة أو ستة أو أكثر من CARs، حيث كل مستقبل واحد يشمل نطاقات ارتباط بربيطة خارج خلوية مختلفة. ويمكن أن تكون نطاقات الارتباط بربيطة خارج خلوية مختلفة وفقًا للاختراع الحالي متزامنة الارتباط بعناصر مختلفة في الهدف، وهذا بصورة مفضلة، ومن ثم تزيد تنشيط الخلية المناعية ووظيفتها. ويتعلق الاختراع الحالي أيضًا بخلية مناعية معزولة والتي تشمل مجموعة من CARs، حيث كل مستقبل واحدة تشمل على نطاقات ارتباط بربيطة خارج خلوية مختلفة.

عديدات النيكليوتيد والنواقل:

يتعلق الاختراع الحالي بعديد نيكليوتيد، وناقل يحمل شيفرة لـــ CAR الموصوف فيما سبق وفقًا للاختراع. وفي تجسيد مفضل، يتعلق الاختراع الحالي بعديد نيكليوتيد يشمل سياق الحمض النووي برقم تمييز السياق 17. وفي تجسيد مفضل يتميز عديد النيكليوتيد بتطابق سياق يبلغ على الأقل على 70 %، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، 95%، 97%، أة 99% مع سياق الحمض الأميني الذي يتم اختياره من مجموعو مكونة من سياق برقم تعريف 17.

قد يتكون عديد النيكليوتيد من قالب تعبير expression cassetteأو ناقل تعبير expression vector(مثلًا بلازميد لتزويده في خلية عائل بكتيرية، أو ناقل فيروســـي مثل ناقل baculovirus لنقل المادة الوراثية لخلية حشـرة مضـيفة أو بلازميد أو ناقل فيروسـي مثل lentivirus لنقل المادة الوراثية لخلية ثديية مضيفة).

وفي تجسيد خاص، يمكن أن يتم تضمين سياقات الحمض النووي المختلفة في عديد نيكليوتيد واحد أو في ناقل يشتمل على سياق حمض نووي يحمل شيفرة إلى سياق تجاوز الريبوسوم مثل السياق الذي يحمل شـــيفرةللبتيد2A. البتيدات2A والتي تم التعرف عليها في المجموعة Aphthovirus وهي مجموعة فرعية من picornaviruses، وتسبب "تجاوز" الريبوسومات بسبب كودون codon تالي فيها، وهذا بغير تكوين رابط ببتيدي فيما بين الحمضـــين الأمينيين المرمز إليهما بالكودونين (راجع ( Donnelly and Elliott 2001; Atkins, Wills et al. 2007; Doronina, Wu et al. 2008)). وبالمصـــطلح "كودون" نعني هنا ثلاثة نيكليوتيدات على جزئ mRNA (أو جزء الحس من جزيء DNA) والذي يتم ترجمته من خلال الريبوسـوم إلى شـق حمض أميني. ومن ثم، فإن جزئي عديد الببتيد يمكن أن يتم تصـنيعهما من خلال إطار قراءة مفتوح مجاور منفرد ضـمن جزيء mRNA، وهذا عندما يتم فصل عديدات الببتيد بسياق قليل ببتيد 2A ضمن الإطار. وآلية تجاوز الريبوســوم هذه تعد طريقة معروفة في النطاق، ومشــهورة باســتخدامها من قبل العديد من الناقلات للتعبير عن العديد من البروتينات التي يحمل شـيفرة لها على جزيء RNA رسـول واحد. لتوجيه عديد الببتيد عبر الغشائي إلى الطريق الإفرازي للخلية المضيفة، يتم تزويد سياق إشارة إفراز (ويعرف أيضًـا باسـم السـياق القائد، أو السـياق التحضـيري، أو السـياق السـابق) في سـياق عديد نيكليوتيد أو سـياق ناقل. سـياق إشـارة الإفراز يرتبط بصـورة عاملة مع سـياق الحمض النووي عبر الغشـائي، أي أن السـياقين يجتمعان في إطار القراءة الصـحيح، ويتموضـعان لتوجيه عديد الببتيد المصـنع حديثًا إلى الطريق الإفرازي للخلية المضـيفة. سـياقات الإشـارة الإفرازية تتموضـع عامة في الموضع 5’ من سياق الحمض النووي الذي يحمل شيفرة لعديد الببتيد المهم، وعلى الرغم من ذلك، فأن بعض سـياقات الإشـارة الإفرازية قد تتموضـع في مكان آخر من سـياق الحمض النووي المهم (راجع مثلا Welch et al., U.S. Patent No. 5,037,743; Holland et al., U.S.

Patent No. 5,143,830). وفي تجسيد مفضل، يشتمل ببتيد الإشارة على سياق الحمض الأميني بسياق برقم تعريف 18 و 19.

وسيعرف الماهر بالمجال أنه، في ضوء تحلل الشفرة الوراثية، يكون التباين الكبير في السياق ممكنًا بين جزيئات عديد النيكليوتيد هذه. وفي صورة مفضلة، تكون سياقات الحمض النووي للاختراع الحالي محسّنة للكودون للتعبير في خلايا الثدييات، ويفضل التعبير عنها في الخلايا البشرية. يشير مصطلح تحسين كودون إلى التبادل في سياق من الكودوناتالمهمة التي عادة ما تكون نادرة في الجينات المعبر عنها بدرجة عالية من نوع معين بواسطة الكودونات التي عادة ما تكون متكررة في جينات عالية التعبير من مثل هذه الأنواع، مثل هذهالكودونات التي تحمل شيفرة للأحماض الأمينية باعتبارها الكودونات التي يتم تبادلها.

في تجسيدات مفضلة، يشمل عديد الببتيد للاختراع الحالي سياق حمض أميني مختار من مجموعة تتكون من سياق برقم تعريف 17. يتعلق الاختراع الحالي بعديد نيكليوتيد يشمل على سياق حمض نووي له تطابق يبلغ على الأقل 70 %، ويفضل على الأقل 80%، ويفضل أكثر على الأقل 90%، أو 95%، أو 97% أو 99% مع سياق الحمض الأميني مختار من مجموعة من سياق برقم تعريف 17.

طرق التعديل الوراثي للخلية المناعية:

في تجسيد محدد شامل، يتعلق الاختراع بطريقة تحضير الخلايا المناعية للعلاج المناعي وتشمل تزويدCAR في الخلايا المناعية المذكورة وفقاً للاختراع الحالي وتوسيع الخلايا المذكورة. في تجسيد معين، يتعلق الاختراع بطريقة تعديل وراثي لخلية مناعية تشمل على تزويد خلية والتعبير على سطح الخلية المذكورة على الأقل عن مستقبلCAR واحدة كما هو موضح أعلاه. في تجسيد خاص، تشمل الطريقة على تحويل الخلية بواحدة على الأقل من عديدات النيكليوتيد التي تحمل شيفرة لمستقبلCAR كما هو موضح أعلاه، والتعبير عن عديدات النيكليوتيد المذكور في الخلية المذكورة.

في تجسيد مفضل، يتم تضمين عديد النيكليوتيد المذكور في نواقل فيروسية بطيئة lentiviral من وجهة نظر أنه يتم التعبير عنها بصورة مستقرة في الخلايا.

في تجسيد آخر فإن الطريقة المذكورة تشمل أيضًا خطوة التعديل الوراثي للخلية المذكورة من خلال إزالة تنشـــيط جين واحد على الأقل للتعبير عن أحد مكونات TCR، وهو هدف للعوامل المثبطة للمناعة. وجين HLA، و/أو جين نقطة التحقق المناعية مثل PDCD1 أو CTLA-4. وفي تجســـيد مفضـــل، فإن الجينات المذكورة تكون مختارة من مجموعة تتكون من TCRalpha، وTCRbeta، وCD52 ، وGR، و PD1 ، وCTLA-4 . وفي تجسيد مفضل تشمل الطريقة المذكورة أيضًـــا تزويد إنزيم rare-cutting endonuclease نادر القطع إلى الخلايا التائية المذكورة، والقادر على إزالة التنشـــيط الانتقائي من خلال الفصـــل الوراثي DNA لهذه الجينات المذكورة. وفي التجسـيد الأكثر تفضـيلًا فإن إنزيم قطع نادر من نيوكلياز داخلي rare-cutting endonuclease يكون عبارة عن TALE- نووي، أو Cas9 endonuclease.

طرق التوصيل

الطرق المختلفة الموصـوفة فيما سـبق تتضـمن تزويد CAR في الخلايا. وعلى سـبيل المثال لا الحصـر، فإن CAR المذكور يمكن تزويده باعتباره جينات مغايرة يحمل شـيفرة لها من خلال ناقل بلازميدي. يمكن أن يحتوي ناقل البلازميد المذكور أيضًا على مميز إنتقاء، والذي يقدم معرف و/أو منتقي خلايا والذي يتلقى هذا الناقل المذكور.

يمكن تصـــنيع عديدات الببتيد في موقعها كنتيجة لتزويد عديدات النيكليوتيدات التي تحمل شـــيفرة لعديدات الببتيدات المذكورة في الخلية. وعلى نحو بديل فإن عديدات الببتيدات المذكورة يمكن إنتاجها خارج الخلية وتزويدها إليها. طرق إدخال تركيبة عديد نيكليوتيدإلى الخلايا معروفة في المجال، وتتضـــمن طرقًا غير ثابتة للتحول الوراثي، حيث يتم دمج بنية عديد النيكليوتيد في جينوم الخلية، وهناك طرق التحويل العابر حيث لا يتم دمج بنية عديد النيكليوتيد في جينوم الخلية والفيروس بوساطة هذه الطرق. قد يتم إدخال عديد النيكليوتيد المذكور في خلية على سبيل المثال، ناقلات الفيروســـات المؤتلفة (مثل الفيروســـات القهقرية retroviruses، والفيروســـات الغدية adenoviruses)، والجسـيمات الشـحمية وما شـابه. على سـبيل المثال، تتضـمن طرق التحويل العابر مثلًا الحقن المجهري أو التثقيب الكهربي أو قذف الجسيمات. يمكن إدراج عديدات النيكليوتيد المذكورة في النواقل، وخاصة البلازميدات أو الفيروسات، في ضوء التعبير عنها في الخلايا.

الخلايا المناعية المعدلة وراثيًا

يتعلق الاختراع الحالي أيضًا بالخلايا المعزولة أو الخطوط الخلوية التي يمكن الحصول عليها بالطريقة المذكورة للخلايا المعدلة وراثيًا. وعلى وجه الخصوص، تشمل الخلية المعزولة على مستقبل CAR واحدة على الأقل كما هو موضح أعلاه. في تجسيد آخر، تشمل الخلية المعزولة المذكورة على مجموعة من CARs تحتوي كل واحدة على مجالات ارتباط ربيطة خارج خلوية مختلفة. وعلى وجه الخصوص، تشمل الخلية المعزولة المذكورة على تسلسل خارجي لعديد نيكليوتيد تشفير CAR. يتم تنشيط الخلايا المناعية المعدلة وراثيا من الاختراع الحالي وتتكاثر بشكل مستقل عن آليات الارتباط بمولد المضاد.

ضمن نطاق الاختراع الحالي، فإنه يتضمن أيضًا الخلايا المناعية المعزولة، ويفضل الخلايا التائية التي تم الحصول عليها وفقًا لأي من الطرق الموصوفة فيما سبق. والخلايا المناعية المذكورة تشير إلى خلايا من أصل دموي، مشاركة وظيفيًا في بدء و/أو تنفيذ استجابة المناعة الفطرية و/أو المكتسبة. وهذه الخلية المناعية وفقًا للاختراع الحالي يمكن أن تكون مشتقة من الخلية الجذعية. ويمكن أن تكون الخلايا الجذعية خلايا جذعية بالغة أو خلايا جذعية جنينية غير بشرية أو بتخصيص أكبر خلايا جذعية غير بشرية، أو خلايا جذعية من الحبل السري، أو خلايا سلف، أو خلايا جذعية من نخاع العظام أو خلايا جذعية مستحثة محفزة، أو الخلايا الجذعية مكتملة النمو أو الخلايا الجذعية المكونة للدم. الخلايا البشرية الممثلة يمكن أن تكون خلايا +CD34. ويمكن أن تكون الخلايا المعزولة المذكورة أيضًا خلايا شجيرية أو خلية شجيرية قاتلة أو خلية سارية، أو خلية NK، أو خلية B، أو خلية تائية مختارة من مجموعة تتكون من الخلايا اللمفاوية التائية، الخلايا اللمفاوية التائية السامة للخلايا، اللمفاويات التائية المنظمة أو اللمفاويات التائية المساعدة. في تجسيد آخر، يمكن اشتقاق الخلية المذكورة من المجموعة المؤلفة من الخلايا اللمفاوية التائية+ CD4، و الخلايا اللمفاوية التائية + CD8. قبل التوسعة والتعديل الوراثي لخلايا الاختراع، يمكن الحصول على مصدر الخلايا من الحالة من خلال العديد من الطرق المتنوعة غير الحصرية. يمكن الحصول على الخلايا من عدد من المصادر غير الحصرية والتي تتضمن خلايا الدم الطرفية وحيدة النواة، ونخاع العظام، وأنسجة العقد اللمفاوية، ودم الحبل السري، وأنسجة الغدة التيموسية، وأنسجة موضع الحقن، والاستسقاء، والارتشاح الرئوي، وأنسجة الطحال، والأورام. وفي

تجسيدات معينة من الاختراع الحالي، فيمكن استخدام أي عدد من خطوط الخلايا التائية المتوفرة، والمعروفة للمتمرسين في التقنية. وفي تجسيد آخر، يمكن اشتقاق هذه الخلايا المذكورة من متبرع سليم، أو من مريض مشخص بمرض السرطان، أو من مريض مشخص بحالة عدوى. وفي تجسيد آخر، تعد الخلية المذكورة جزءًا من مجموعة مختلط من الخلايا والذي يقدم سمات جينية مختلفة. وفي نطاق الاختراع الحالي، فإنه يتضمن أيضًا خط خلايا يتم الحصول عليه من خلايا تائية منقول لها مادة وراثية وفقا للطرق الموصوفة فيما سبق. الخلايا المعدلة مقاومة لعلاج مثبط للمناعة، ومعرضة لإمكانية الحصول عليها بالطرق السابقة الذكر، والمتضمنة في نطاق الاختراع الحالي.

وفي تجسيد آخر، تشمل الخلايا المعزولة المذكورة وفقا للاختراع الحالي على عديد نيكليوتيديحمل شيفرة لمستقبلCAR.

تنشيط وتوسعة الخلايا التائية

وسواء قبل أو بعد التعديل الجيني للخلايا التائية، حتى إذا تم تنشيط الخلايا المناعية المعدلة وراثيا للاختراع الحالي، وتكاثرت بصورة مستقلة عن آلية الارتباط بمولد المضاد، فإن الخلايا المناعية، وخصوصًا الخلايا التائية يمكن تنشيطها إضافيًا وتوسعتها عامة باستخدام الطرق الموصوفة على سبيل المثال في البراءات الأمريكية 6352694؛ 6534055؛ 6905680؛ 6692964؛ 5858358؛ 6887466؛ 6905681؛ 7144575؛ 7067318؛ 7172869؛ 7232566؛ 7175843؛ 5883223؛ 6905874؛ 6797514؛ 6867041؛ وفي نشر طلب البراءة الأمريكي رقم 20060121005. ويمكن توسعة الخلايا التائية سواء معمليًا أو حيويًا.

وعامة يمكن توسعة الخلايا التائية للاختراع من خلال التلامس مع عامل يستحث معقد CD3 TCR، وجزيء حث مشترك على سطح الخلايا التائية لإنشاء إشارة تنشيط للخلايا التائية.

على سبيل المثال يمكن استخدام المركبات الكيميائية مثل calcium ionophore A23187, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), أوmitogenic lectinsمثل phytohemagglutinin (PHA)، لإنشاء إشارة تنشيط للخلايا التائية.

وعلى سبيل المثال لا الحصر، يمكن حث مجموعات الخلايا التائية معمليا، مثلا من خلال التلامس مع جسم مضاد من مضادات CD-3، أو شدفة ارتباط بمولد المضاد منه، أو جسم

مضـــاد من مضـــادات CD-2 مثبت على ســـطح أو بالتلامس مع منشـــط كيناز بروتين C (مثل bryostatin) بالترافق مع حامل أيونات كالســـيوم calcium ionophore. وللتنشـــيط المشـــترك لجزيء ملحق على سطح الخلايا التائية، فإن الربيطة ترتبط بالجزيء الملحق المستخدم. على سبيل المثل يمكن أن تتلامس مجموعات الخلايا التائية مع جسـم مضـاد من مضـادات CD-3، وجسـم مضاد من مضادات CD-28، تحت ظروف ملائمة لحث تكاثر الخلايا التائية وتنشيطه. وتتضمن الظروف المناسبة لمزرعة الخلايا التائية وجود وسط مناسب للزراعة (مثل Minimal Essential Mediaاو5 X-vivo ،RPMI Media 1640 or, (Lonza))، الذي قد يحتوي على العوامل اللازمة للتكاثر والحيوية، والتي تتضـــمن المصـــل (مثلًا مصـــل جنيني بقري أو مصـــل بشـــري)، و interleukin-2 (IL-2), insulin, IFN-g , 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, - 2, 1L-15, TGFp, وTNF، وغيره من الإضافات الأخرى المستخدمة لنمو الخلايا المعروفة للمتخصصين في المجال. وتتضـمن الإضـافات الأخرى للنمو على سـبيل المثال لا الحصـر العوامل الفعالة على الســـطح ومشـــتقـات البلازمـا والعوامـل المختزلـة مثـل N-acetyl-cysteine، و2-mercaptoethanoi. ويمكن أن يتضمن الوسط RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1, وX-Vivo 20 ، وعامل ضـــابط، مع إضـــافة الأحماض الأمينية، و sodium pyruvate، والفيتامينات، ســـواء كانت خالية من المصـــل أو مكملة بكمية مناســـبة من المصـــل (أو البلازما) أو مجموعة محددة من الهورمونات، و/أو كمية كافية من الســـيتوكين(s)cytokine لنمو وتوســـعة الخلايا التائية. ويتم تضـــمين المضـــادات الحيوية مثل penicillin، و streptomycin في المزارع التجريبية فقط وليس في المزارع الخلايا التي ستستخدم لحقنها في حالة. ويتم حفظ الخلايا المســـتهدفة في الظروف الضـــرورية لدعم نموها، على ســـبيل المثال في درجة حرارة ملائمة (مثلًا 37 °م)، وجو مناسـب (مثلا هواء يتضـمن 5%زائدة CO2). ويمكن أن تسلك الخلايا التائية التي تم تعريضها لعدد متنوع من مرات الحث سمات مختلفة.

في تجسيد آخر مخصص، يمكن توسعة الخلايا المذكورة من خلال الزراعة المشتركة مع خلايا أو أنســـجة. ويمكن توســـعة الخلايا المذكورة أيضًـــا حيويًا على ســـبيل المثال في دم الكائن بعد إعطاء الخلايا للكائن المذكور.

التطبيقات العلاجية

في تجسيد آخر، يمكن الحصول على الخلايا المعزولة بطرق مختلفة أو من خلال خطوط الخلايا المشتقة من هذه الخلايا المعزولة كما سبق ان وضح الوصف، والتي يمكن أن تستخدم كدواء. وفي تجسيد آخر، يمكن استخدام هذا الدواء المذكور لعلاج السرطان، وخصوصًا لعلاج ليمفوما أو لوكيميا الخلايا B في مريض بحاجة للعلاج منها. وفي تجسيد آخر، يمكن استخدام هذه الخلايا وفقا للاختراع، أو خط الخلايا المشتق من الخلايا المعزولة المذكورة في تصنيع دواء لعلاج السرطان في حالة تحتاج للعلاج به.

في جوانب أخرى يقوم الاختراع الحالي على طرق لعلاج المرضى المحتاجين للعلاج، وتشمل الطرق المذكورة على الأقل على خطوة واحدة مما يلي:

(أ) تزويد خلية مناعية تعبر على سطح الخلية عن مستقبلمولد المضادكيميري واحدة نوعي ضد CD19 وفقًا لأي واحد من عناصر الحماية من 1 إلى 7.

(ب) إعطاء للخلية المناعية المذكورةللمريض المذكور.

في احدالتجسيدات، يمكن أن تمر الخلايا التائية المذكورة للاختراع بتوسعة قوية للخلايا التائية حيويًا، ويمكن أن تستمر وتبقى لفترة محددة من الوقت. ويمكن أن يكون العلاج المذكور مخففًا أو شافيًا أو وقائيًا. وقد يكون إما جزء من علاج مناعي ذاتي أو جزء من علاج مناعي مغاير. وإن المصطلح ذاتي يعني أن الخلايا أو خط الخلايا أو مجموعة الخلايا المستخدم لعلاج المرضى ينشأ من المريض المذكور أو من واهب متوافق لمولد المضاد خلايا الدم البيضاء البشرية (HLA). ونعني بالمصطلح مغاير أن الخلايا أو خط الخلايا أو مجموعة الخلايا المستخدم لعلاج المرضى لا ينشأ من نفس المريض المذكور لكنه يأتي من واهب.

الخلايا التي يمكن ان تستخدم مع الطرق المفصح عنها توصف في الجزء السابق. ويمكن ان يستخدم العلاج المذكور لعلاج حالات المرضى المشخصين بالسرطان. السرطانات التي يمكن علاجها قد تشمل الأورام غير الصلبة (مثل أورام الدم، والتي تتضمن على سبيل المثال لا الحصر pre-B ALL (في إصابات الأطفال) و ALL للبالغين، سرطان الغدد الليمفاوية لخلايا الغدد التناسلية، وليمفوما الخلايا B الكبيرة المنتشرة، وما شابه. أنواع السرطانات التي يمكن علاجها باستخدام CARs للاختراع تتضمن على سبيل المثال لا الحصر أنواع معينة من اللوكيميا، أو الأورام اللمفية الخبيثة.

وتتضمن هذه السرطانات/ الأورام حالات البالغين، وكذلك أورام/وسرطانات الأطفال. ويمكن أن يكون علاجًا في مزيج مع واحد أو أكثر من علاجات السرطان المختارة من مجموعة من علاجات الأجسام المضادة والعلاج الكيميائي وعلاج السيتوكينات وعلاج الخلايا المتغصنة والعلاج الجيني والعلاج بالهرمونات والعلاج بالليزر الضوئي والعلاج بالهرمونات.

وفقًا لتجسيد مفضل من الاختراع، فإنه يمكن إعطاء العلاج المذكور للمرضى الخاضعين لعلاج مثبط للمناعة، علاوة على أن الاختراع الحالي يفضل أن يعتمد على الخلايا أو على مجموعات الخلايا التي تم جعلها مقاومة لعامل واحد على الأقل من العوامل المثبطة للمناعة نتيجة لإزالة تنشيط الجين الذي يحمل شيفرة للمستقبل لهذه العوامل المثبطة بالمناعة. وفي هذا الجانب، ينبغي أن يساعد العلاج المثبط للمناعة في إنتقاء وتوسع الخلايا التائية في هذا المريض وفقا للاختراع.

إعطاء الخلايا أو مجموعات الخلايا وفقا للاختراع الحالي يمكن أن يتم وفقًا لأي طريقة مناسبة، بما يتضمن استنشاق الرذاذ أو الحقن أو البلع أو النقل بالتسريب الوريدي أو الغرس أو الزراعة. ويمكن إعطاء التركيبات الموصوفة هنا للمريض عن طريق الإعطاء تحت الجلد أو في الجلد أو في الورم أو في العقد أو في النخاع أو في العضلات أو في الوريد أو بالحقن في الجهاز اللمفاوي أو في الغشاء البريتوني. وفي أحد التجسيدات، يفضل أن يتم إعطاء تركيبات الاختراع الحالي بالحقن في الوريد.

ويمكن أن يتكون إعطاء الخلايا او إعطاء مجموعات الخلايا من إعطاء 410-910 خلية / كغم من وزن الجسم، بما في ذلك كل قيم الأرقام والأعداد الصحيحة للخلايا ضمن في هذه النطاقات. وفي تجسيد آخر، يمكنأن يتم إعطاء الخلايا او إعطاء مجموعات الخلايا بجرعة واحدة أو أكثر. وفي تجسيد آخر، تكون الكمية الفعالة المذكورة من الخلايا هي كمية يتم إعطاؤها في جرعة واحدة أو أكثر خلال فترة من الزمن. ويقع توقيت الإعطاء ضمن نطاق الحكم الطبي العادي للطبيب المتابع للحالة، ويعتمد على الحالة السريرية للمريض.

الخلايا أو مجموعات الخلايا يمكن الحصول عليها من أي مصدر مثل بنوك الدم أو الواهب. وبينما تتنوع الاحتياجات، فإن قرار النطاق الأمثل للكميات الفعالة لنوع معين من الخلايا في حالة مرضية خاصة أو حالات مختلفة، يقع ضمن نطاق المهارة العادية في المجال. الكميات الفعالة تعني الكمية

التي تقدم نفعًا علاجيًا أو وقائيًا. الجرعة التي يتم إعطاؤها ستعتمد على العمر، والصحة، والوزن، والمتلقي، ونوع العلاج الحالي إن وجد، ومدى تكرار هذا العلاج، وطبيعة التأثير المرغوب.

وفي تجسيد آخر، تشمل الكمية الفعالة المذكورة من الخلايا أو التركيبة على تلك الخلايا التي يتم إعطاؤها بطريق غير معويًا. ويمكن أن يكون هذا الإعطاء إعطاء ببطريق غير معوي. وهذا التناول المذكور يمكن أن يتم مباشرة بالحقن في الورم.

في تجسيدات معينة من الاختراع الحالي، يتم إعطاء الخلايا إلى مريض بالارتفاق مع (مثلا قبلها أو بالتزامن معها أو بعدها) أي عدد من تجسيداتالعلاجاتذات الصلة، والتي تتضمن على سبيل المثال لا الحصر العلاج بعوامل مثل العلاج بمضادات الفيروسات، وcidofovir، و interleukin-2، وCytarabine (المعروف أيضًا باسم ARA-C) أو علاج natalizііmab لمرضى التصلب المتعددMS، أو علاج efaliztimab لمرضى الصدفية، أو غيرها من العلاجات لمرضى PML. وفي تجسيدات أخرى، يمكن استخدام الخلايا التائية للاختراع في تركيبة مولفة مع العلاج الكيميائي، والإشعاع، والعوامل المثبطة للمناعة مثل cyclosporin، وazathioprine، وmethotrexate، وmycophenolate،FK506، والأجسام المضادة وغيرها من العوامل الكابحة للمناعة مثل CAM PATH، والأجسام المضادة من مضادات CD3، أو غيرها من علاجات الأجسام المضادة، و cytoxin، وfludaribine،وcyclosporin، وFK506، وrapamycin،وحمض mycoplienolic، والستيرويدات، وFR901228، وcytokines، و التشعيع. وتثبط هذه الأدوية أما phosphatase calcineurinالمعتمد على الكالسيوم (cyclosporine، وFK506) أو تثبط إنزيم p70S6 kinase، وهو مهم للتأشير المستحث من قبل عامل النمو (rapamycin)( Henderson, Naya et al. 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander et al. 1993). في تجسيد إضافي، يمكن أن يتم إعطاء تركيبات الخلية للاختراع الحالي للمريض بالترافق مع زراعة نخاع العظام(مثلا قبلها أو بالتزامن معها أو بعدها)، أو علاج الخلايا التائية بالجر باستخدام أما عوامل العلاج الكيميائي مثل fludarabine وعلاج التشعيع بالشعاع الخارجي(XRT) ، و cyclophosphamide، أو الأجسام المضادة مثل OKT3أوCAMPATH. وفي تجسيد آخر فإن تركيبات الخلايا للاختراع الحالي يتم إعطاؤها عقب علاج الجر لخلايا B، مثل العوامل التي تتفاعل مع CD20، مثل Rituxan. على سبيل المثال،

في أحد التجسيدات، قد تخضع الحالة للعلاج التقليدي بجرعات مرتفعة من العلاج الكيميائي، متبوعة بالعلاج بزرع الخلايا الجذعية في الدم الطرفي. وفي تجسيدات معينة، عقب الزراعة فقد تتلقى الحالي تسريبًا وريديًا من الخلايا المناعية الموسعة للاختراع الحالي. وفي تجسيد إضافي فقد يتم إعطاء الخلايا الموسعة قبل أو بعد الجراحة.

تعريفات أخرى

-ما لم يشر إلى خلاف هذا، فإن صيغ المعرفة والنكرة، و "على الأقل واحد" تستخدم بالتبادل، وتعني واحد أو أكثر من واحد. تم تسمية الوحدات البنائية للأحماض الأمينية في سياق عديد وفقًا لشفرة الحرف الواحد، والتي فيها يستخدم على سبيل المثال Qليعني Glnأو شق Glutamine، و R لتعنيArgأو شق Arginine، وDلتعني Aspأو شق حمضAspartic.

-استبدالات الحمض الأميني تعني استبدال أحد شقوق الحمض الأميني بشق آخر، على سبيل المثال استبدالشقArginine بشق Glutamineفي سياق ببتيد، وهذا ما يسمى استبدال حمض أميني .

-تم تسمية شيفرة للنيكليوتيدات كما يلي: شفرة الحرف الواحد تستخدم لتسمية لقواعد النيكليوتيدات: aتمثل adenine، و t تمثلthymine، و c تمثل cytosine، و gتمثلguanine . أما بالنسبة للنيكليوتيداتالمتحللة، فإن r تمثل g أو (نيكليوتيدةpurine)، و k تمثل g أوt، و s تمثل g أو c،وw تمثل a أو t،و m تمثل a أو c، و y تمثل t أو c (نيكليوتيداتpyrimidine)، و d تمثل g، و a أو t، و v تمثل g،وa أو c أو b تمثل g، و t أو c، و h تمثل a، و tأو c، و n تمثل g، و a، و t أو c.

- "وكما يستخدم هنا، فإن مصطلح"الحمض النووي"أو"عديدات النيكليوتيد"يشير إلى النيكليوتيدات أو عديدات النيكليوتيدمثل الحمض deoxyribonucleic (DNA) أو الحمض ribonucleic (RNA)، أو قليلات النيكليوتيدoligonucleotides، أو الشدفات المتولدة من تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction (PCR)، والشدفات المتولدة من أي نوع من أنواع الربط أو القص أو بفعل نوكلياز داخلي الخارجي أو بفعل نوكلياز خارجية exonuclease. يمكن أن تتكون جزيئات الحمض النووي من وحدات بنائية موجودة طبيعيًا من النيكليوتيدات (مثل DNA أو RNA)، أو

نظائرمن النيكليوتيدات الموجودة طبيعيًا(مثلًا صور إنانشيوميريةمن النيكليوتيدات الموجودة طبيعيًا)، أو مزيج من كلاهما. يمكن للنيكليوتيدات المعدلة أن تتميز بتبادلات في شقوق السكر و/أو شقوق قواعد pyrimidineأو purine. تتضمن تعديلات السكر واحد أو أكثر من مجموعات hydroxyl مع halogens ومجموعات alkyl، و مجموعات amines، و مجموعات azido ، أو سكريات يمكن استغلالها وظيفيًا مثل ethers أو esters. وعلاوة على ذلك، فإنه يمكن استبدال شق السكر بالكامل ببنية مشابهة فراغيًا وإلكترونيًا مثل نظائر سكريات aza-sugars، أو السكريات الحلقية الكربونية carbocyclic sugar analogs.وتتضمن أمثلة تعديلات القواعد والشقوق alkylated purines، و pyrimidines، و acylated purines أو pyrimidines، أو غيرها من استبدالات الحلقات غير المتجانسة heterocyclic substitutes. يمكن أن يرتبط الحمض النووي أحادي النسيلة بروابط phosphodiester أو نظائر مثل هذه الروابط. يمكن أن تكون الأحماض النووية أما منفردة الخيطsingle stranded، أو مزدوجة الخيطdouble stranded.

- بواسطة مستقبل مولد المضاد الكيميري (CAR) وهي الجزيئات المقصودة التي تدمج نطاق الارتباط ضد مكون موجود على الخلية المستهدفة، على سبيل المثال النوعيةالمعتمدة على الجسم المضاد لمولد المضاد مرغوب (على سبيل المثال، مولد المضاد الورم) مع نطاق داخل الخلية منشط لمستقبل الخلية T لتوليد بروتين كيميري يُظهر نشاط مناعي خلوي ضد- المستهدف خاص. وبشكل العام، يتكون CAR من جسم مضاد مفرد السلسلة خارج الخلية (scFvFc) مُتحد في نطاق إشارة داخل الخلية للسلسلة زيتا الخاصة بمعقد مستقبلمولد المضاد الخلية T (scFvFc:ζ) ولديه قدرة، عند التعبير الوراثي في الخلايا T، على اعادة توجيه تعرف مولد المضاد اعتمادًا على نوعية الجسم المضاد أحادي النسيلة. هناك مثال واحد على CAR المُستخدم في الاختراع الحالي وهو CAR موجه ضد مولد المضادCD19 ويُمكن أن يشمل كمثال غير حصري سياق الحمض الأميني: رقم تمييز السياق: 14.

- يشير المصطلح "إنزيم نيوكلياز داخلي" إلى أي إنزيم مُتغير أو من النوع البري قادر على تحفيز التحلل بالماء (انشقاق) الروابط بين الأحماض النووية داخل جزئ DNA أو RNA، يُفضل جزئ DNA. لا يقوم إنزيم النيوكلياز الداخلي بشق جزئ DNA أو RNA بصرف النظر عن سياقه، لكن يتعرف ويشق جزئ الـ DNA أو الـ RNA عند سياقات عديد نيوكليوتيد خاصة، كما يُشار إليها أيضًا

كـ"سياقات مستهدفة" أو "مواقع مُستهدفة". يُمكن تصنيف إنزيم النيوكلياز الداخلي كإنزيمات قطع نادر من النيوكليازاتالداخليةعندما يكون لديها موقع تعرف على عديد نيوكليوتيد أعلى من 12 زوج قاعدة (bp) في الطول، ويُفضل 14-55 زوج قاعدة. تزيد إنزيمات القطع النادر من النيوكليازات الداخلية من HR عن طريقة حث تكسير DNA مزدوج السلسلة (DSBs) عند موقع محدد (Perrin, Buckle et al. 1993; Rouet, Smih et al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). يُمكن أن تكون إنزيمات القطع النادر من النيوكليازات الداخلية عبارة عن إنزيم نيوكلياز داخلي موجه (Paques and Duchateau 2007)، نيوكلياز إصبع الزنك الكيمري(ZFN) الناتج من اتحاد نطاقات إصبع الزنك المعدل وراثيًا مع النطاق المحفز من إنزيم القطع مثل FokI (Porteus و Carroll 2005)، إنزيم نيوكلياز داخلي Cas9 من نظام CRISPR (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) أو إنزيم نيوكلياز داخلي كيميائي (Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006). في إنزيمات النيوكليازات الداخلية الكيميائي، يتم قرن قواطع بيبتيدية أو كيميائية إما في بوليمر الأحماض النووية أو في DNA آخر يتعرف على سياق مستهدف خاص، ومن ثم يستهدف نشاط القطع إلى سياق خاص. تشمل إنزيمات النيوكلياز الداخلية الكيميائية أيضًا مترافقات شبيهة إنزيمات النيوكلياز المُخلقة من أورثوفينانثرولين، جزئ قطع DNA، قليل النيوكليوتيدات المكونة لثلاثي الوحدات (TFOs)، المعروف بالارتباط بسياقات DNA المتخصصة (Kalish and Glazer 2005). تكون هذة الإنزيمات النيوكلياز الداخلية الكيميائية في المصطلح "إنزيم النيوكلياز الداخلي" وفقًا للاختراع الحالي.

-بواسطة "إنزيم النيوكلياز -TALE" (TALEN) يُقصد به بروتين إندماج يتكون من نطاق ربط - حمض نووي مُشتق بشكل نموذجي من مؤثر شبيه منشط النسخ (TALE) ونطاق محفز نيوكلياز لقطع سياق حمض نووي مستهدف. يُفضل أن يكون النطاق المحفز عبارة عن نطاق إنزيم النيوكلياز ومن المفضل أكثر نطاق به نشاط إنزيم النيوكلياز الداخلي، للتوضيح I-TevI, ColE7, NucAو Fok-I. في نموذج خاص، يُمكن إندماج نطاق TALE في شبيه الميجانيوكلياز للتوضيح CreI-او OnuI-أو صورة متغيرة وظيفية منه. في نموذج أكثر تفضيًلا، يكون النيوكلياز المذكور عبارة عن إنزيم النيوكلياز TALEأحادي النسيلة. يكون إنزيم نيوكلياز -TALEأحادي النسيلة عبارة

عن إنزيم نيوكلياز TALE الذي لا يتطلب ديمرة تعرف وقطع خاص، مثل وظائف تكرارات TAL المُعدلة وراثيًا مع النطاق المُحفز لـI-TevI الموصوف في نشرة براءة الاختراع الدولية رقم 2012138927. يكون مؤثر شبيه منشط النسخ (TALE) عبارة عن بروتينات من أنواع بكتيرية Xanthomonas تشمل مجموعة من سياقات متكررة، كل تكرار يشمل ثنائي-الوحدات البنائية في الموقع 12 و 13 (RVD) التي تكون مُتخصصة لكل قاعدة نيوكليوتيدية من سياق يستهدف الحمض النووي. يُمكن أيضًا اشتقاق نطاقات الارتباط بخصائص ارتباط حمض نووي قاعدة لكل قاعدة مُعدلة مُشابهة (MBBBD) من بروتينات مُعدلة جديدة تم اكتشافها حديثًا بواسطة مُقدم الطلب في أنواع بكتيرية مُختلفة. تكون البروتينات المُعدلة الجديدة لديها ميزة عرض عدة سياقات تختلف عن تكرارات TAL. ويُفضل، أن تكون RVDs المُرتبطة بالتعرف على النيوكليوتيدات المختلفة عبارة عن HD للتعرف على C، NG للتعرف على T، NI للتعرف على A، NN للتعرف على G أو A، NS للتعرف على A، C، G أو T، HG للتعرف على T، IG للتعرف على T، NK للتعرف على G، HA للتعرف على C، ND للتعرف على C، HI للتعرف على C، HN للتعرف على G، NA للتعرف على G، SN للتعرف على G أو AوYG للتعرف على T، TL للتعرف على A، VT للتعرف على A أو GوSW للتعرف على A. في نموذج آخر، يُمكن تطفير الأحماض الأمينية الحرجة 12 و 13 في اتجاه وحدات بنائية حمض الأمينوالآخرى لتعديل خصوصيتهم ناحية النيوكليوتيداتA، T، C، G وبشكل خاص لتحسين هذة النوعية . يتم وصف إنزيم النيوكلياز-TALE بالفعل واستخدامه لتحفيز استهداف الجين وتعديلات الجين (Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanove 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al. 2011). تكون إنزيمات النيوكلياز TAL المُعدلة وراثيًا متاحة بالأسواق تحت الإسم التجاري TALENTM (Cellectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France).

يُمكن أن تكون إنزيمات القطع النادر من إنزيم النيوكلياز الداخلي وفقًا للاختراع الحالي عبارة عن إنزيم النيوكلياز Cas9. حديثًا، يتم تطوير أداة هندسة جينوم جديد اعتمادًا على إنزيم نيوكلياز Cas9 موجه – RNA (Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) من CRISPR بدائي النواة النوع II جهاز المناعة (Clustered Regularly Interspaced Short palindromic Repeats)

التكييفي (أنظر للمراجعة (Sorek, Lawrence et al. 2013). تم إكتشاف الجهاز (Cas) المرتبط بـ CRISPR أولًا في البكتريا ويعمل كمدافع ضد أي DNA غريب، إما فيروسي أو بلازميدي. يسبق التعديل الوراثي للجينوم الذي يتوسطهCRISPR أولًا اختيار سياق مستهدف يتفرع غالبًا بواسطة جزء سياق قصير، يُشار إليه كجزء قريب من مباعد مجاور أولي (PAM). باتباع اختيار السياق المستهدف، يتم التعديل الوراثي لـ crRNA خاص، مكمل لهذا السياق المستهدف. تكون crRNA التي تم تنشيطها بشكل تعابري (tracrRNA) مطلوبة في أنظمة CRISPR النوع II المزدوجة في الـ crRNA والمرتبطة في بروتين Cas9 الذي تم تزويده. يعمل Cas9 كمثبت جزيئي يقوم بتسهيل إزدواج القاعدة الخاصة بـ tracRNA مع Crna (Deltcheva, Chylinski et al. 2011)). في هذا المجمع الثلاثي، يعمل تركيب tracrRNA:crRNA المزدوج كـ RNA إرشادي الذي يقوم بتوجيه إنزيم النيوكلياز الداخلي Cas9 للسياق المُستهدف المترافق. يتم بدء التعرف المُستهدف بواسطة المعقد Cas9–tracrRNA:crRNA عن طريق فحص السياق المستهدف للتماثل بين السياق المُستهدف والـcrRNA. بالإضافة إلى مكمل متوالية–crRNA المُستهدف، يتطلب استهداف DNA وجود جزء قصير بالقرب من المباعد الأولي المجاور (جزء للمباعد المجاور البدائي – PAM). باتباع الإزدواج بين RNA المزدوج والسياق المستهدف، يدخل Cas9 بعد ذلك منبع من 3 قواعد مقطوع مزدوج السلسلة كليل من جزء PAM(Garneau, Dupuis et al. 2010).

يمكن أن يكون نيوكلاز القطع الداخلي النادر عبارة عن نيوكلاز داخلي موجه، معروف أيضًا باسم ميجا نيوكلاز. وتُعرف إنزيمات النيوكلاز الداخلية الموجهة هذه جيداً في المجال ( Stoddard 2005). تتعرف إنزيمات النيوكلاز الداخلية الموجهة بسياق الحمض النووي المستهدف وتنتج فاصل أحادي أو مزدوج الجديلة. تكون إنزيمات النيوكلاز الداخلية الموجهة نوعية بدرجة كبيرة، حيث تتعرف على مواقع استهداف الحمض النووي ويتراوح طولها من 12 إلى 45 زوج قاعدة (bp)، ويتراوح طولها عادةً من 14 إلى 40 زوج قاعدة. يمكن أن يتوافق النيوكلاز الداخلي الموجه طبقاً للاختراع على سبيل المثال مع نيوكلاز LAGLIDADG داخلي، نيوكلاز HNH داخلي، أو نيوكلاز GIY–YIGداخلي. يمكن أن يكون النيوكلاز الداخلي الموجه المفضل وفقًا للاختراع الحالي عبارة عن متغير I–CreI.

– يُقصد بالمصطلح "ناقل توصيل" أو "نواقل توصيل" أي ناقل توصيل يمكن استخدامه في الاختراع الحالي لوضعه في تلامس مع الخلية (أي "اتصال") أو توصيل العوامل/ المواد الكيميائية والجزيئات داخل الخلايا أو الأجزاء الخلوية الفرعية (أي "الإدخال") (البروتينات أو الأحماض النووية) المطلوبة في الاختراع الحالي. وهي تشمل، على سبيل المثال لا الحصر، ناقلات توصيل الجسيم الشحمي، ناقلات التوصيل الفيروسية، ناقلات توصيل العقار، مواد حاملة كيميائية، مواد حاملة بوليميرية، ليبوبليكسlipoplexes، بولي بلكسpolyplexes، وحدات متغصنةdendrimers، فقاعات صغيرة (عوامل تباين الموجات فوق الصوتية)، جسيمات نانوية، مستحلبات أو ناقلات نقل مناسبة أخرى. تسمح نواقل التوصيل هذه بتوصيل الجزيئات، المواد الكيميائية أو الجزيئات الضخمة (الجينات أو البروتينات) أو ناقلات أخرى مثل البلازميدات، الببتيدات التي طورتها Diatos. في هذه الحالات، تكون نواقل التوصيل عبارة عن مواد حاملة للجزيء. بالمصطلح "ناقل توصيل" أو "نواقل توصيل" يُقصد أيضًا طرق التوصيل لإجراء نقل العدوى.

– تشير المصطلحات "ناقل" أو " نواقل " إلى جزيء الحمض النووي القادر على نقل حمض نووي آخر تم ربطه به. يتضمن "الناقل " في الاختراع الحالي، على سبيل المثال لا الحصر، ناقل فيروسي، أو بلازميد، ناقل RNA أو جزيء DNA أو RNA خطي أو دائري يمكن أن يتكون من أحماض نووية كروموسومية أو غير كروموسومية أو شبه تخليقية أو تخليقية. تشمل النواقل المفضلة على تلك القادرة على التناسخ الذاتي (ناقل قمي على الكروموسوم) و/ أو التعبير عن الأحماض النووية التي ترتبط بها (نواقل التعبير). وتُعرف أعدادا كبيرة من النواقل المناسبة لهؤلاء المهرة في المجال والمتاحة تجاريًا.

تتضمن النواقل الفيروسية الفيروسات الارتجاعية، الفيروسات الغدية، فيروسات صغيرة (مثل الفيروسات المرتبطة بالغدة)، الفيروس التاجي، فيروسات جديلةRNAالسالبة مثل الفيروس المخاطي القويم (مثل فيروس الإنفلونزا) وفيروس الرابدي (مثل داء الكلب والفيروسات السعالية الحويصلية) والفيروس المخاطاني (مثل الحصبة وسينداي)، وفيروسات جديلة RNA الموجبة مثل فيروس بيكورناوي، فيروس ألفا، وفيروسات DNAمزدوجة الجديلة، بما في ذلك الفيروس الغدي، فيروس الحلأي (مثل الفيروس الحلأي البسيط من النوع 1 و2، فيروس إبشتاين بار، الفيروس المضخم للخلايا). وفيروسات الجدري (على سبيل المثال، اللقاحية، والطيرية الجُدريّة، والجدري الكناري).

تتضمن الفيروسات الأخرى فيروس نورواك، وفيروس توجا، الفيروسة المصفرة، فيروسات ريوي، والفيروسات البوابوفية، وفيروس الكبد، وفيروس التهاب الكبد الوبائي، على سبيل المثال. تشمل أمثلة الفيروسات الارتجاعية: فيروس ساركومة تكثر نسيج البيض الطيري، فيروسات ثديية، من النوع B، النوع B، النوع D، مجموعة HTLV-BLV، الفيروسات البطيئة، spumavirus ( Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

- يُقصد بـ "الفيروس البطيء" نواقل فيروسات بطيئة تعتمد على فيروس HIV والتي تُعد واعدة جداً لتوصيل الجين بسبب سعة التعبئة الكبيرة نسبياً الخاصة بها، وانخفاض تولد المناعة، قدرتها على نقل نطاق كبير من أنواع الخلايا المختلفة بصورة ثابتة وبكفاءة عالية. يتم عادةً توليد نواقل الفيروسات البطيئة بعد نقل العدوى الانتقالي لـ 3 (التعبئة، التغليف، والنقل) أو أكثر من البلازميدات في الخلايا المنتجة. مثل فيروس HIV، تدخل نواقل الفيروس البطيء الخلية المستهدفة من خلال تفاعل بروتينات سكرية على السطح الفيروسي مع مستقبلات على سطح الخلية. عند الدخول، يخضع RNAالفيروسي لنسخ عكسي، يتم بواسطهمعقد ترانسكريبتاز transcriptase عكسي فيروسي. يكون منتج النسخ العكسي عبارة عن DNA فيروسي خطي مزدوج الجديلة، والذي يمثل ركيزة للتكامل الفيروسي في الحمض النووي للخلايا المصابة. ويقصد بالمصطلح "ناقلات فيروس بطيء متكاملة (أو LV)"، هذه الناقلات مثل المثال غير المقيد، التي تكون قادرة على دمج جينوم الخلية المستهدفة. على العكس يُقصد "بنواقل الفيروس البطيء غير المتكاملة (أو NILV)" نواقل توصيل الجينات الفعالة التي لا تسبب دمج جينوم الخلية المستهدفة من خلال تأثير إنتجراز integrase للفيروس.

- يمكن ربط نواقل التوصيل والنواقل أو دمجها مع أي من تقنيات الإنفاذ الخلوية مثل إخضاع الخلايا للموجات الصوتية أو التوصيل الكهربي أو مشتقات من هذه التقنيات.

- ويقصد بالخلية أو الخلايا أي خلايا حية حقيقية النواة، والخلايا الأولية وسلالات الخلايا المشتقة من هذه الكائنات الحية في المزارع المختبرية.

- ويُقصد بـ "خلية أولية" أو "خلايا أولية" الخلايا التي تؤخذ مباشرة من الأنسجة الحية (أي مادة الخزعة) وتوضع للنمو في المختبر، والتي خضعت لعدد ضئيل جداً من التجمعات وبالتالي فهي أكثر تمثيلًا للمكونات الوظيفية الرئيسية وخصائص الأنسجة التي يتم اشتقاقها منها، بالمقارنة مع سلالات الخلايا السرطانية المستمرة أو الدائمة بشكل صناعي.

كأمثلة غير محددة، يمكن اختيار سلالات الخلايا من المجموعة المكونة من خلايا CHO-K1 ؛ خلايا HEK293 ؛ خلايا Caco2 ؛ خلايا U2-OS ؛ خلايا NIH 3T3 ؛ خلايا NSO خلايا SP2 ؛ خلايا CHO-S ؛ خلايا DG44 ؛ خلايا K-562، خلايا U-937 ؛ خلايا MRC5 ؛ خلايا IMR90 ؛ خلايا Jurkat، خلايا HepG2 خلايا HeLa؛ خلايا HT-1080 ؛ خلايا HCT-116 خلايا Hu-h7 خلايا Huvec خلايا Molt 4.

يمكن تعديل كل سلالات الخلايا هذه بواسطة طريقة الاختراع الحالي لتوفير تجسيدات سلالات خلية لإنتاج، التعبير عن، الحساب الكمي، الكشف، أو دراسة أحد الجينات أو البروتينات ذات الأهمية ؛ ويمكن استخدام هذه التجسيدات أيضًا لفرز الجزيئات النشطة بيولوجيًا ذات الأهمية في الأبحاث والإنتاج ومختلف المجالات مثل المواد الكيميائية، الوقود الحيوي، المواد العلاجية، والهندسية الزراعية كأمثلة غير محدودة.

- يقصد بـ "الطفرة" الاستبدال، الحذف أو الإدراج حتى لـ 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 20، 25، 30، 40، 50 أو أكثر من النيوكليوتيدات/ الأحماض الأمينية في عديد النيوكلوتيد (cDNA أو جين) أو سياق عديد البيبتيد. يمكن أن تؤثر الطفرة على سياق التشفير للجين أو سياقه التنظيمي. ويمكن أن يؤثر أيضًا على بنية السياق الجينومي أو بنية/ استقرار mRNA المُشفر.

- ويُقصد بالمصطلح "متغير (متغيرات)"، متغير تكرار، متغير، متغير ربط DNA، متغير نيوكلاز-TALE، متغير بولي ببتيد تم الحصول عليه بواسطة طفرة أو استبدال وحدة بنائية واحدة على الأقل في متوالية الحمض الأميني في الجزيء الأصلي.

- ويُقصد بـ "متغير وظيفي" جين طافر نشطة حفزياً لبروتين أو نطاق بروتين ؛ يمكن أن يتسم هذا الجين الطافر بنفس النشاط مقارنةً ببروتينه أو نطاق بروتينه الأصلي، خواصه الإضافية، أو نشاط أعلى أو أقل.

- يشير المصطلح "تطابق" إلى تطابق سياق بين اثنين من جزيئات الحمض النووي أو عديدات البيبتيد. يمكن تحديد التطابق بواسطة موضع في كل متوالية يمكن محاذاتها لأغراض المقارنة. عندما ينشغل موضع في السياق الذي تمت مقارنته بنفس القاعدة، تكون الجزيئات متطابقة في ذلك الموضع. تمثل درجة التشابه أو التمييز بين الحمض النووي أو متواليات الحمض الأميني دالة لعدد النيوكليوتيدات المتطابقة أو المتوافقة في المواضع التي تتقاسمها سياقات الحمض النووي. يمكن استخدام خوارزميات و/ أو برامج محاذاة مختلفة لحساب التمييز بين سياقين، بما في ذلك FASTA، أو BLAST المتوفرة كجزء من حزمة تحليل سياق GCG ( University of Wisconsin, Madison, Wis.)، ويمكن استخدامها، على سبيل المثال، مع إعداد افتراضي. على سبيل المثال، يتم وصف عديدات الببتيد التي تحتوي على 70%، 85%، 90%، 95%، 98% أو 99% على الأقل من تطابق مع عديدات الببتيد المحددة الموصوفة في هذه الوثيقة وبشكل مفضل عرض نفس الوظائف بشكل كبير، بالإضافة إلى تشفير عديد النيوكلوتيد مثل عديدات الببتيد.

- يصف "التشابه" العلاقة بين سياقات الحمض الأميني من اثنين أو أكثر من عديدات الببتيد. ويمكن أيضا أن استخدام BLTPTP لتحديد سياق الحمض الأميني الذي يتسم بتشابه سياق 70%، 75 %، 80%، 85%، 87,5 %، 90 %، 92,5%، 95%، 97,5%، 98%، 99% على الأقل مع سياق الحمض الأميني المرجعي باستخدام مصفوفة تشابه مثل BLOSUM45، BLOSUM62 أو BLOSUM80. ما لم يُذكر خلاف ذلك، يعتمد سجل التشابه على استخدام BLOSUM62. عند استخدام BLASTP، يعتمد تشابه النسبة المئوية على سجل إيجابي BLASTP وتعتمد النسبة المئوية لتمييز السياق على سجل تمييز BLASTP. تعرض "تمييزات" BLASTP الرقم وجزء من إجمالي الوحدات البنائية في أزواج سياق التسجيل المرتفعة والتي تكون متطابقة؛ وتشير الوحدات الموجبة لـ "BLASTP" إلى عدد وجزء من الوحدات البنائية التي تحتوي سجلات المحاذاة لها على قيم موجبة والتي تشبه بعضها البعض. يتم وصف سياقات الحمض الأميني التي لها هذه الدرجات من التمييز أو التشابه أو أي درجة متوسطة من تمييز التشابه مع سياقات الحمض الأميني التي تم

الكشف عنها في هذه الوثيقة، وتضمينها في هذا الكشف. يتم استنتاج سياقات عديد النيوكلوتيد لعديدات الببتيد المتشابهة باستخدام الشفرة الوراثية ويمكن الحصول عليها بواسطة الوسائل التقليدية. يتم إنتاج تشفير عديد النيوكلوتيد مثل متغير وظيفي عن طريق التحور الوراثي العكسي لسياق الحمض الأميني باستخدام الشفرة الوراثية.

– يشير مصطلح "نطاق تحويل إشارة" أو "مركب ترابطي حفزي مشترك " إلى جزيء على خلية تمثل مولد المضاد ترتبط بشكل خاص بجزيء محفز مشترك متشابه على الخلية T، مما يوفر إشارة والتي، بالإضافة إلى الإشارة الأولية التي يقدمها، على سبيل المثال، ارتباط المعقد TCR/ CD3 مع جزيء MHC المُحمل بالببتيد، يسبب استجابة الخلية T، بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، تفعيل التكاثر، والتمايز وما شابه ذلك. يمكن أن يتضمن المركب الترابطي التحفيزي المشترك على سبيل المثال لا الحصر CD7، B7-1 (CD80)، B7-2 (CD86)، PD-L1، PD-L2، 4-1BBL، OX40L، مركب ترابطي تحفيزي مشترك (ICOS-L) جزيء التصاق بين الخلايا (ICAM، CD30L، CD40، CD70، CD83، HLA-G، MICA، M1CB، HVEM، مستقبل بيتا لسم ليمفي، 3/TR6، ILT3، ILT4، مساعد أو جسم مضاد يرتبط بمستقبل المركب الترابطي Toll والمركب الترابطي الذي يرتبط على وجه التحديد، مع B7-H3. ويشمل أيضًا المركب الترابطي التحفيزي المشترك، ضمن أمور أخرى، جسم مضاد يرتبط بشكل خاص مع جزيء محفز مشترك موجود على الخلية T، على سبيل المثال لا الحصر، CD27، CD28، 4-IBB، OX40، CD30، CD40، PD-1، ICOS، مولد المضاد مرتبط بوظيفة خلية ليمفاوية1(LFA-1)، CD2، CD7، LTGHT، NKG2C، B7-H3، مركب ترابطي يرتبط بشكل خاص بـ CD83.

يشير "جزيء تحفيزي مشترك" إلى شريك الارتباط المتشابه على الخلية T الذي يرتبط بشكل خاص مع مركب ترابطي تحفيزي مشترك، وبالتالي يسبب استجابة تحفيزية مشتركة بواسطة الخلية، على سبيل المثال لا الحصر التكاثر. تتضمن الجزيئات التحفيزية المشتركة، على سبيل المثال لا الحصر، جزيء MHC من الفئة I، و BTLA، ومستقبل مركب ترابطي Toll.

يشير المصطلح "إشارة تحفيزية مشتركة" كما استخدم في هذه الوثيقة إلى إشارة، بالاشتراك مع الإشارة الأولية، مثل ربط TCR/ CD3، تؤدي إلى تكاثر الخلايا T و/ أو زيادة أو خفض الجزيئات الرئيسية بصورة متحكم بها.

– يتم تعريف المصطلح "نطاق ارتباط مركب ترابطي خارج الخلية" كما هو مستخدم في هذه الوثيقة بأنه قليل – أو عديد النيوكلوتيد قادر على الارتباط بالمركب الترابطي. بشكل مفضل، يكون النطاق قادراً على التفاعل مع جزيء سطح الخلية. على سبيل المثال، يمكن اختيار نطاق الارتباط بالمركب الترابطي خارج الخلية ليتعرف على المركب الترابطي الذي يعمل كمؤشر سطح خلية على الخلايا المستهدفة المرتبطة بحالة مرض معينة. وبالتالي، تتضمن أمثلة مرقمات سطح الخلية التي يمكن أن تعمل كمركبات ترابطية تلك المرتبطة بالعدوى الفيروسية، البكتيرية والطفيلية وأمراض المناعة الذاتية والخلايا السرطانية.

يشمل مصطلح "كائن" أو " مريض" كما استخدم في هذه الوثيقة كل أعضاء المملكة الحيوانية بما في ذلك الرئيسيات من غير البشر والبشر.

يوفر الوصف أعلاه للاختراع طريقة وعملية لتصنيعه واستخدامه بحيث يتم تمكين أي شخص متمرس في المجال من استخدامه، ويتم توفير هذا التمكين بشكل خاص لموضوع عناصر الحماية الملحقة، الذي يشكل جزءًا من الوصف الأصلي.

عند ذكر حد أو نطاق رقمي في هذه الوثيقة، فإن ذلك يشمل نقاط النهاية. أيضًا، يتم شمول جميع القيم والنطاقات الفرعية ضمن الحد أو النطاق الرقمي بشكل محدد كما لو تم كتابتها بشكل صريح.

تم عرض الوصف الوارد أعلاه لتمكين الشخص الماهر في المجال من إعداد الاختراع واستخدامه، ويتم توفيره في سياق تطبيق معين ومتطلباته. تتضح تعديلات مختلفة على التجسيداتالمفضلة بوضوح لهؤلاء المهرة في المجال.، ويمكن تطبيق المبادئ العامة المحددة في هذه الوثيقة على تجسيداتوتطبيقات أخرى دون الخروج عن روح ونطاق الاختراع. وبالتالي، لا يقصد أن يقتصر هذا الاختراع على التجسيداتالمبينة، ولكنه يرد وفق أوسع نطاق يتوافق مع المبادئ والسمات التي تم الكشف عنها في هذه الوثيقة.

بعد وصف هذا الاختراع بشكل عام، يمكن تحقيق المزيد من الفهم بالرجوع إلى بعض الأمثلة المحددة، والتي يتم تزويدها في هذ الوثيقة لأغراض التوضيح فقط، ولا يُقصد أن تكون محدودة ما لم يتم بيان خلاف ذلك.

الأمثلة

المثال 1: التكاثر الخلوي لخلاياTCRalphaغير المنشطة المعبرة عن4G7-CAR.

إنزيم TALE-nucleaseغير متجانس الوحدات يستهدف سياقي 17-bpطويلين (تسمى نصف أهداف) يفصلها فاصل بطول 15-bpضمن منطقة جين السلسلة الثابتة لمستقبل ألفا للخلايا التائية(TRAC)، حيث يصمم وينتج. ويتم التعرف على كل نصف هدف من خلال تكرارات نصف TALE-nucleases المذكورة في الجدول 1.

| الهدف | سياق الهدف | سياق التكرار | نصف-TALE nuclease |
|---|---|---|---|
| TRAC_T01 | TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (سياق برقم تعريف 20) | Repeat TRAC_T01-L (سياق برقم تعريف 21) | TRAC_T01-L TALEN (سياق برقم تعريف 23) |
| | | Repeat TRAC_T01-R (سياق برقم تعريف 22) | TRAC_T01-R TALEN (سياق برقم تعريف 24) |

كل بنية TALE-nucleaseتم استنساخها فرعيًا subcloned باستخدام الهضم بإنزيم القصر restriction enzyme digestion في ناقل التعبير الثديي mammalian expression vector، تحت تحكم معزز T7 promoter. وتم تصنيعmRNA يحمل شيفرة إلى TALE-nuclease بفصل سياق المادة الوراثية TRAC من بلازميد plasmid يحمل التيار الهابط للترميز من المعزز T7. تم نقل المادة الوراثية إلى الخلايا التائية المنقاة مسبقة التنشيط خلال 72 ساعة مع حبيبات مغلفة بمضاد CD3/CD28 بحيث يكون كلا من جزيئيmRNAs 2 يحمل شيفرة كلا نصفي إنزيم TALE-nucleases TRAC_T01. وخلال 48 ساعة من بعد العدوى، تم نقل المادة

الوراثية للخلايا التائية من خلال الناقل lentiviral vector الذي يحمل شيفرة 4G7-CAR (سياق برقم تعريف : 14). وخلال يومين بعد العدوى، تم تنقية خلايا CD3NEGباستخدام حبيبات مغناطيسية من مضاد CD3، وخلال 5 أيام بعدالتعبير عن الخلايا فقد تم تنشيطها باستخدام مضاد CD28 ذائب (5 ميكروجرام/مل) .

تم متابعة تكاثر الخلايا لفترة تصل إلى 30 يوما عقب إعادة التنشيط من خلال عد الخلية مرتين لكل أسبوع. يوضح الشكل 1 مضاعفة الاستحثاث في عدد الخلايا مقارنة بكمية الخلايا الموجودة عند اليوم 2 عقب إعادة التنشيط لواهبين مختلفين. تمت ملاحظة زيادة التكاثر في الخلايا مزالة التنشيط بـ TCR المعبرة عن 4G7-CAR، وخاصة عند إعادة تنشيطها بالمضاد CD-28 مقارنة بالخلايا التي لم تعدى.

ولبحث سواء ما كانت الخلايا التائية البشرية التي تعبر عن 4G7-CAR تظهر حالة منشطة، فقد تم تحليل التعبير عن مميز التنشيط CD 25 من خلال FACS لمدة 7 أيام بعد العدوى. وكما يشار في الشكل 2، فقد تم تعداء الخلايا المناقة بناقل lentiviral vectorيحمل شيفرة إلى 4G7-CAR معبرة بصورة معقولة عن كمية أكبر من CD25 على سطحها بخلاف الخلايا غير المعداة. وقد تمت ملاحظة زيادة التعبير عن كلا من إعادة تنشيط CD28 أو في ظروف عدم إعادة التنشيط.

المثال2: مقارنة بين مستوى التنشيط الأساسي للخلايا التائية البشرية الأولية المعبرة عن 4G7-CAR، وبين FMC63-CARالتقليدية.

لتعيين ما إذا كانت4G7 scFVيشار لها بالحالة"منشطة" على الخلايا المعداة، فقد تمت مقارنة التنشيط الأساسي للخلايا التائيةالمعداة بمادة وراثية لمستقبلات CARحاملة 4G7 scFV(سياق برقم تعريف : 17 والذي يحمل شيفرة له بسياق برقم تعريف: 15) أو FMC63 scFV الكلاسيكي (سياق برقم تعريف: 16).

وقد تم نقل المادة الوراثية للخلايا التائيةالمنقاة البشرية وفقًا للبروتوكول التالي: باختصار، فقد تم التنشيط المسبق لعدد CD3+ 1×610 خلايا خلال 3 أيام باستخدام حبيبات مغلفة من مضاد CD3/CD28، وIL2 معاد الاتحاد، وقد تم التعداء بناقل lentiviral vectors يحمل شيفرة إلى

4G7-CAR (سياق برقم تعريف : 15)، و FMC63-CAR (سياق برقم تعريف : 16) عند MOI من 5 في أطباق لا تستخدم لزراعة الأنسجة بها 12 عينا مغلفة بـ 30 ميكروجرام/ مل retronectin. وخلال 24 ساعة عقب نقل المادة الوراثية، فقد تمت إزالة الوسط واستبداله بوسط جديد. وتم بعدها حفظ الخلايا بتركيز 1×610 خلية /مل خلال فترة الزراعة، وهذا من خلال عد الخلايا كل يومين أو ثلاثة أيام.

وتم تقييم نسبة الخلايا التي تعبر عن CAR من خلال مقياس التدفق الخلوي بعد ثلاثة أيام 3، و 8 أيام، و 15 يومًا، من الأيام بعد العدوى بناقل lentiviral vector يحمل شيفرة إلى 4G7-CAR أو FMC63-CAR من الخلايا التي تعبر عن CAR. وقد تمت ملاحظة أن كفاءة العدوى كانت مساوية نسبيًا في حالة ناقلي فيروسي بطيء lentiviral vectors (الشكل 3).

تم التحقق مما إذا كانت الخلايا التائية البشرية التي تعبر عن 4G7-CAR تظهر تنشيطًا للحالة أكثر من الخلايا التائية البشرية التي تعبر عن FMC63-CAR. ولهذا الغرض، فإن التعبير عن مميز التنشيط CD 25 كان مقارنا على سطح الخلايا التائية المعداة بناقلي lentiviral vectors في نقطتي زمن مختلفتين. وكما يشار في الشكل 4، في الأيام 3 و 8 بعد العدوى، فقد تم إعداء الخلايا بناقل lentiviral vector يحمل شيفرة إلى 4G7-CAR التي تعبر أكثر عن المزيد من CD25 على سطحها بصورة كبيرة تتجاوز الخلايا المعداة بعائل lentiviral vector يحمل شيفرة FMC63-CAR.

وتم أيضًا تقييم حجم الخلايا المعداة4G7-CARأو FMC63-CARمن خلال مقياس التدفق الخلوي عند نقاط وقت مختلفة. وقد تمت ملاحظة أن الخلايا التي تعبر عن 4G7-CAR كانت أكبر من الخلايا التي تعبر عن FMC63-CAR، في الأيام 3 و 8 و 15 بعد نقل المادة الوراثية كما يبين الشكل 5.

عقب التنشيط المعملي غير النوعي، أظهرت الخلايا المنقول لها المادة الوراثية لمستقبل4G7-CAR زيادة في حجم الخلية (تكوين خلية انفجارية) علاوة على التعبير عن مميزات التنشيط (CD25) على مدى فترة ممتدة وموسعة من الوقت. ويسمح هذا التنشيط طويل الأمد بتكاثر الخلية مقارنة بالخلايا المنقول لها المادة الوراثية بصورة مشابهة لمستقبلCAR تحتوي على FMC63 ScFv.

المثال 3: مقارنة لتكاثر الخلايا التائية البشرية الأولية المعبرة عن4G7-CAR، وFMC63-CAR التقليدية.

لتحديد سواء ما كان4G7 scFV يعبر عن نشاط تكاثر أعلى، أو تكاثر الخلايا التائية المنقول لها مادة وراثية الحامل لمستقبلCAR،4G7 scFV(سياق برقم تعريف 17، والذي يحمل شيفرة له بسياق برقم تعريف 15) أو FMC63 scFV (سياق برقم تعريف : 16) فقد تمت المتابعة لمدة 20 يومًا من خلال عد الخلايا مرتين أسبوعيًا. وقد تم نقل المادة الوراثية للخلايا التائية المنقاة البشرية وفقًا للبروتوكول التالي: باختصار، فقد تم التنشيط المسبق لعدد 1×610+CD3 خلايا خلال 3 أيام باستخدام حبيبات مغلفة من مضاد CD3/CD28، و IL2 معاد الاتحاد، وقد تم الإعداء بناقل lentiviral vectors يحمل شيفرة إلى 4G7-CAR (سياق برقم تعريف : 15)، و FMC63-CAR (سياق برقم تعريف : 16). وتم بعدها حفظ الخلايا في ظروف تقليدية وتم إعادة تنشيطها في اليوم 12. وتم بذر الخلايا بنفس الكثافة، وتم عد الخلايا مرتين أسبوعيًا خلال 20 يومًا. وكما يمثل الشكل 6، فإن نشاط تكاثر الخلايا التائية التي تعبر عن 4G7-CAR بلغ أعلى من ضعفين مقارنة بتلك الخلايا التي تعبر عن FMC63-CAR الكلاسيكي التقليدي.

المراجع

Arimondo, P. B., C. J. Thomas, et al. (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates." Mol Cell Biol26(1): 324-33.

Atkins, J. F., N. M. Wills, et al. (2007). "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)." Rna13(6): 803-10.

Bierer, B. E., G. Hollander, et al. (1993). "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology." Curr Opin Immunol5(5): 763-73.

Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science326(5959): 1509-12.

Choulika, A., A. Perrin, et al. (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of Saccharomyces cerevisiae." Mol Cell Biol15(4): 1968-73.

Christian, M., T. Cermak, et al. (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." Genetics186(2): 757-61.

Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science339(6121): 819-23.

Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature471(7340): 602-7.

Donnelly, M. and G. Elliott (2001). "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14." J Virol75(6): 2566-74.

Doronina, V. A., C. Wu, et al. (2008). "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon." Mol Cell Biol28(13): 4227-39.

Eisenschmidt, K., T. Lanio, et al. (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage." Nucleic Acids Res33(22): 7039-47.

Garneau, J. E., M. E. Dupuis, et al. (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature468(7320): 67-71.

Gasiunas, G., R. Barrangou, et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A109(39): E2579-86.

Henderson, D. J., I. Naya, et al. (1991). "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production." Immunology73(3): 316-21.

Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor." Blood116(7): 1035-44.

Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science337(6096): 816-21.

Kalish, J. M. and P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation." Ann N Y Acad Sci1058: 151-61.

Li, T., S. Huang, et al. (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain." Nucleic Acids Res39(1): 359-72.

Liu, J., M. W. Albers, et al. (1992). "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity." Biochemistry31(16): 3896-901.

Mali, P., L. Yang, et al. (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science339(6121): 823-6.

Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." Science326(5959): 1501.

Paques, F. and P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy." Curr Gene Ther7(1): 49-66.

Park, T. S., S. A. Rosenberg, et al. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells." Trends Biotechnol29(11): 550-7.

Peipp, M., D. Saul, et al. (2004). "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications." J Immunol Methods285(2): 265-80.

Perrin, A., M. Buckle, et al. (1993). "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions." Embo J12(7): 2939-47.

Pingoud, A. and G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery." Nat Biotechnol25(7): 743-4.

Porteus, M. H. and D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases." Nat Biotechnol23(8): 967-73.

Rouet, P., F. Smih, et al. (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease." Mol Cell Biol14(12): 8096-106.

Sorek, R., C. M. Lawrence, et al. (2013). "CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea." Annu Rev Biochem.

Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function." Q Rev Biophys38(1): 49-95.

قائمة التتابعات

<110> Cellectis

<120> مستقبل مولد المضاد الكيميري المتخصص CD19 وإستخداماته

<130>

<150> PCT/US2013/040755

<151> 2013-05-13

<150> PCT/US2013/040766

<151> 2013-05-13

<150> US 13/892,805

<151> 2013-05-13

<150> USP 61/888,259

<151> 2013-10-08

<160> 24

5

<170>نسخة الاصدار 3.5

<210> 1

<211> 464 10

<212> PRT

<213> mus musculus

<220>

<223> anti-human CD19 monoclonal antibody 4G7 immunoglobulin gamma1 heavy chain 15

<400> 1

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn

65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr

130 135 140

Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn

145 150 155 160

Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro

165 170 175

Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr

180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val

195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val

210 215 220

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg

225 230 235 240

Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser

245 250 255

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu

260 265 270

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro

275 280 285

Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala

290 295 300

Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val

305 310 315 320

Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe

325 330 335

Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

340 345 350

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile

355 360 365

Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys

370 375 380

Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp

385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp

405 410 415

Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser

420 425 430

Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly

435 440 445

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

450 455 460

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> mus musculus

<220>

<223> anti-human CD19 monoclonal antibody 4G7 immunoglobulin kappa light chain

<400> 2

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe

85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro

130 135 140

Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe

145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp

165 170 175

Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp

180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys

195 200 205

Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys

210 215 220

Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225 230 235

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> mus musculus

<220>

<223> fragment of anti-human CD19 monoclonal antibody 4G7 immunoglobulin gamma1 heavy chain-(residues 20-140)

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> mus musculus

<220>

<223> fragment of anti-human CD19 monoclonal antibody 4G7 immunoglobulin kappa light chain (residues 21-130)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Arg Ala Asp

115

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> تتابع صناعي 5

<220>

<223> fragment of anti-human CD19 monoclonal antibody 4G7 immunoglobulin kappa light chain

10

<400> 5

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

Arg Ser Asp Pro

115

5

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

10 <213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: أوليجو ببتيد تخليقي

15 <220>

<223> Linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 7

5

<211> 252

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

10 <220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220>

<223> scFV 4G7 version 1

15

<400> 7

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala

130 135 140

Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg

145 150 155 160

Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp

165 170 175

Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met

180 185 190

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

195 200 205

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val

210 215 220

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly

225 230 235 240

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro

245 250

<210> 8

<211> 251

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220>

<223> scFV 4G7 version 2

<400> 8

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala

130 135 140

Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg

145 150 155 160

Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp

165 170 175

Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met

180 185 190

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser

195 200 205

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val

210 215 220

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly

225 230 235 240

Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp

245 250

5

<210> 9

<211> 250

<212> PRT 10

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

15

<220>

<223> scFV FMC63

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys Ala Gly Gly Gly

100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser

130 135 140

Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp

145 150 155 160

Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp

165 170 175

Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu

180 185 190

Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe

195 200 205

Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

210 215 220

Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

225 230 235 240

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp

245 250

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> fragment of T-cell surface glycoprotein CD3 zeta chain

<400> 10

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> Fragment of 4-1BB (residues 214-255)

<400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 12

<211> 41

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> Fragment of T-cell-specific surface glycoprotein CD28

<400> 12

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 13

<211> 69

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220> 5

<223> Fragment of T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain isoform 1 precursor (residues 138-206)

<400> 13

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala 10

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30 15

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile

35 40 45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

50 55 60

5

Ile Thr Leu Tyr Cys

65

10

<210> 14

<211> 495

<212> PRT

15 <213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220>

<223> 4G7-CAR version 1

<400> 14

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu 5

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30 10

Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

15

Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser

85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val

115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val

145 150 155 160

Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val

165 170 175

Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn

180 185 190

Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu

195 200 205

Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val

225 230 235 240

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr

245 250 255

Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp

260 265 270

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

275 280 285

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

290 295 300

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile

305 310 315 320

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

325 330 335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

340 345 350

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg

370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro

420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

450 455 460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

465 470 475 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490 495

<210> 15

<211> 495

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220> 5

<223> 4G7-CAR version 2

<400> 15

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15 10

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile

20 25 30

15

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr

35 40 45

Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr

65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe

115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met

145 150 155 160

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser

165 170 175

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr

180 185 190

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu

195 200 205

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu

225 230 235 240

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro

245 250 255

Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro

260 265 270

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

275 280 285

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

290 295 300

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile

305 310 315 320

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val

325 330 335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

340 345 350

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg

370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro

420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp

435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg

450 455 460

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr

465 470 475 480

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490 495

<210> 16

<211> 494

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220>

<223> FMC63-CAR

<400> 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp

35 40 45

Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn

100 105 110

Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Lys

115 120 125

Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu

145 150 155 160

Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val

165 170 175

Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys

180 185 190

Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr

195 200 205

Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys

210 215 220

Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala

225 230 235 240

Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met

245 250 255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Pro Thr

260 265 270

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser

275 280 285

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly

290 295 300

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp

305 310 315 320

Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile

325 330 335

Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
340 345 350

Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
355 360 365

Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
370 375 380

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
385 390 395 400

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
405 410 415

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg

420 425 430

Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys

435 440 445

Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg

450 455 460

Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys

465 470 475 480

Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

485 490

<210> 17 5

<211> 1488

<212> DNA

<213>تتابع صناعي

10

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي نيوكليوتيد تخليقي

<220>

<223> 4G7-CAR version 2 15

<400> 17

atggagaccg acaccctgct gctgtgggtg ctgctgctgt gggtgccagg cagcaccggc 60

gaggtgcagc tgcagcagag cggacccgag ctgatcaagc caggcgccag cgtgaagatg 120

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctacgtga tgcactgggt gaagcagaag 180

ccaggccagg gcctggagtg gatcggctac atcaacccct acaacgacgg caccaagtac 240

aacgagaagt tcaagggcaa ggccaccctg accagcgaca agagcagcag caccgcctac 300

atggagctga gcagcctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgcgc cagaggcacc 360

tactactacg gcagccgggt gttcgactac tggggccagg gcaccaccct gaccgtgagc 420

tctggcggag gcggctctgg cggaggcggc tctggcggag gcggcagcga catcgtgatg 480

acccaggctg cccccagcat ccccgtgacc ccaggcgaga gcgtgagcat cagctgccgg 540

agcagcaaga gcctgctgaa cagcaacggc aacacctacc tgtactggtt cctgcagcgg 600

ccaggccaga gcccccagct gctgatctac cggatgagca acctggccag cggcgtgccc 660

gaccggttca gcggcagcgg cagcggcacc gccttcaccc tgcggatcag ccgggtggag 720

gccgaggacg tgggcgtgta ctactgcatg cagcacctgg agtacccctt caccttcgga 780

gccggcacca agctggagct gaagcggtcg gatcccacca ccaccccagc cccacggcca 840

cctacccctg ccccaaccat cgccagccag cccctgagcc tgcggcctga agcctgcagg 900

cctgccgccg gaggagccgt gcacacaagg ggcctggact tcgcctgcga catctatatc 960

tgggcccccc tggccgggac atgcggggtg ctgctgctgt ccctggtgat tacactgtat 1020

tgcaaacggg gccggaagaa gctgctgtac atcttcaagc agcccttcat gcggcccgtg 1080

cagaccaccc aggaggagga cggctgcagc tgccggttcc ccgaggaaga ggaaggcggc 1140

tgcgagctgc gggtgaagtt cagccggagc gccgacgccc cagcctacca gcagggccag 1200

aaccagctgt acaacgagct gaacctggga cggcgggagg agtacgacgt gctggacaag 1260

cggcggggac gggaccccga gatgggcggc aagcctcgcc ggaagaatcc ccaggagggc 1320

ctgtacaacg agctgcagaa ggacaagatg gccgaggcct acagcgagat cggcatgaag 1380

ggcgagcggc gccggggcaa gggccacgac ggcctgtacc agggcctgag caccgccacc 1440

aaggacacct acgacgccct gcacatgcag gccctgccac cccggtga 1488

<210> 18

5

<211> 20

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

10 <220>

<223>وصف التتابع الصناعي: أوليجو ببتيد تخليقي

<220>

<223>ببتيد فردي

15

<400> 18

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

5

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

10 <213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: أوليجو ببتيد تخليقي

<220> 15

<223>ببتيد فردي

<400> 19

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20 5

<210> 20

<211> 49 10

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

<220>

15 <223>وصف التتابع الصناعي: أوليجو نيوكليوتيد تخليقي

<220>

<223> TRAC_T01

<400> 20

Thr Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr Cys

1 5 10 15

Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly

20 25 30

Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly

35 40 45

Ala

<210> 21

<211> 530

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220>

<223> Repeat TRAC_T01-L

<400> 21

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

65 70 75 80

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala

245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val

355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515 520 525

Leu Glu

530

<210> 22

<211> 530

<212> PRT

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي ببتيد تخليقية

<220> 5

<223>متكرر TRAC_T01-R

<400> 22

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

1 5 10 15 10

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

15

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His

65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala

245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly

260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly

305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn

340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val

355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu

385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala

420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala

515 520 525

Leu Glu

530

<210> 23

<211> 2814

<212> DNA

<213>تتابع صناعي

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي نيوكليوتيد تخليقي

<220>

<223> TRAC_T01-R TALEN

<400> 23

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180

acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa cacccggcag cgttagggac cgtcgctgtc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420

gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 600

gtggccatcg ccagcaataa tggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 660

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtggccat cgccagcaat 720

ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780

cacggcttga ccccggagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840

ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 900

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc 1020

agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080

caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtggcaag 1140

caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200

ccggagcagg tggtggccat cgccagccac gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc 1260

cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccggagca ggtggtggcc
1320

atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg
1380

ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt
1440

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc
1500

ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag
1560

acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg
1620

gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg
1680

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtggccat cgccagcaat
1740

attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc
1800

cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg
1860

ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag
1920

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040

agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100

ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctcgtcgcct tggcctgcct cggcgggcgt 2160

cctgcgctgg atgcagtgaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220

aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280

gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg 2340

aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400

aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460

gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccatcg gccaggccga cgaaatgcag 2520

aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580

gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttcctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640

aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700

tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760

gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 24 5

<211> 2832

<212> DNA

<213>تتابع صناعي

10

<220>

<223>وصف التتابع الصناعي: بولي نيوكليوتيد تخليقي

<400> 24

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60 15

gagagacagc acatggacag catcgatatc gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120

cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180

ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240 20

ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgcag cgttgccaga ggcgacacac 300

gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360

acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420

attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480

acgggtgccc cgctcaactt gaccccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 540

ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 600

ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 780

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtggccat cgccagcaat 840

attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900

cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 960

ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag 1020

caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140

agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200

caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggtggcaag 1260

caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320

ccccagcagg tggtggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380

cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc 1440

atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1500

ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt 1560

ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620

ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740

gtggccatcg ccagcaatat tggtggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 1800

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtggccat cgccagccac 1860

gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920

cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 1980

ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040

caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100

cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160

gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220

agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280

ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcacccag 2340

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400

aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctcccccatc 2460

gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc
2520

caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac
2580

cccaacgagt ggtggaaggt gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640

tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac
2700

tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctcctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc
2760

ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg
2820

gccgactgat aa
2832

## عناصر الحماية

1. مستقبل مولد مضاد كيميري نوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor يشمل نطاق ارتباط لربيطة خارج خلوية extracellular ligand binding domain ، ونطاق عبر غشائي transmembrane domain، ونطاق تأشير داخل خلوي intracellular signalling domain، حيث نطاق الارتباط الخارج خلوي المذكور يشمل شدفة FV منفردة السلسلة single chain FV fragment مشتقة من جسم مضاد لـ 4G7 أحادي النسيلة monoclonal antibody 4G7، محددة لـ CD19 ، الشدفة FV منفردة السلسلة المذكورة تشمل الشدفة المتغيرة لسلسلة ثقيلة لغلوبوبين مناعي غاما 1 للجسم المضاد لـ 4G7 أحادي النسيلة CD19 من سياق برقم تعريف: 3 وشدفة متغيرة لسلسلة خفيفة كابا لغلوبوبين مناعي لجسم مضاد 4G7 أحادي النسيلة CD19 بسياق برقم تعريف 4 أو سياق برقم تعريف: 5.

2. مستقبل مولد مضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث أن الشدفة FV منفردة السلسلة single chain FV fragment المذكورة تشتمل على سياق الحمض الأميني amino acid sequence بسياق برقم تعريف: 7 أو 8.

3. مستقبل مولد المضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقًا لعنصر الحماية 1 حيث يشمل نطاق التأشير الداخل خلوي intracellular signalling domain المذكور على نطاق تأشير زيتا CD3 CD3 zeta signalling domain .

4. مستقبل مولد المضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقًا لعنصر الحماية 1، حيث يشمل نطاق التأشير الداخل خلوي intracellular signalling domain المذكور على نطاق 4-1BB 4-1BB domain.

5. مستقبل مولد المضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقا لعنصر الحماية 1، والذي يشمل نطاق عبر غشائي للسلسلة ألفا CD8 بشرية human CD8 alpha chain transmembrane، ونطاق سويقة stalk domain.

6. مستقبل مولد المضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقًا لعنصر الحماية 1، والذي يشمل سياق حمض أميني amino acid sequence له تطابق سياق يتراوح من 75%إلى 100% مع سياق الحمض الأميني من سياق برقم تعريف: 14 أو 15.

7. مستقبل مولد مضاد الكيميري النوعي لـCD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقًا لعنصر الحماية 1، والذي يشمل أيضًا نطاق ارتباط ربيطة خارج خلوي extracellular ligand binding domain آخر غير نوعي specific تجاه CD19.

8. عديد نيكليوتيد polynucleotide يحمل شيفرة لمستقبل مولد المضاد الكيميري chimeric antigen receptor المذكورة وفقًا لعنصر الحماية 1.

9. ناقل تعبير expression vector يشتمل على عديد نيكليوتيد polynucleotide وفقًا لعنصر الحماية 8.

10. خلية مناعية immune cells معدلة وراثيًا genetically engineered تعبر على سطح الخلية عن مستقبل مولد مضاد كيميري نوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor تشمل نطاق ارتباط ربيطة خارج خلوية extracellular ligand binding domain ، ونطاق عبر غشائي intracellular signalling domain حيث النطاق الخارج خلوي المذكور يشمل شدفة FV منفردة السلسلة single chain FV fragment مشتقة من الجسم المضاد لـ 4G7 أحادي النسيلة monoclonal antibody 4G7 النوعي تجاه CD19، الشدفة FV منفردة السلسلة المذكورة تشمل الشدفة المتغيرة لسلسلة ثقيلة لغلوبوبين مناعي غاما 1 للجسم المضاد لـ 4G7 أحادي

النسيلة CD19 من سياق برقم تعريف: 3 وشدفة متغيرة لسلسلة خفيفة كابا لغلوبوبين مناعي لجسم مضاد لـ 4G7 أحادي النسيلة CD19 بسياق برقم تعريف 4 أو سياق برقم تعريف: 5.

11. خلية مناعية immune cells معدلة وراثيًا genetically engineered تعبر على سطح الخلية عن مستقبل مولد مضاد كيميري نوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor وفقًا لعنصر الحماية 1.

12. الخلية المناعية immune cell المعدلة وراثيًا genetically engineered وفقًا لعنصر الحماية 10 والتي تشمل أيضًا مستقبل مولد مضاد كيميري chimeric antigen receptor آخر غير نوعي تجاه CD19.

13. الخلية المناعية immune cells المعدلة وراثيًا genetically engineered وفقًا لعنصر الحماية 10، حيث تكون مشتقة من خلايا اللمف التائية الالتهابية inflammatory T-lymphocytes، و خلايا اللمف التائية السامة cytotoxic T-lymphocytes ، وخلايا اللمف التائية المنظمة regulatory T-lymphocytes ، وخلايا اللمف التائية المساعدة T-lymphocytes.

14. الخلية المناعية immune cells المعدلة وراثيًا genetically engineered وفقا لعنصر الحماية 10، حيث تكون الخلية المذكورة مستمدة من واهب سليم.

15. الخلية المناعية immune cells المعدلة وراثيًا genetically engineered وفقا لعنصر الحماية 10 حيث تكون الخلية المذكورة مستمدة من مريض تم تشخيصه بالسرطان.

16. الخلية المناعية immune cells المعدلة وراثيًا genetically engineered وفقا لعنصر الحماية 10 للاستخدام في العلاج.

17. الخلية المناعية immune cells المعدلة وراثيًا genetically engineered وفقا لعنصر الحماية 10 للاستخدام في ليمفوما الخلايا البائية B-cell lymphoma أو اللوكيميا leukemia.

18. طريقة تعديل وراثي لخلية مناعية immune cell تشمل على:

(أ) تزويد خلية مناعية،

(ب) التعبير على سطح الخلية المذكورة عن مستقبل مولد مضاد كيميري نوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor واحد على الأقل وفقًا لعنصر الحماية 1.

19. طريقة التعديل الوراثي لخلية مناعية immune cell وفقًا لعنصر الحماية 18، تشمل على:

(أ) تزويد خلية مناعية،

(ب) إدخال عديد نيكليوتيدات polynucleotide واحد على الأقل في الخلية المذكورة يحمل شيفرة مستقبل مولد مضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor المذكور.

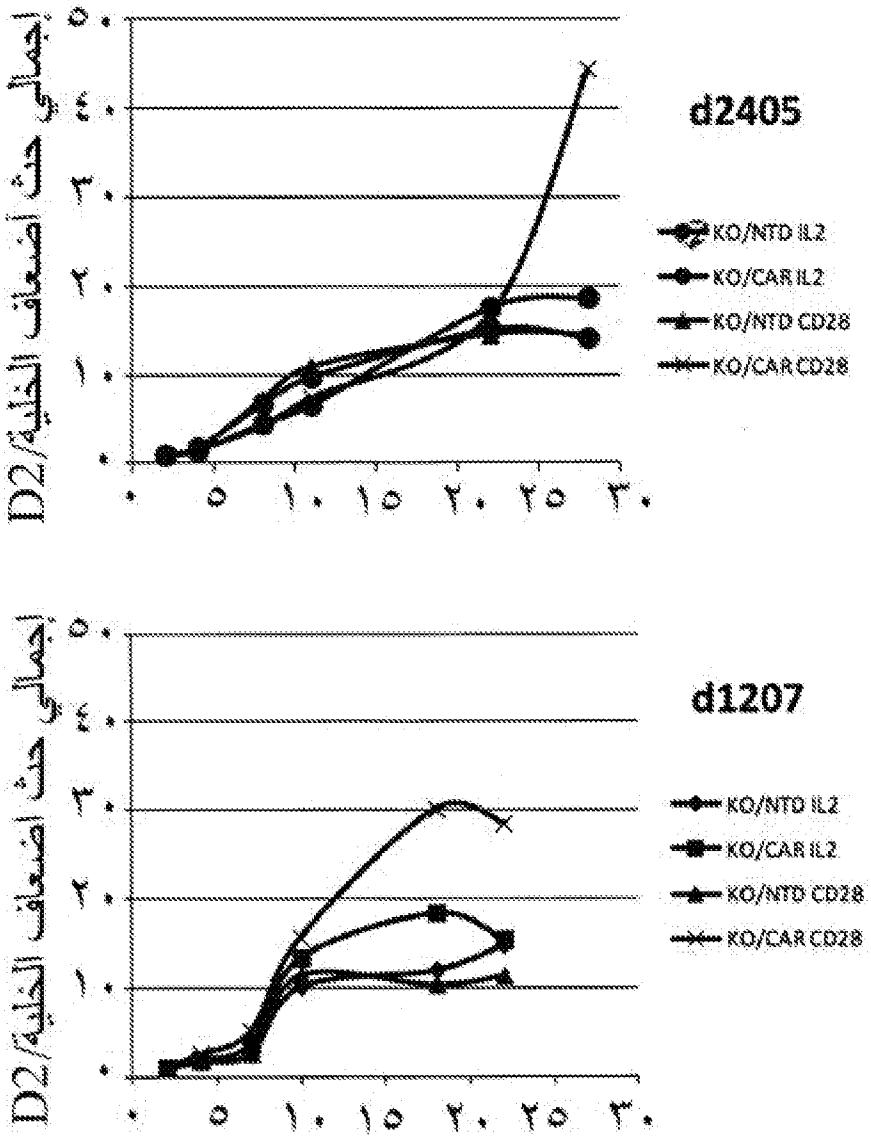
(ج) التعبير عن عديد النيكليوتيدات polynucleotide المذكور في الخلية المذكورة.

20. طريقة التعديل الوراثي لخلية مناعية immune cell وفقًا لعنصر الحماية 18، تشمل على:

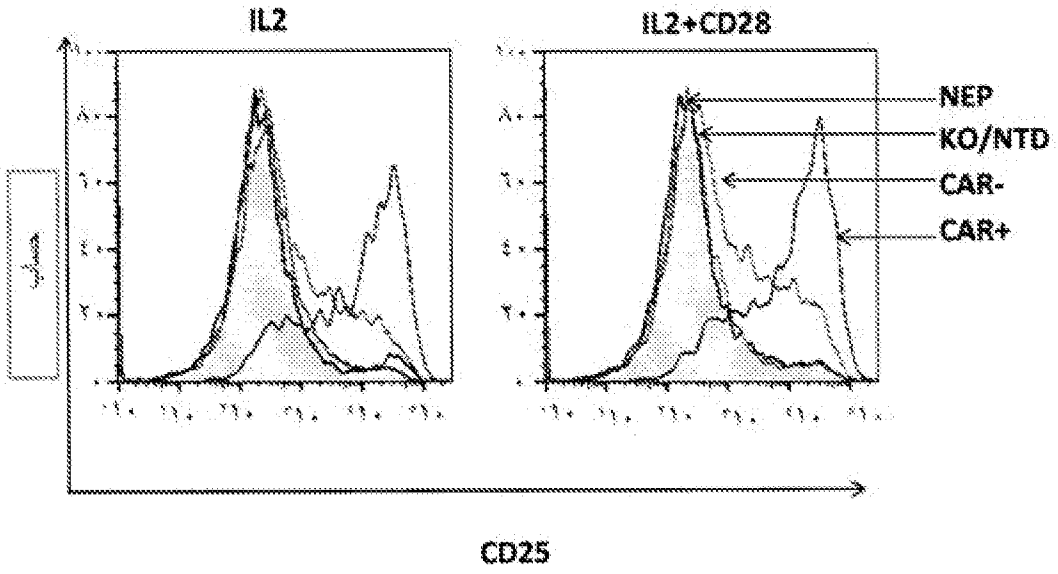
(أ) تزويد خلية مناعية،

(ب) إدخال عديد نيكليوتيدات polynucleotide واحد على الأقل في الخلية المذكورة يحمل شيفرة مستقبل مولد مضاد الكيميري النوعي لـ CD19 CD19 specific chimeric antigen receptor المذكور.

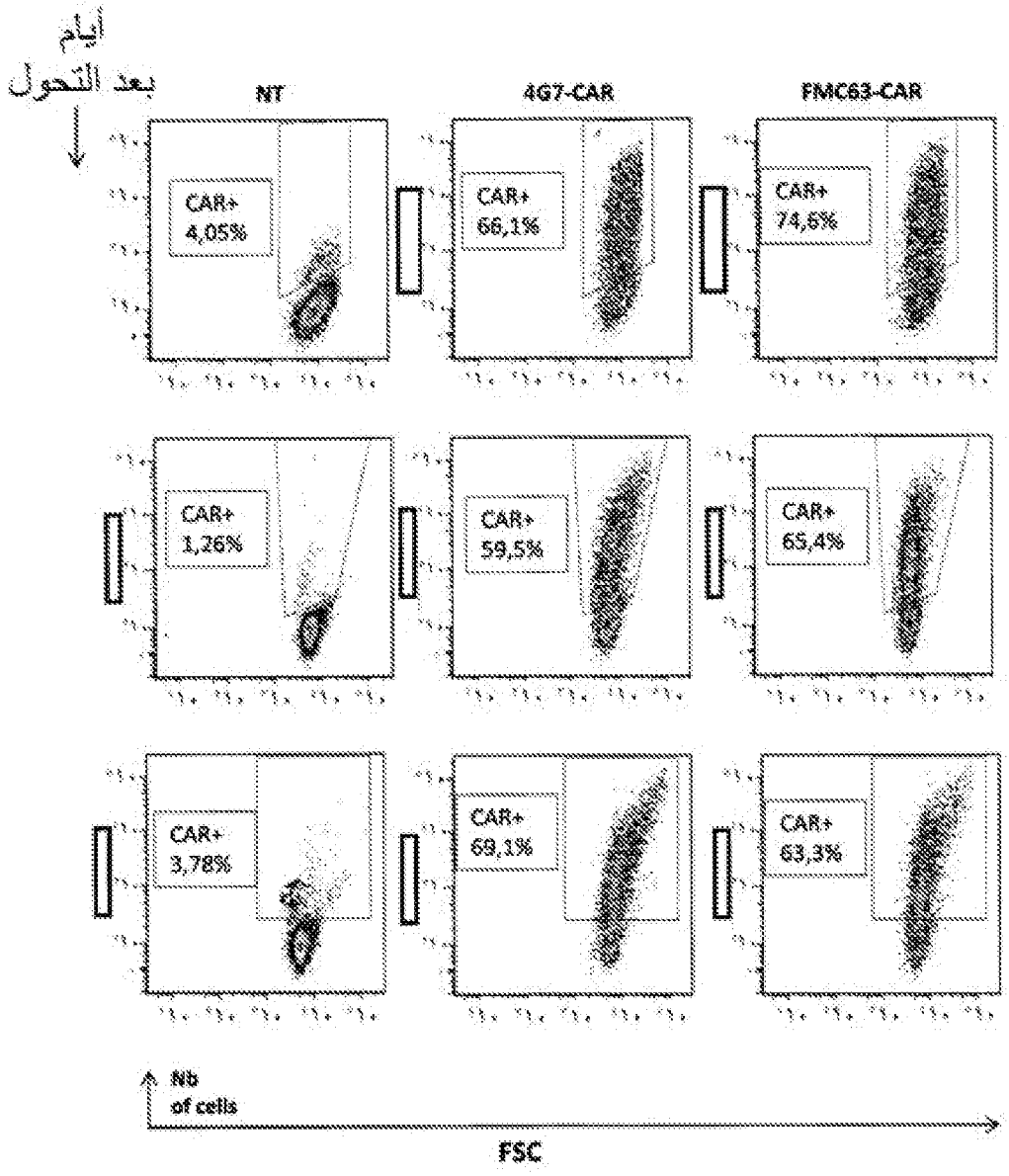
(ج) إدخال مستقبل مولد مضاد كيميري chimeric antigen receptor آخر واحدة على الأقل والذي لا يكون نوعيا لـ CD19.


d2405
KO/NTD IL2
KO/CAR IL2
KO/NTD CD28
KO/CAR CD28
إجمالي حث اضعاف الخلية/D2
٠
١٠
٢٠
٣٠
٤٠
٥٠
٠ ٥ ١٠ ١٥ ٢٠ ٢٥ ٣٠
d1207
KO/NTD IL2
KO/CAR IL2
KO/NTD CD28
KO/CAR CD28
إجمالي حث اضعاف الخلية/D2
٠
١٠
٢٠
٣٠
٤٠
٥٠
٠ ٥ ١٠ ١٥ ٢٠ ٢٥ ٣٠

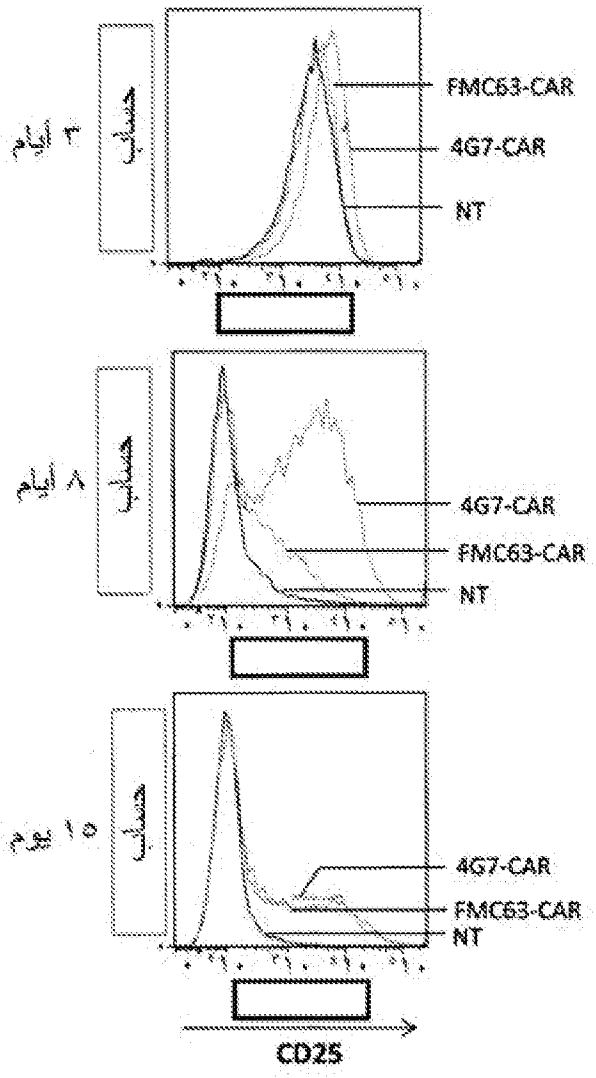
الشكل ١



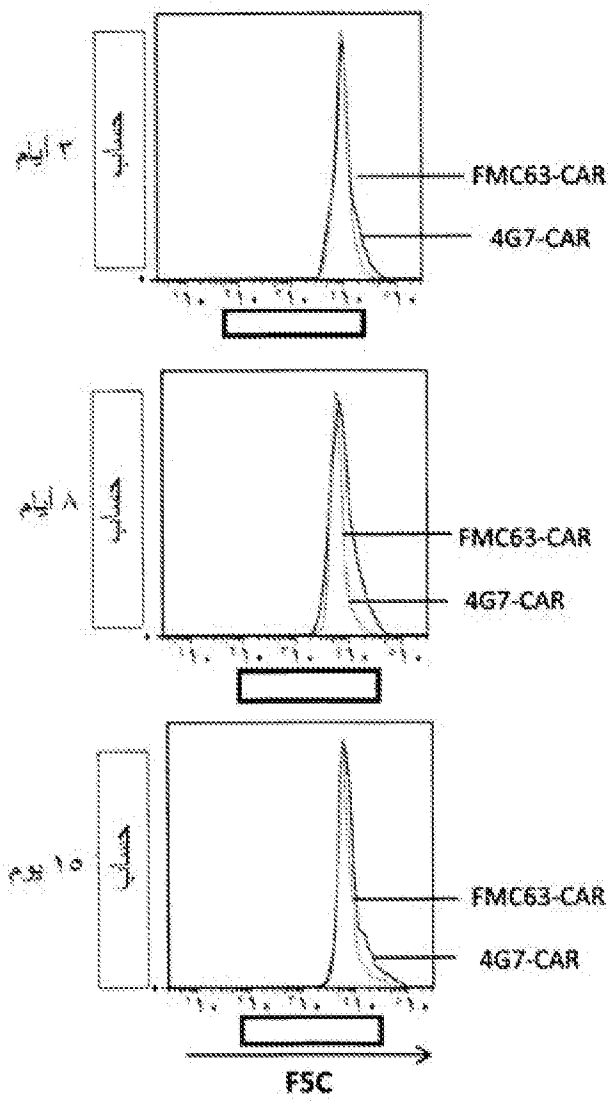

الشكل ٢


أيام
بعد التحول
NT
4G7-CAR
FMC63-CAR
CAR+
4,05%
CAR+
66,1%
CAR+
74,6%
CAR+
1,26%
CAR+
59,5%
CAR+
65,4%
CAR+
3,78%
CAR+
69,1%
CAR+
63,3%
Nb
of cells
FSC

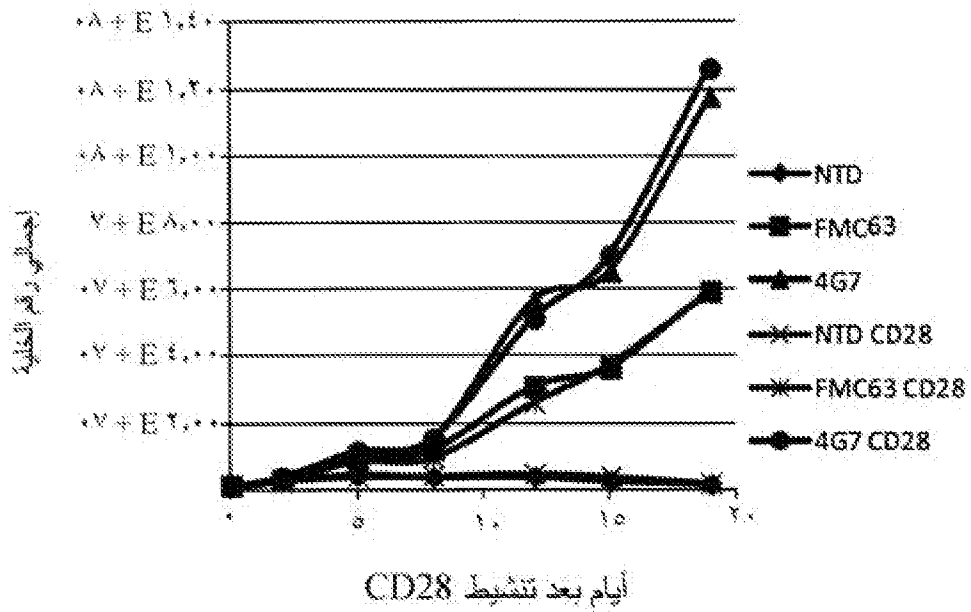
الشكل ٣


٣ أيام
حسلب
FMC63-CAR
4G7-CAR
NT
٨ أيام
حسلب
4G7-CAR
FMC63-CAR
NT
١٥ يوم
حسلب
4G7-CAR
FMC63-CAR
NT
CD25

الشكل ٤


٣ أيام
حمليب
FMC63-CAR
4G7-CAR
٨ أيام
حمليب
FMC63-CAR
4G7-CAR
١٥ يوم
حمليب
FMC63-CAR
4G7-CAR
FSC

الشكل ٥


NTD
FMC63
4G7
NTD CD28
FMC63 CD28
4G7 CD28
٠
٥
١٠
١٥
٢٠
أيام بعد تنشيط CD28

الشكل ٦

# 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**