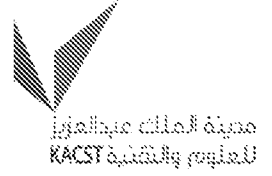


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



مدينة الملك عبدالعزيز
للعلوم والتقنية KACST

المملكة العربية السعودية
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ٢٩/٠٥/١٤٢٥هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ٣٦٠٧٣٢٩-٢-١٦١ وتاريخ ٣٠/١٢/١٤٣٦هـ، يقرر منح:

ميموريال سلوان-كيترينج كانسر سينتر

MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER

براءة اختراع رقم ٦٤٢١

بتاريخ ٠٢/٠٨/١٤٤٠هـ الموافق ٠٧/٠٤/٢٠١٩ م

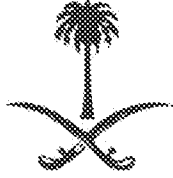
عن الاختراع المسمى/ تركيبات وطرق للعلاج المناعي

Compositions and methods for immunotherapy

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي

م. صقر بن ناصر الفطيماني



مدينة الملك عبدالعزيز
للعلوم والتقنية KACST

[11] رقم البراءة: ٦٤٢١
[45] تاريخ المنح: ١٤٤٠/٠٨/٠٢ هـ
الموافق: ٢٠١٩/٠٤/٠٧ م

[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[12] براءة اختراع

[56] المراجع:

US 20100178276 ٢٠١٠/٠٧/١٥ م
US 20110293610 ٢٠١١/١٢/٠١ م
US 20121237000 ٢٠١٢/٠٩/٢٠ م

KEICHIRO MIHARA ET AL: "Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin lymphoma", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 151, no. 4, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 37-46, XP055086001, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08297.x.

DAVID L. PORTER ET AL: "Chimeric Antigen 33 Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 365, no. 8, 25 August 2011 (2011-08-25), pages 725-733, XP55052475, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.

اسم الفاحص: خالد بن ناصر الأشقر

[72] اسم المخترع: رينير جيه برينتينز، هولي جيه جاكسون

[73] مالك البراءة: ميموريال سلوان - كيترينج كانسر

سينتر

عنوانه: ١٢٥٧ يورك افينيو نيويورك ١٠٠٢١، امريكا

جنسيته: امريكية

[74] الوكيل: مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[21] رقم الطلب: ٥١٥٣٦٠٩٤٤

[22] تاريخ دخول المرحلة الوطنية: ١٤٣٦/١١/١٠ هـ

الموافق: ٢٠١٥/٠٨/٢٥ م

تاريخ الإيداع للطلب الدولي: ٢٠١٤/٠٢/٢٦ م

[86] رقم الطلب الدولي: PCT/US2014/018667

[87] رقم النشر الدولي: WO/2014/134165

تاريخ النشر الدولي: ٢٠١٤/٠٩/٠٤ م

[30] بيانات الأسبقية:

US 61/769,043 ٢٠١٣/٠٢/٢٦ م

[51] التصنيف الدولي (IPC⁸):

A61K 035/012, C12N 005/010

[54] اسم الاختراع: تركيبات وطرق للعلاج المناعي

Compositions and methods for immunotherapy

[57] الملخص: يتعلق الاختراع الحالي بتقديم خلايا مستجيبة

للمناعة immunoresponsive cells, بما في ذلك

خلايا T, خلايا T سامة للخلايا cytotoxic T cells,

خلايا T تنظيمية regulatory T cells وخلايا قاتل

طبيعي Natural Killer (NK). تعبر عن مستقبل

يتعرف على مولد الضد وشظية متغيرة ذات سلسلة واحدة

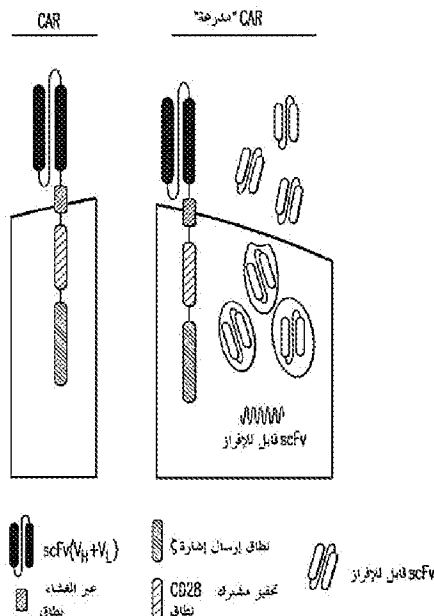
(scFv) single-chain variable fragment.

تتضمن طرق استخدام الخلية المخددة للمناعة تلك

الخاصة بعلاج الأورام والحالات المرضية الأخرى حيث

تكون الزيادة في الاستجابة المناعية المحددة لمولد الضد

antigen-specific immune المطلوبة.



الشكل (١)

عدد عناصر الحماية (١٢) ، عدد الأشكال (٢٩)

تركيبات وطرق للعلاج المناعي

Compositions and methods for immunotherapy

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يقدم الاختراع الحالي طرق وتركيبات لتحسين الاستجابة المناعية نحو أنواع السرطان cancers والكائنات الممرضة pathogens. ويتعلق بخلايا مستجيبة للمناعة immunoresponsive cells تحمل مستقبلات مولد الضد antigen, التي يمكن أن تكون مستقبلات مولد الضد الخيمرية chimeric antigen receptors (CARs), التي تعبر عن مركبات ترابطية تم إدخالها لجزيئات معدلة مناعية. تكون هذه الخلايا المستجيبة للمناعة المعالجة بالهندسة الوراثية موجهة بمولد الضد وتقاوم الإخماد المناعي immunosuppression و/أو تتسم بخواص محسنة منشطة للمناعة. تكون معظم الأورام الخبيثة لخلية B cell malignancies البالغة, بما في ذلك لوكيميا حادة للأرومة اللمفاوية acute lymphoblastic leukemia (ALL), لوكيميا الخلايا اللمفاوية المزمنة chronic lymphocytic leukemia, وورم لمفاوي من غير نوع هودجكين non-Hodgkin's lymphoma غير قابلة للعلاج على الرغم من العلاجات المتاحة حالياً. لقد أثبت العلاج التكميلي باستخدام خلايا T-cell ذاتية المنشأ المعالجة بالهندسة الوراثية أنه دليل على الفعالية العلاجية في سرطان الجلد والأورام الخبيثة لخلية B البطيئة. يمكن تعديل خلايا T لاستهداف مولدات الضد المرتبطة بالورم من خلال إدخال جينات تشفر مستقبلات خلية T غير الطبيعية, التي يطلق عليها مستقبلات مولد الضد الخيمرية chimeric antigen receptors (CAR), المحددة بمولدات الضد المذكورة. يعد العلاج المناعي علاج مستهدف يتسم باحتمالية توفير علاج السرطان. مع ذلك, تتأقلم خلايا T الخبيثة لتكوين بيئة دقيقة مخمدة مناعياً لحماية أنفسها من التعرف والتقليل المناعي. تفرض هذه البيئة الدقيقة "المعادية" تحدياً على طرق العلاج تتضمن تحفيز استجابة مناعية, مثل العلاجات المستهدفة بخلية T. وبناء عليه, يتطلب الأمر استراتيجيات علاجية جديدة لعلاج الأورام على نحو عاجل.

تتعلق البراءة الأمريكية رقم ٢٠١١ / ٠٢٩٣٦١٠ بأجسام مضادة وجزئيات ترتبط بشكل نوعي مناعي بروتين محفز للخلايا الليمفاوية B Lymphocyte Stimulator (BLyS) واستخداماتها في الوقاية من، علاج، أو تخفيف حدة مرض أو اضطراب مرتبط بالتعبير غير السوي عن مستقبل BLyS أو BLyS أو وظيفة غير ملائمة لمستقبل BLyS أو مستقبل BLyS.

٥ يتعلق الطلب الدولي رقم ٢٠١٢ / ١٢٣٧٥٥ بعوامل علاج مناعي يمكن استخدامها للوقاية من أو علاج حالة مرضية تتسم بوجود خلايا غير مرغوب فيها، مثل أورام أو خلايا أخرى مسببة للمرض. تتعلق البراءة الأمريكية رقم ٢٠١٠ / ١٧٨٢٧٦ بخلايا مستجيبة للمناعة تعبر عن مستقبل يتعرف على مولد ضد واحد على الأقل ومركب ترابطي محفز بشكل مشترك واستخداماتها لعلاج ورم ، مرض معدي أو أمراض أخرى.

١٠ الوصف العام للاختراع

[يقدم الاختراع الحالي بصفة عامة خلايا مستجيبة للمناعة (على سبيل المثال، خلايا T، خلايا قاتل طبيعي Natural Killer (NK)، خلايا T لمفاوية سامة للخلايا cytotoxic T lymphocytes (CTLs)، وخلايا T تنظيمية)، تعبر عن مستقبل رابط لمولد الضد على سبيل المثال، المستقبلات المسماه بـ CAR أو TCR لها فعالية تنشيط الخلية المناعية وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة single-chain variable fragment (scFv) يرتبط بمولد ضد له نشاط مخمد للمناعة (على سبيل المثال، CD47، PD-1، CTLA-4، ومركبات ترابطية منها)، وبالتالي تخفض أو تقلل من الفعالية المخمدة مناعياً لمولد الضد. يقدم الاختراع كذلك خلايا مستجيبة للمناعة (على سبيل المثال، خلايا T، خلايا قاتل طبيعي (NK)، خلايا T لمفاوية سامة للخلايا (CTLs)، وخلايا T تنظيمية)، تعبر عن مستقبل رابط لمولد الضد (على سبيل المثال، CAR أو TCR) لها فعالية تنشيط الخلية المناعية وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة (scFv) ترتبط بمولد ضد لها فعالية تحفيز مناعي أو مساعدة على الالتهاب (على سبيل المثال، CD28، OX-40، CD40، 4-1BB ومركبات ترابطية منها)، وبالتالي تحسن من فعالية التحفيز المناعي لمولد الضد.

يقدم الاختراع كذلك خلايا مستجيبة للمناعة (على سبيل المثال، خلايا T، خلايا قاتل طبيعي (NK)، خلايا T لمفاوية سامة للخلايا (CTLs)، وخلايا T تنظيمية)، تعبر عن مستقبل رابط لمولد الضد (على سبيل المثال، CAR أو TCR) لها فعالية تنشيط الخلية المناعية وCD40L، على سبيل المثال، CD40L خارجية المنشأ (CD40L التي تم إدخالها مباشرة أو بصورة غير مباشرة في الخلية (على سبيل المثال، عن طريق ناقل لحمض نووي مجرد تشتمل على متواليه حمض نووي تشفر (CD40L nucleic acid sequence encoding)، مقارنة بـ CD40L داخلي المنشأ المتكون في الخلية ذاتها)، وبالتالي تحسن من فعالية التحفيز المناعي لمولد الضد.

وبناء عليه، يقدم الاختراع طرق استخدام مثل هذه الخلايا المستجيبة للمناعة لعلاج الأورام، المرض المعدى، والأمراض الأخرى. في أحد الجوانب، يقدم الاختراع خلية معزولة مخمدة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة، وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي ببتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة أو نشاط محفز للمناعة.

في جانب آخر، يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو الوقاية من الأورام لدى خاضع، تشتمل الطريقة على إعطاء، إلى الخاضع، كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يربط مولد ضد أول، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة، وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي ببتيد polypeptide يتسم بنشاط مخمد للمناعة أو نشاط محفز للمناعة، وبالتالي تعالج أو تمنع الأورام لدى الخاضع. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في جانب آخر، يقدم الاختراع طريقة لتقليل حمل ورم لدى خاضع، الطريقة تتضمن إعطاء، إلى الخاضع، كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يربط مولد ضد أول، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة، وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي ببتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة أو نشاط محفز للمناعة، وبالتالي يتم حث موت خلية ورم في الخاضع. في جانب آخر كذلك، يقدم الاختراع طريقة لإطالة بقاء خاضع لديه الأورام، الطريقة تتضمن إعطاء، إلى الخاضع، كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يربط مولد ضد أول، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة،

وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي ببتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة أونشاط محفز للمناعة، وبالتالي إطالة بقاء الخاضع. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

٥ في نماذج متنوعة غير مقيدة، يقدم الاختراع طريقة لزيادة إنتاج سيتوكين منشط مناعي استجابة لخلية سرطان لدى خاضع، تشتمل على إعطاء، إلى الخاضع، خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد من خلية السرطان cancer cell وتعبّر كذلك عن CD40L خارجية المنشأ. في نماذج معينة غير مقيدة، يكون السيتوكين المنشط للمناعة immune-activating cytokine منتقى من المجموعة التي تتكون من. في أحد النماذج المعنية غير المقيدة، يكون السيتوكين المنشط للمناعة IL-12. في نماذج غير مقيدة، يكون المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد CAR. ١٠

في نماذج متنوعة غير مقيدة، يقدم الاختراع طريقة لزيادة إنتاج سيتوكين منشط مناعي استجابة إلى كائن ممرض لدى خاضع، تشتمل على إعطاء، إلى الخاضع، خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد من الكائن الممرض وتعبّر كذلك عن CD40L خارجية المنشأ. في نماذج معينة غير مقيدة، يكون السيتوكين المنشط للمناعة منتقى من المجموعة التي تتكون من. في أحد النماذج المعنية غير المقيدة، يكون السيتوكين المنشط للمناعة IL-12. في نماذج غير مقيدة، يكون المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد CAR. ١٥

في نماذج متنوعة غير مقيدة، يقدم الاختراع طريقة لزيادة استجابة خلية السامة للخلايا CD8+ إلى خلية سرطان لدى خاضع، تشتمل على إعطاء، إلى الخاضع، خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد الذي يربط مولد الضد من خلية السرطان وتعبّر كذلك عن CD40L خارجية المنشأ. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR. ٢٠

في نماذج متنوعة غير مقيدة، يقدم الاختراع طريقة لزيادة استجابة خلية السامة للخلايا CD8+ إلى كائن ممرض لدى خاضع، تشتمل على إعطاء، إلى الخاضع، خلية مستجيبة للمناعة تضم

مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد من الكائن الممرض وتعبّر كذلك عن CD40L خارجية المنشأ. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في نماذج متنوعة غير مقيدة، يقدم الاختراع طريقة لتحسين إنضاج خلية شجرية لدى خاضع يعاني من السرطان، تشتمل على إعطاء، إلى الخاضع، خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد الذي يربط مولد الضد لخلية السرطان وتعبّر كذلك عن CD40L خارجية المنشأ. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في نماذج متنوعة غير مقيدة، يقدم الاختراع طريقة لتحسين إنضاج خلية شجرية لدى خاضع يعاني من مرض ناتج عن كائن ممرض، تشتمل على إعطاء، إلى الخاضع، خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد من الكائن الممرض وتعبّر كذلك عن CD40L خارجية المنشأ. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في جانب آخر كذلك، يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو الوقاية من الأورام لدى خاضع، تشتمل الطريقة على إعطاء، إلى الخاضع، كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يربط مولد ضد أول، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة، والتعبير CD40L خارجية المنشأ، وبالتالي تعالج أوتقي الأورام لدى الخاضع. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في جانب آخر، يقدم الاختراع طريقة لتقليل حمل ورم لدى خاضع، الطريقة تتضمن إعطاء، إلى الخاضع، كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة immunoresponsive cell تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يربط مولد ضد أول، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة، والتعبير CD40L خارجية المنشأ، بالتالي يتم حث موت خلية ورم في الخاضع. في جانب آخر كذلك، يقدم الاختراع طريقة لإطالة بقاء خاضع لديه الأورام، الطريقة تتضمن إعطاء، إلى الخاضع، كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يربط مولد ضد أول first antigen، حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة، والتعبير CD40L خارجية المنشأ، وبالتالي إطالة بقاء الخاضع.

في جانب آخر كذلك, يقدم الاختراع طريقة لعلاج سرطان دم في خاضع في حاجة إلى ذلك, الطريقة تتضمن إعطاء الخاضع كمية فعالة علاجياً من خلية T تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد الذي يربط CD19, حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة immunoreponsive cell, وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان soluble single-chain variable fragment (scFv) التي تربط واحد أو أكثر من CD47, PD-1, CTLA-4, ومركبات ترابطية منها, وبالتالي تعالج سرطان الدم لدى الخاضع. في نماذج غير مقيدة, المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في جانب آخر كذلك, يقدم الاختراع طريقة لعلاج سرطان دم في خاضع في حاجة إلى ذلك, الطريقة تتضمن إعطاء الخاضع كمية فعالة علاجياً من خلية T تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد الذي يربط CD19, حيث ينشط الارتباط الخلية المخمدة للمناعة, والتعبير CD40L خارجية المنشأ, وبالتالي تعالج سرطان الدم لدى الخاضع. في نماذج غير مقيدة, يكون مولد الضد الذي يتعرف على المستقبل CAR.

في أحد الجوانب, يقدم الاختراع طريقة لإنتاج خلية مستجيبة للمناعة محددة بمولد ضد, الطريقة تتضمن إدخال في الخلية المخمدة للمناعة متوالية حمض نووي تشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة (scFv) تربط بولي ببتيد polypeptide يتسم بنشاط مخمد للمناعة أو نشاط محفز للمناعة, حيث يكون للخلية المستجيبة للمناعة مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد. في نماذج غير مقيدة, المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في أحد الجوانب, يقدم الاختراع طريقة لإنتاج خلية مستجيبة للمناعة محددة بمولد ضد, الطريقة تتضمن إدخال في الخلية المخمدة للمناعة متوالية حمض نووي تشفر CD40L, حيث الخلية المخمدة للمناعة يكون مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد. في نماذج غير مقيدة, تكون متوالية حمض نووي nucleic acid sequence التي تشفر CD40L encodes مرتبطة تشغيلياً بعنصر معزز معبر عنه على نحو تكويني أو على نحو قابل للحث الخلية المخمدة للمناعة, تتألف اختياريًا من ناقل. في نماذج غير مقيدة, يقدم الاختراع حمض نووي يشتمل على متوالية تشفر CAR وتشفر CD40L, يكون كل منها مرتبط على نحو تشغيلياً بعنصر معزز معبر عنها على نحو

تكويني أو على نحو حي الخلية المخددة للمناعة، ويمكن أن يتألف الحمض النووي nucleic acid المذكور اختياريًا من ناقل vector . في أحد الجوانب، يقدم الاختراع ناقل يضم متواليات حمض نووي تشفر مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد، ومتواليات حمض نووي يشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي بيتيد له نشاط مخمد للمناعة أو نشاط محفز للمناعة. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR.

في أحد الجوانب، يقدم الاختراع ناقل يضم متواليات حمض نووي تشفر مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد، ومتواليات حمض نووي تشفر CD40L. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR. في نموذج محدد غير مقيد، يقدم الاختراع ناقل فيروسية عكسية تحتوي على مضاد CD19 CAR (Z1928) - وحمض نووي يشفر CD40L.

في جانب ذي صلة، يقدم الاختراع تركيبة صيدلانية تحتوي على كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة وفقاً لأي جانب من الاختراع المبين في الطلب الحالي في سواغ excipient مقبول صيدلانياً. في جانب آخر ذي صلة، يقدم الاختراع تركيبة صيدلانية خاصة بعلاج الأورام تحتوي على كمية فعالة من مولد ضد الورم-المحدد لخلية T وفقاً لأي جانب من الاختراع المبين في الطلب الحالي في سواغ مقبول صيدلانياً.

في جانب إضافي، يقدم الاختراع طاقم لعلاج الورم، عدوى ممرضة، اضطراب مناعة ذاتية autoimmune disorder ، أو غريسة من نفس المصدر، يحتوي الطاقم على خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على مولد الضد يرتبط بمولد ضد وينشط الخلية المخددة للمناعة، وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي بيتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة أو نشاط محفز للمناعة. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR. في نماذج معينة، يحتوي الطاقم كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية لعلاج خاضع يعاني من الأورام، عدوى ممرضة، اضطراب مناعة ذاتية autoimmune disorder ، أو غريسة transplant من نفس المصدر.

في جانب إضافي، يقدم الاختراع طاقم لعلاج الورم، أو عدوى ممرضة، اضطراب مناعة ذاتية، أو غريسة من نفس المصدر، يحتوي الطاقم على خلية مستجيبة للمناعة تضم مستقبل يتعرف على

مولد الضد يرتبط بمولد ضد وينشط الخلية المخددة للمناعة، والتعبير CD40L خارجية المنشأ. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR. في نماذج معينة، يحتوي الطاقم كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية الخاصة بعلاج خاضع يعاني من الأورام، عدوى ممرضة، اضطراب مناعة ذاتية، أو غريسة من نفس المصدر.

٥ في جانب إضافي، يقدم الاختراع طاقم لعلاج الورم، عدوى ممرضة، اضطراب مناعة ذاتية، أو غريسة من نفس المصدر، يشتمل الطاقم على حمض نووي تشفر CAR يتعرف على مولد ضد من الورم، كائن ممرض، اضطراب مناعة ذاتية، أو عضو منزرع مطلوب علاجه، وحمض نووي يشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي ببتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة وأنشيط محفز للمناعة. اختياريًا يمكن أن يتضمن واحد أو كلا الحمضين النوويين ناقل، يمكن أن يكون نفس ناقل التعبير (ثنائي الصبغيات bicistronic) أو ناقل تعبير منفصلة. الحمض النووي الذي يشفر CAR و/أو الحمض النووي الذي يشفر scFv يمكن أن يكون كل منهما مرتبط تشغيلاً بمعزز يمكن أن يكون نفس المعززات أو معززات مختلفة. في نماذج معينة، يحتوي الطاقم كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية الخاصة بعلاج خاضع يعاني من الأورام، عدوى ممرضة، اضطراب مناعة ذاتية، أو غريسة من نفس المصدر.

١٥ في جانب إضافي، يقدم الاختراع طاقم لعلاج السرطان، يشتمل الطاقم على حمض نووي تشفر CAR يتعرف على مولد ضد من السرطان، وحمض نووي يشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي ببتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة وأنشيط محفز للمناعة. اختياريًا يمكن أن يتضمن واحد أو كلا الحمضين النوويين ناقل، يمكن أن يكون نفس ناقل التعبير (ثنائي الصبغيات) أو ناقل تعبير منفصلة. الحمض النووي الذي يشفر CAR و/أو الحمض النووي الذي يشفر scFv يمكن أن يكون كل منهما مرتبط تشغيلاً بمعزز يمكن أن يكون نفس المعززات أو معززات مختلفة. في نماذج معينة، يحتوي الطاقم كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية الخاصة بعلاج خاضع يعاني من السرطان.

٢٥ في جانب إضافي، يقدم الاختراع طاقم لعلاج السرطان أو اضطراب يتوسط فيه الكائن الممرض، يشتمل الطاقم على حمض نووي تشفر CAR يتعرف على مولد ضد من السرطان أو الكائن الممرض، وحمض نووي يشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة قابلة للذوبان (scFv) تربط بولي

ببتيد يتسم بنشاط مخمد للمناعة أونشاط محفز للمناعة. اختيارياً يمكن أن يتضمن واحد أو كلا الحمضين النوويين ناقل، يمكن أن يكون نفس ناقل التعبير (ثنائي الصبغيات) أونواقل تعبير منفصلة. الحمض النووي الذي يشفر CAR و/أو الحمض النووي الذي يشفر scFv يمكن أن يكون كل منهما مرتبط تشغلياً بمعزز يمكن أن يكون نفس المعززات أومعززات مختلفة. في نماذج معينة، يحتوي الطاقم كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية الخاصة بعلاج خاضع يعاني من السرطان أواضطراب. في جانب إضافي، يقدم الاختراع طاقم لعلاج السرطان أواضطراب يتوسط فيه الكائن الممرض، يشتمل الطاقم على حمض نووي تشفر CAR يتعرف على مولد ضد من السرطان أوالكائن الممرض، وحمض نووي يشفر CD40L. اختيارياً يمكن أن يتضمن واحد أو كلا الحمضين النوويين ناقل، يمكن أن يكون نفس ناقل التعبير (ثنائي الصبغيات) أونواقل تعبير منفصلة. الحمض النووي الذي يشفر CAR و/أو الحمض النووي يشفر CD40L يمكن أن يكون كل منهما مرتبط تشغلياً بمعزز يمكن أن يكون نفس المعززات أومعززات مختلفة. في نماذج معينة، يحتوي الطاقم كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية الخاصة بعلاج خاضع يعاني من السرطان أو اضطراب.

في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، يتم انتقاء الخلية من المجموعة التي تتكون من خلية T، خلية قاتل طبيعي (NK) Natural Killer، خلية لمفاوية T سامة للخلايا (CTL) cytotoxic T lymphocyte، خلية تنظيمية regulatory T cell، خلية جذعية جنينية بشرية human embryonic stem cell، وخلية جذعية متعددة القدرات pluripotent stem cell يمكن أن تتميز منها الخلايا الشبيهة باللمفاوية. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، الخلية المخمدة للمناعة تكون ذاتية المنشأ.

في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، يكون مولد الضد الذي يتعرف على المستقبل مستقبل خلية T cell receptor (TCR) أومستقبل مولد ضد خيمري chimeric antigen receptor (CAR). في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، يكون المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد داخلي المنشأ أو خارجي المنشأ. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، يتم إظهار المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد بطريقة ناتج الاتحاد الجيني. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في

الطلب الحالي، يتم التعبير عن المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد من ناقل. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، يكون نطاق إرسال الإشارة بين الخلايا من المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد سلسلة CD \square , CD97, CD11a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, IBB- ϵ , نطاق إرسال إشارة CD28, جزء منه، أوتوليفة منها. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR يشتمل على جزء على الأقل من CD28, IBB- ϵ , و/ أو سلسلة CD3 \square (انظر، على سبيل المثال، Zhong et al., 2010, Molecular Ther. 18(2):413-420), إلى جانب جزء مولد الضد الرابط. في نماذج غير مقيدة، المستقبل الذي يتعرف على مولد الضد يكون CAR موصوف في Kohn et al., 2011, Molecular Ther. 19(3):432-438), اختيارياً حيث يكون الجزء الرابط لمولد الضد به استبدال بمتواليات الحمض الأميني متوالية التي ترتبط بورم آخر أو مولد ضد كائن ممرض. في نماذج متنوعة، تعبر الخلية عن ناتج عودة الاتحاد الجيني أو مستقبل مولد ضد داخلي المنشأ يكون 1928z أو 4H1128z.

في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، يكون مولد الضد ورم أو مولد الضد ممرض. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي، مولد ضد الورم يكون واحد أو أكثر من CD19, MUC16, MUC1, CAIX, CEA, CDS, CD7, CD10, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, مولد ضد لخلية مصابة بعدوى من فيروس مضخم للخلايا، EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2, 3,4, FBP, مستقبل أسيتيل كولين جنيني Fetal acetylcholine receptor, مستقبل فولات الفا \square -folate receptor, GD2, GD3, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, \square -سلسلة خفيفة light chain, KDR, LeY, L1 جزئيء التصاق بخلية cell adhesion molecule, MAGE-A1, Mesothelin, NKG2D مركبات ترابطية ligands, NY-ES0-1, مولد ضد جنين ورمي oncofetal antigen (h5T4), PSCA, PSMA, ROR1, TAG-72, VEGF-R2, أو WT-1. في نماذج معينة، يكون مولد الضد CD19 أو MUC16. تكون متواليات الحمض الأميني amino acid sequence التي ترتبط تحديداً بمولدات الضد المذكورة معروفة في المجال أو يمكن تحضيرها باستخدام طرق معروفة

في المجال; تتضمن الأمثلة جلوبيولينات مناعية immunoglobulins , مناطق متغيرة من جلوبيولينات مناعية variable regions of immunoglobulins (على سبيل المثال شظية متغيرة variable fragment ("Fv") أوشظية متغيرة ثنائية التكافؤ bivalent variable fragment ("Fab")), أو أجسام مضادة بسلسلة مفردة single chain antibodies , إلخ.

٥ في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يتم إفراز scFv القابل للذوبان. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يتم التعبير عن scFv من ناقل. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يكون البولي ببتيد المخدم مناعياً واحد أو أكثر من CD47, PD-1, CTLA-4, ومركبات ترابطية منها. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يكون البولي ببتيد المعدل للمناعة واحد أو أكثر من CD28, OX 40, 4-1BB, ومركبات ترابطية منها. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يحسن scFv قابل للذوبان من الاستجابة المناعية من الخلية المخدمة للمناعة.

١٥ في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, تفرز الخلية المخدمة للمناعة سيتوكين. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يتم التعبير عن السيتوكين من الناقل. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, تنطوي التركيبة الصيدلانية التي تحتوي على خلية مستجيبة للمناعة من الاختراع على سيتوكين. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, تم إعطاء خلية مستجيبة للمناعة من الاختراع مع سيتوكين cytokine. في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, يكون السيتوكين واحد أو أكثر من IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, IL7, IL12, IL15, IL21, مستعمرة ملتهمة كبيرة من عامل محفز للخلايا الحبيبية , إنترفيرون ألفا, بيتا أو جاما alpha, beta or gamma interferon ومكون أوعية دموية erythropoietin.

٢٥ في نماذج متنوعة من أي من الجوانب المشروحة في الطلب الحالي, تقلل الطريقة عدد خلايا الورم, تخفض في حجم الورم, تستأصل الورم لدى الخاضع, وتقلل حمل الورم لدى الخاضع, و/ أو تستأصل حمل الورم لدى الخاضع. تتضمن الأورام التوضيحية التي يمكن أن يُستخدم الاختراع لعلاجها, ولكن لا تقتصر على اللوكيميا leukemias (على سبيل المثال, سرطان الدم الحاد

acute leukemia وسرطان الدم الليمفاوي الحاد acute lymphocytic leukemia ، لوكيميا
نخاعية حادة acute myelocytic leukemi ، سرطان الدم نقوي الأرومات الحاد acute
myeloblastic leukemia ، وائِيضاً سَلَائِفِ النَّقَوِيَّاتِ الحادّ acute promyelocytic
leukemia ، وسرطان الدم وحيد الخلايا النخاعي الحاد acute myelomonocytic
leukemia ، وسرطان الدم الوحيدات الحاد acute monocytic leukemia ، ائِيضاً الدَّم
الاحْمِراريّ acute erythroleukemia وسرطان الدم المزمن chronic leukemia ، وسرطان
الدم النخاعي المزمن chronic myelocytic leukemia ، وسرطان الدم الليمفاوي المزمن
chronic lymphocytic leukemia)، كثرة الحمر الحقيقية polycythemia vera ، والأورام
اللمفاوية lymphoma ، (مرض هودجكين Hodgkin's disease ، مرض من غير نوع
هودجكين (non-Hodgkin's disease)، قلة الغلوبولين الكبروي بالدم Waldenstrom's
macroglobulinemia ، مرض سلسلة الثقيلة heavy chain disease ، والأورام الصلبة
solid tumors مثل الأورام اللحمية sarcomas والسرطانات carcinomas (على سبيل
المثال، ساركومة ليفية fibrosarcoma ، ساركومة مخاطية myxosarcoma ، ساركومة شحمية
liposarcoma ، غضروفية chondrosarcoma ، ساركوما عظمية المنشأ osteogenic
sarcoma ، ورم حبلِي chordoma ، عائية angiosarcoma ، عائية ساركومة
endotheliosarcoma وَعَائِيَّةٌ لِمَفِيَّةٌ lymphangiosarcoma ، ساركومةٌ وَعَائِيَّةٌ لِمَفِيَّةٌ
lymphangioendotheliosarcoma ، ورم زليلِي synovioma ، ورم الظهارة المتوسطة
mesothelioma ، ورم، ساركومة عضلية ملساء Ewing's tumor ، سرطان العضلية
المخططة leiomyosarcoma والقولون colon carcinoma ، سرطان البنكرياس pancreatic
cancer ، سرطان الثدي breast cancer ، سرطان المبيض ovarian cancer ، وسرطان
البروستاتا prostate cancer ، وسرطان الخلايا الحرشفية squamous cell carcinoma
وسرطان الخلايا القاعدية Ewing basal cell carcinoma، غدية adenocarcinoma ،
سرطان غدة عرق sweat gland carcinoma ، سرطان الغدة الدهنية sebaceous gland
، carcinoma

سرطان حليمي papillary carcinoma ، الورم الغدي الحليمي papillary
adenocarcinomas ، سرطانة غدية كيسية cystadenocarcinoma ، سرطان النخاع
medullary carcinoma ، وسرطان قصبي المنشأ bronchogenic carcinoma ، وسرطان
الخلايا الكلوية renal cell carcinoma ، الكبدى hepatoma ، النيل قناة سرطان nile duct
carcinoma ، المشيمة choriocarcinoma ، ورم منوي seminoma ، سرطان جنيني ٥
embryonal carcinoma ، ورم WILM ، وسرطان عنق الرحم cervical cancer ، سرطان
uterine cancer ، سرطان الخصية testicular cancer ، سرطان الرئة lung
carcinoma ، سرطان الرئة صغير الخلايا small cell lung carcinoma ، سرطان المثانة
bladder carcinoma ، سرطان الظهارية epithelial carcinoma ، الورم glioma ، نجمي
astrocytoma ، نخاعي medulloblastoma ، ورم قحفي بلعومي craniopharyngioma ، ١٠
ependymoma ، ورم الغدة الصنوبرية pinealoma ، ورم أرومي وعائي
hemangioblastoma ، ورم العصب السمعي acoustic neuroma ، وَرَمُ الدَّبَقِيَّاتِ القَلْبِيَّةِ
oligodendroglioma ، شفاني schwannoma ، سحائي meningioma ، سرطان
melanoma ، ورم أرومي عصبي neuroblastoma ، وورم أرومي شبكي
retinoblastoma). ١٥

في نماذج متنوعة غير مقيدة من أي من الجوانب الموضحة في الطلب الحالي, تكون الأورام واحد
أكثر من سرطان الدم blood cancer ، سرطان الدم لخلية B cell leukemia ، ورم لمفاوي
متعدد multiple myeloma, سرطان الدم لأرومة لمفية acute lymphoblastic leukemia
(ALL), لوكيميا الخلايا اللمفاوية المزمنة chronic lymphocytic leukemia, ورم لمفاوي من
غير نوع هودجكين، وسرطان المبيض. في نماذج معينة, يكون سرطان الدم واحد أو أكثر من ٢٠
سرطان الدم لخلية B, ورم لمفاوي متعدد, لوكيميا حادة للأرومة اللمفاوية (ALL), لوكيميا الخلايا
اللمفاوية المزمنة، وورم لمفاوي من غير نوع هودجكين. في نماذج معينة, تكون الأورام سرطان الدم
لخلية B, يكون مولد الضد CD19، والبولي ببتيدات يتسم بنشاط مخمد للمناعة تكون واحد أو أكثر
من CD47, PD-1, CTLA-4، ومركبات ترابطية منها. في نماذج معينة, تكون الأورام ورم
لمفاوي متعدد, يكون مولد الضد CD19، والبولي ببتيدات يتسم بنشاط مخمد للمناعة تكون واحد ٢٥

وأكثر من CD47, PD-1, CTLA-4، ومركبات ترابطية منها. في نماذج معينة، تكون الأورام
لوكيميا حادة للأرومة اللمفاوية (ALL)، يكون مولد الضد CD19، والبولي ببتيدات تتسم بنشاط
مخمد للمناعة تكون واحد أو أكثر من CD47, PD-1, CTLA-4، ومركبات ترابطية منها. في
نماذج معينة، تكون الأورام لوكيميا الخلايا اللمفاوية المزمنة، يكون مولد الضد CD19، والبولي
ببتيدات تتسم بنشاط مخمد للمناعة تكون واحد أو أكثر من CD47, PD-1, CTLA-4، ومركبات
ترابطية منها. في نماذج معينة، تكون الأورام ورم لمفاوي من غير نوع هودجكين، يكون مولد الضد
CD19، والبولي ببتيدات يتسم بنشاط مخمد للمناعة تكون واحد أو أكثر من CD47, PD-1,
CTLA-4، ومركبات ترابطية منها. في نماذج معينة، تكون الأورام سرطان المبيض، يكون مولد
الضد MUC16، والبولي ببتيدات يتسم بنشاط مخمد للمناعة تكون واحد أو أكثر من CD47, PD-1,
CTLA-4، ومركبات ترابطية منها. ٥ ١٠

التعريفات : ما لم يتم تعريف خلاف ذلك، تحمل جميع التعبيرات الفنية والعملية المستخدمة في
الطلب الحالي المعنى المفهوم على نحو شائع من قبل الشخص المتمرس في المجال الذي ينتمي
إليه هذا الاختراع. وتزود المراجع التالية الشخص ذي المهارة بتعريف عام للكثير من التعبيرات
المستخدمة في هذا الاختراع: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and
Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science ١٥
and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed.,
R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The
Harper Collins Dictionary of Biology (1991). وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي،
تحمل التعبيرات التالية المعاني المعزوة إليها فيما يلي، ما لم يتم تحديد خلاف ذلك.

المقصود بالتعبير "ينشط خلية مستجيبة للمناعة" activates an immunoresponsive cell ٢٠
أن يعني حث الإشارة أو تغييرات في التعبير عن البروتين في الخلية الأمر الذي يترتب عليه
استجابة مناعية. على سبيل المثال، عندما تتجميع سلاسل CD3 استجابة إلى محفزات تثبيط مبنية
على مركب ترابطي وتيروسين لمستقبل مناعي immunoreceptor tyrosine-based
inhibition motifs (ITAMs) يتم إنتاج تتابع تحويل إشارة. في نماذج معينة، عندما يربط TCR
داخلي المنشأ أو CAR خارجي المنشأ، يحدث تكوين لمشبك مناعي يتضمن جميع الكثير من ٢٥

الجزئيات بالقرب من المستقبل المرتبط (على سبيل المثال CD4 أو CD8, CD3 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, إلخ). يسمح هذا التجميع لجزئيات إرسال إشارة للغشاء المرتبط لمحفزات ITAM المحتواة داخل سلاسل CD3 بأن تصبح معالجة بالفوسفور. تبدأ هذه الفسفرة بدورها مسار تنشيط خلية T التي تنشط في النهاية عوامل الانتساخ، مثل NF- κ B و AP-1. تحث عوامل الانتساخ المذكورة التعبير عن الجين الكلي لخلية T لزيادة إنتاج IL-2 لتكاثر والتعبير عن بروتينات خلية T للمنظم الرئيسي لبدء استجابة مناعية تتوسط فيها خلية T. المقصود بـ "يحفز خلية استجابة مناعية" أن يعني إشارة يترتب عليها استجابة مناعية قوية ومستدامة. وفي نماذج متنوعة، يحدث هذا بعد تنشيط الخلية المناعية (على سبيل المثال، خلية T) أو يتم التوسط فيها على نحو متزامن من خلال مستقبلات تتضمن، ولكن ليس على سبيل الحصر، CD28, CD137 (B-1), OX40, CD40 و ICOS. بدون التقيد بأية نظرية معينة، يُعد استقبال العديد من الإشارات التحفيزية هاما للوصول إلى استجابة مناعية قوية وعلى المدى البعيد تتوسط فيها خلية T. بدون استقبال هذه الإشارات التحفيزية، تصبح خلايا T سريعا مثبطة وغير مستجيبة لمولد الضد. حيث تتفاوت تأثيرات هذه الإشارات مشتركة التحفيز وتظل غير مفهومة جزئياً، يترتب عليها بصفة عامة زيادة التعبير عن الجين لتكوين خلايا T زرز طويلة العمر، تكاثرية، ومضادة للتلاشي تستجيب بقوة إلى مولد الضد لاستئصال تام ومستدام. ١٥

التعبير "مستقبل يتعرف على مولد الضد" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى مستقبل يمكنه تنشيط الخلية المناعية (على سبيل المثال، خلية T) استجابة إلى ارتباط مولد الضد. يمكن أن يكون مولد الضد التمثيلي الذي يتعرف على المستقبلات أصلي أو مستقبلات خلية T داخلية المنشأ أو مستقبلات مولد ضد خيمري يتم فيها دمج النطاق الرابط لمولد ضد الورم إلى نطاق إرسال إشارة بين الخلايا يمكنه تنشيط الخلية المناعية (على سبيل المثال، خلية T). ٢٠

وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، التعبير "جسم مضاد" لا يعني فقط جزيئات جسم مضاد سليمة، وإنما كذلك شظايا من جزيئات الجسم المضاد التي تحتفظ بالقدرة على ربط مولد مناعي. تكون مثل هذه الشظايا معروفة جيداً في المجال ويتم استخدامها بانتظام في كل من المعمل وفي الكائن الحي. وبناء عليه، وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، التعبير "جسم مضاد" لا يعني فقط جزيئات جلوبيولين مناعي سليمة وإنما كذلك الشظايا النشطة المعروفة جيداً F(ab')₂ و Fab. ٢٥

- وشظايا Fab التي تفتقر إلى شظية Fe من الجسم المضاد السليم، وبوضوح أكثر بسرعة من التدوير، ويمكن أن يكون لها ارتباط بالنسيج أقل تحديداً للجسم المضاد السليم (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). تتضمن الأجسام المضادة من الاختراع على أجسام مضادة أصلية كاملة، وأجسام مضادة ثنائية التحديد، وأجسام مضادة خيميرية؛ Fab، Fab، وشظايا منطقة V ذات سلسلة مفردة (scFv)، وبولي ببتيدات اندماج، وأجسام مضادة غير تقليدية. ٥
- وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، التعبير "شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة" أو "scFv" يمثل بروتين اندماج من مناطق متغيرة من السلسلة الثقيلة heavy chains (VH) والسلسلة الخفيفة light chains (VL) لجلوبولين مناعي immunoglobulin مرتبط تساهمياً لتشكيل VH::VL دايمر غير متجانس. يتم ربط أي من السلسلة الثقيلة (VH) أو السلسلة الخفيفة (VL) مباشرة أو يتم ربطهما بواسطة رابط يشفر بببتيد (على سبيل المثال، ١٠، ١٥، ٢٠، ٢٥ حمض أميني amino acids)، يوصل الطرف VH ↓ N مع الطرف VH ↓ C، أو الطرف VL ↓ C مع الطرف VL ↓ N. عادة ما يكون الرابط غنياً بالجليسين glycine للمرونة، فضلاً عن سيرين serine أو ثريونين threonine لقابلية الذوبان. على الرغم من إزالة المناطق الثابتة وإدخال رابط، تحتفظ بروتينات scFv بتحديد الجلوبولين المناعي الأصلي. يمكن التعبير عن أجسام مضادة لبولي ببتيد Fv لسلسلة مفردة من حمض نووي بما في ذلك VH- و VL- تشفر متواليات وفقاً لما تم وصفه من قبل (Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988). انظر أيضاً، البراءة الأمريكية أرقام ٥٠٩١٥١٣، و٥١٣٢٤٠٥، و٤٩٥٦٧٧٨؛ ومنشور البراءة الأمريكي أرقام ٢٠٠٥٠١٩٦٧٥٤ و٢٠٠٥٠١٩٦٧٥٤. تم وصف scFvs المضادة التي تتسم بنشاط تشبيطي (انظر، على سبيل المثال، Zhao et al., Hyrbidoma (Larchmt) 2008 27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007 97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006 116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995 2(10):31-40). تم وصف scFvs المؤازرة التي تتسم بنشاط مؤازر (انظر، على سبيل المثال، Peter et al., J Bioi Chern 2003 ٢٥

25278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997 15(8):768-71;

Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55; Ho et al.,

(BioChim Biophys Acta 2003 1638(3):257-66). المقصود بالتعبير "ألفة" مقياس قوة

الارتباط. بدون التقييد بأية نظرية، تعتمد الألفة على قرب التوافق الفراغي الكيميائي بين مواضع

دمج الجسم المضاد ومحددات مولد الضد، على حجم منطقة التلامس بينهم، وعلى توزيع

المجموعات المشحونة وغير ألفة للماء. كما تتضمن الألفة التعبير "تجنب"، الذي يشير إلى قوة

رابطة مولد الضد-الجسم المضاد بعد تكوين معقدات قابلة للعكس. تكون طرق حساب ألفة الجسم

المضادة لمولد الضد معروفة في المجال، تتضمن استخدام لتجارب الارتباط لحساب الألفة. يكون

نشاط الجسم المضاد في الاختبارات الوظيفية (على سبيل المثال، اختبار قياس تدفق الخلايا)

عاكس كذلك لألفة الجسم المضاد. يمكن توصيف ومقارنة قيم ألفة الأجسام المضادة من خلال

النمط الظاهري باستخدام اختبارات وظيفية (على سبيل المثال، اختبار قياس تدفق الخلايا).

التعبير "مستقبل مولد الضد الخيمري" أو "CAR" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى

نطاق رابط لمولد الضد يتم دمج إلى نطاق إرسال إشارة بين الخلايا يمكنه تنشيط أو تحفيز الخلية

المناعية. على النحو الأكثر شيوعاً، يتألف نطاق رابط خارج الخلايا لـ CAR من شظية متغيرة

لسلسلة مفردة (scFv) مشتقة من دمج المناطق المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة والخفيفة لجسم مضاد

وحيد النسيلة فأري أو متوافق مع البشر. بصورة بديلة، يمكن استخدام scFvs التي يتم اشتقاقها من

Fab's (بدلاً من جسم مضاد، على سبيل المثال، تم الحصول عليها من مجموعات Fab). في

نماذج متنوعة، يتم دمج scFv هذه في نطاق عبر الغشاء وبعد ذلك إلى نطاق إرسال إشارة بين

الخلايا. تتضمن CARs من "الجيل الأول" تلك التي لا توفر سوى إشارات CD3 عند ارتباط

مولد الضد، تتضمن CARs من "الجيل الثاني" تلك التي توفر كل من التحفيز المشترك (على

سبيل المثال CD28 أو CD137) وتنشيط (CD3). تتضمن CARs من "الجيل الثالث" تلك

التي توفر التحفيز المشترك المتعدد (على سبيل المثال CD28 و CD137) والتنشيط (CD3).

في نماذج متنوعة، يتم انتقاء CAR بحيث يكون لها ألفة أو تجنب مرتفع لمولد الضد.

التعبير "نشاط مخمد مناعياً" يُقصد به حث الإشارة أو تغييرات في التعبير عن البروتين في خلية

(على سبيل المثال، خلية منشطة مستجيبة للمناعة) يترتب عليها انخفاض في الاستجابة المناعية.

تتضمن البولي ببتيدات المعروف أنها تخدم أو تخفض استجابة مناعية عن طريق ارتباطها PD- , PD-L1 , SIRPa , CTLA-4 , PD-1 , CD47 ، ومركباتها الترابطية المناظرة، تتضمن B7-1 , L2 ، و B7-2 . تكون مثل هذه البولي ببتيدات موجودة في البيئة الدقيقة للورم وتثبط استجابات مناعية إلى خلايا الورم الجديد. في نماذج متنوعة، تثبط، تعوق، أو تضاد تفاعل البولي ببتيدات المخددة مناعياً و/أو مركباتها الترابطية تحسن الاستجابة المناعية للخلية المستجيبة للمناعة. التعبير "نشاط تحفيز مناعي" يُقصد به حث الإشارة أو تغييرات في التعبير عن البروتين في خلية (على سبيل المثال، خلية منشطة مستجيبة للمناعة) يترتب عليه زيادة في استجابة مناعية. يمكن أن يتضمن نشاط التحفيز المناعي النشاط المساعد على الالتهاب. تتضمن البولي ببتيدات المعروف أنها تحفز أو تزيد استجابة مناعية عن طريق ارتباطها CD28 , OX-40 , 4-1BB ، ومركباتها الترابطية المناظرة، بما في ذلك B7-1 , B7-2 , OX-40L ، و 4-1BBL . ٥ ١٠ تكون مثل هذه البولي ببتيدات موجودة في البيئة الدقيقة للورم وتنشط استجابات مناعية إلى خلايا الورم الجديد. في نماذج متنوعة، تعزز، تحفز، أو توازر البولي ببتيدات و/أو مركباتها الترابطية المساعدة على الالتهاب وتحسن الاستجابة المناعية للخلية المخددة للمناعة.

من خلال التعبير "بولي ببتيد CD3" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥ ، ٩٠ ، ٩٥ ، ٩٦ ، ٩٧ ، ٩٨ ، ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى NCBI المرجعي برقم: NP_932170 أو شظية منه تتسم بفعالية تنشيطية أو محفزة. يتم فيما يلي توفير CD3 [متوالية بهوية رقم: ١]. ١٥

```
1 mkwkalftaa ilgaqlpita aqsfglldpk lcyllidgilf iygviltalf lrvkfsrsad
61 apayqqqqnq lynecnlqrr eeydvldkrr grdpemggkp qrrknpqegl ynelqkdkma
121 eayseigmkg errrgkghdg lyqglstatk dtydalhmqa lppr
```

من خلال التعبير "جزء حمض نووي CD3 nucleic acid molecule" يُقصد به بولي نيوكليوتيد تشفر بولي ببتيد CD3. من خلال التعبير "بولي ببتيد CD28" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥ ، ٩٠ ، ٩٥ ، ٩٦ ، ٩٧ ، ٩٨ ، ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى NCBI المرجعي برقم: NP_006130 أو شظية منه تتسم بفعالية تحفيزية. يتم فيما يلي توفير CD28 تمثيلي [متوالية بهوية رقم: ٢]. ٢٠

```
1 mlrlllalnl fpsiqvtgnk ilvkqspmlv aydnavnlsac kysynlfere fraalhhkgld
61 savevcvvyg nysqqlqvys ktgfnodgkl gnesvtfylq nlyvnqtdiy fckievmypp
121 pyldneksng tiihvkgkhl cpsplfpgps kpfwvlvvg gylacysllv tvafiiifwvr
181 skrsrllhad ymnmtprrpg ptrkhyqpya pprdfaayrs
```

من خلال التعبير "جزء حمض نووي CD28" يُقصد به بولي نيوكليوتيد polynucleotide تشفر encoding بولي ببتيد CD28 polypeptide. من خلال التعبير "بولي ببتيد CD40L" يُقصد به بروتين protein يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦, ٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى NCBI المرجعي برقم: NP_000065, GenBank Reference No. ٥
GenBank: AAH74950.1 أو شظية منه تكون مركب ترابطي CD40، أو بروتين مشفر بـ PCR لحمض نووي مضخم من PBMCs معزولة من مانح سليم باستخدام البادئات التالية (١)

5'---CACGTGCATGATCGAAACATACAACCAAACTTCTCCCCGATCTGC

3' [متوالية بهوية رقم: ٣] و (٢) 5'---
3-CTCGAGGGATCCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGA-3 [متوالية بهوية رقم: ٤] (الشكل ١٢٢).

من خلال التعبير "جزء حمض نووي CD40L" يُقصد به بولي نيوكليوتيد تشفر بولي ببتيد CD40L.

من خلال التعبير "بولي ببتيد 4-1BB" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦, ٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى NCBI المرجعي برقم: P41273 أو NP_001552 أو شظية منه تقوم بوظيفة مركب ترابطي لعامل تنكز الورم tumor necrosis factor (TNF). يتم فيما يلي توفير 4-1BB نموذجي [متوالية بهوية رقم: ٥].

```
1 mgnscyniva tlllvlnfer trslqdpasn cpagtfcdan rnqicspcpp nsfssaggqr
61 tcdicrqckg vfrtrkeess tsnaecdctp gfhclgagcs mceqdckqgg eltktkgckdc
121 cfgtfndqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare
181 pghspqiasf flaltstall flflfltlrf svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqttqeedg
241 cscrfeeeee ggcal
```

من خلال التعبير "جزء حمض نووي 4-1BBL" يُقصد به بولي نيوكليوتيد تشفر ٤ بولي ببتيد BBL ١. من خلال التعبير "بولي ببتيد OX40L" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل

٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦, ٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى NCBI المرجعي برقم: BAB18304
أو NP_003317 أو شظية منه تكون مركب ترابطي لعامل تتركز الورم (TNF) [متوالية بهوية
رقم: ٦].

```
1 mervqplean vgnearprfa rnklllvaav igglglllaf tyiclbfaal qvshrypraq  
61 sikvqftreyk kekqfilitaq kedeimkvqn neviinedgf yllslkqyfa qavnislhyq  
121 kdeepifgfk kvssvneluv asltqkdkvy lnvtttdatsl delffvnggel illshqopgef  
181 evl
```

٥ من خلال التعبير "جزء حمض نووي OX40L" يُقصد به بولي نيوكليوتيد تشفر بولي ببتيـد
OX40L.

من خلال التعبير "1928Z" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦,
٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى المتوالية المقدمة فيما يلي, التي تتضمن متوالية رائد CDS
عند حمض أميني ١-١٨, و يمكنها أن تربط CD19 [متوالية بهوية رقم: ٧].

```
MALPVTALLLFLALLLHAEVVKLOQSGAELVRFSSVVKIECKASGYAFSSYWMNW  
VQRFEGQGLEWIGQITPQDGDITNYNGKFFRGGATLTADKSSSTAYMQLSGLTSED  
SAVYFCARETISSVVDIFYFDYWGQSTTVTVSSGGGSSGGGSSGGGSSDIELTQS  
PKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTINVAWFOQKFKQSEKFLIYSATERNNSGVDR  
FTSGSGSGLDFTLITITNVQSKDLADYFCQQYNRYEYTSGGGTRLEIKRAAAIEVM  
YFPFYL DNEKSNGLILHVKGKHLCPSPLEFPGFSPKPFWLVVVGGLACYSLLVT  
VAFIIFWVRSKRERLLHSDYMNMTERRRFGPTRKHYPYAFPRDFAAAYRSRVKFS  
NSAEPPAYQQGQNLNLYNELNLGRREYDVLDRRGRDDEMGGRKPRKNEPQEGLY  
NELQKDKMAEAYSEIIGMKGERRRRGRKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPERX
```

١٠ يتم فيما يلي تقديم متوالية حمض نووي تمثيلية تشفر بولي ببتيـد Z١٩٢٨, تتضمن متوالية رائد
CDS, [متوالية بهوية رقم: ٨].

ccatgggctctcccagtgactgcctactgcttcccctagcgetttctcctgcatg
cagaggtgaagctgcagcagctctggggctgagctggtgaggcctgggtcctcag
tgaagatttctctgcaaggcttctggctatgcatcagtagctactggatgaact
gggtgaagcagaggcctggacagggctcttgagtgattggacagatttatcctg
gagatgggtgataactaactacaatggaaagttcaagggtcaagccacactgactg
cagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcggcctaacatctgagg
actctgcggtctatctctgtgcaagaaagaccattagttcggtagtagatttct
actttgactactggggccaaggggaccaaggtcaccgtctcctcaggtggaggtg
gatcaggtggaggtggatctgggtggaggtggatctgacattgagctcaccagt
ctccaaaattcatgtccacatcagtaggagacaggggtcagcgtcacctgcaagg
ccagtcagaatgtgggtactaatgtagcctgggtatcaacagaaaccaggacaat
ctcctaaaccactgatttactcggcaacctaccggaacagtgaggctcctgatc
gcttcacaggcagtggtctgggacagatttctctcaccatcactaacgtgc
agtctaaagacttggcagactatctctgtcaacaatataaacaggtatccgtaca
cgtccggaggggggaccaagctggagatcaaacgggcgcccgcaattgaagtta
tgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatg
tgaaggggaaacaccttctccaagtcacctatcttccggaccttctaagcct
tttgggtgctggtgggtgggtgggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaa
cagtgccctttattatcttctgggtgaggagtaagaggagcagggctcctgcaca
gtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccggcaagcattacc
agcctatgccccaccacgcgacttccgagcctatcgctccagagtgaaagttca
gcaggagcgcagagcccccccgctaccagcagggccagaaccagctctataacg
agctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggcc
gggaccttgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgt
acaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatga
aaggcgagcgcggagggggcaaggggcaagatggcctttaccaggggtctcagta
cagccaccaaggacacctacgaagccttcacatgcaggccctgccccctcgcg

من خلال التعبير "4H1128Z" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥ ، ٩٠ ، ٩٥ ، ٩٦ ، ٩٧ ، ٩٨ ، ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى المتوالية المقدمة فيما يلي، التي تتضمن متوالية رائد CDS عند حمض أميني ١-١٨، ويمكنها أن تربط MUC [متوالية بهوية رقم: ٩].

MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQESGGGFVKPGGSLKVS CAASGFTFSSYAMSW
VRLSPEMRLEWVATISSAGGYIFYSDSVQGRFTISRDNKNTLHLQMGSLRSGD
TAMYCARQGF GNYGDYYAMDYWGQGT TVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQ
SPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNQLAWYQQKPGQSPELLIYWASTR
QSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQQSYNLLTFGPGTKLEIKRA
AAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWLVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRL LHS DYMNMPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYR
SRVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDP EMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

يتم فيما يلي تقديم متواليه حمض نووي تمثيلية تشفر HII28Z٤ بولي بيتيد, تتضمن متواليه رائد Kappa , [متواليه بهويه رقم: ١٠].

ccatggctctcccagtgactgcctactgcttcccctagcgcttctcctgcatg
cagaggtgaagctgcaggagt cagggggaggccttcgtgaagcctggaggggtccc
tcaaagtctcctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatgccatgtcct
gggttcgcctgagtc cggagatgaggctggagtggtcgcaaccattagcagtg
ctgggtggttacatcttctattctgacagtggtgcagggacgattcaccatttcca
gagacaatgccaaagaacacctgcacctgcaaattgggcagctctgaggtctgggg
acacggccatgtattactgtgcaaggcagggatttggttaactacgggtgattact
atgctatggactactggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcaggtggag
gtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctgacattgagctcacc
agtctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggctactatgagctgca
aatccagtcagagctctgctcaacagtagaaccgaaagaaccagttggcttgg
accagcaaaaaccaggacagctctcctgaactgctgatctactgggcatccacta
ggcaatctggagtccttgatcgcttcacaggcagtggtctgggacagatttca
ctctcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcagtttattactgccagc
aatcttataatctactcacgttcggctcctgggaccaagctggagatcaaaccggg
cggccgcaattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagca
atggaaccattatccatgtgaaagggaacacctttgtccaagtcccctatttc
ccggaccttctaagcccttttgggtgctggtggtggttgggtggagtctggctt
gctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtgaggagtaaga
ggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggc
ccaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatc
gctccagagtgaagttcagcaggagcgcagagccccccgctaccagcagggcc
agaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatggtt
tggaacaagagacgtggccgggacctgagatggggggaaagccgagaaggaaga
accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
acagtgagattgggatgaaaggcgagcgcggaggggcaaggggcacgatggcc
ttaccagggctctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgc
aggccctgccccctcgc

من خلال التعبير "B6H12.2 scFv" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦, ٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى المتوالية المقدمة فيما يلي ويمكنه أن يربط CD47 [متوالية بهوية رقم: ١١].

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAT
ITSGGTYYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSL
AGNAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPATLSVTPGD
RVSLSCRASQTI SDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQSI SGIPSRFSGSGS
GSDFTL SINSVEPEDVGVYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKEQKLI SEEDL

من خلال التعبير "C4 scFv" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦, ٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى المتوالية المقدمة فيما يلي ويمكنه أن يربط PD-1 بشري [متوالية بهوية رقم: ١٢].

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV
IWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATND
DYWGQGTSLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLS
CRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF
LTISSLEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIK

١٠ من خلال التعبير "J43 scFv" يُقصد به بروتين يتسم بتطابق يبلغ على الأقل ٨٥, ٩٠, ٩٥, ٩٦, ٩٧, ٩٨, ٩٩ أو ١٠٠% تطابق إلى المتوالية المقدمة فيما يلي, يتضمن متوالية رائد Kappa عند حمض أميني ١-٢١, و يمكنها أن تربط PD-1 بشري [متوالية بهوية رقم: ١٣].

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDMGLGLQWVFFVALLKGVHCEVRLLES GGGLVKP
 EGGLEKLSVCVSGFTFSDYFMSWVRQAPGKGLEWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKG
 RFTISRDDSRSMVYLQMNLRTE DTATYYCTR DGS GYPSLDFW GQGTQVTVSSA
 TTTAPSVYPLAPACDSTTKSGGGSGGGSGGGGSYELTQPPSASVNVGETVKI
 TCSGDQLPKYFADWFHQRS DQTI LQVIYDDNKRPSGIPERISGSSSGTTATLTI
 RDVRAEDEGDY YCFSGYVDS DSKLYVFGSGTQLTVLGGPKSSPKVTVFPPSPEE
 LRTNKATLVCLVNDFYPGSATVTWKANGATINDGVKTTKPSKQGQNYMTSSYLS
 LTADQWKSHNRVSCQVTHEGETVEKSLSPAECLEQKLI SEEDL*

يتم فيما يلي تقديم متوالية حمض نووي تمثيلية تشفر J43 scFv بولي ببتيد، تتضمن متوالية رائد

Kappa]، متوالية بهوية رقم: [١٤].

gcagattcaccatctccagagatgattcccgaagcatggtctacctgcaaatga
 acaacctgagaactgaggacacggccacttattactgtacaagagatggaagcg
 gatatccctctctggatttctgggggtcaagggaccaagtcactgtctcctcag
 ccacaacaacagccccatctgtctatcccttggccctgcctgtgacagcacia
 ccaaatcgggtggaggtggatcaggtggaggtggatctggtggaggtggatctT
 atgagctgactcagccaccttcagcatcagtcaatgtaggagagactgtcaaaa
 tcacctgctctggggaccaattgccgaaatattttgcagattggtttcatcaaa
 ggtcagaccagaccattttgcaagtgatataatgatgataataagcgcccctcgg
 ggatccctgaaagaatctctgggtccagctcagggacaacagccaccttgacca
 tcagagatgtccgggctgaggatgaaggtgactattactgtttctcaggatatg
 ttgatagtgatagcaaatgtatgtttttggcagcggaaaccagctcacggtcc
 taggtggaccaagtccttctcccaaagtcacagtgtttccaccttcacctgagg
 agctccggacaaacaaagccacactgggtgtgtctgggttaatgacttctaccgg
 gttctgcaacagtgacctggaaggcaaattggagcaactatcaatgatgggggtga
 agactacaaagccttccaaacagggccaaaactacatgaccagcagctacctaa
 gtttgacagcagaccagtggaatctcacaacaggggttccctgccaagttacc
 atgaaggggaaactgtggagaagagtttgtccctgcagaatgtctcgaacaaa
 aactcatctcagaagaggatctgTAAactcgag

٥ تتضمن جزيئات الحمض النووي Nucleic acid molecules المفيدة في طرق الاختراع أي
 جزيء حمض نووي يشفر بولي ببتيد من الاختراع أو شظية fragment منه. لا تحتاج جزيئات

الحمض النووي المذكورة أن تكون متطابقة ١٠٠% مع متواليه حمض نووي داخلية المنشأ endogenous nucleic acid sequence, ولكن تظهر نمطياً تطابق أساسي. تكون البولي ببتيدات التي تتسم بـ "تطابق أساسي" بمتواليه داخلية المنشأ قادرة نمطياً على التهجين hybridizing مع جديلة strand واحدة على الأقل لجزء حمض نووي مزدوج الجديلة. المقصود بتعبير "يتهجن" يتزاوج لتشكيل جزيء مزدوج الجديلة double-stranded nucleic acid molecule بين متواليات البولي نيوكليوتيد polynucleotide المتممة أو أجزاء منها (على سبيل المثال, جين موصوف في الطلب الحالي), أو أجزاء منه, تحت العديد من الظروف الخاص بالشدّة. (انظر, على سبيل المثال, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507).

- ١٠ على سبيل المثال, سيكون تركيز الملح الشديد في المعتاد أقل من حوالي ٧٥٠ ملي مولار NaCl و ٧٥ ملي مولار سترات ثلاثي الصوديوم trisodium citrate, يفضل أقل من حوالي ٥٠٠ ملي مولار NaCl و ٥٠ ملي مولار سترات ثلاثي الصوديوم, ويفضل أكثر أقل من حوالي ٢٥٠ ملي مولار NaCl و ٢٥ ملي مولار سترات ثلاثي الصوديوم. يمكن الحصول على تهجين منخفض الشدة في عدم وجود مذيب عضوي, على سبيل المثال, فورماميد, في حين يمكن الحصول على تهجين مرتفع الشدة في وجود على الأقل حوالي ٣٥% فورماميد, ويفضل أكثر على الأقل حوالي ٥٠% فورماميد. ستتضمن ظروف درجة الحرارة الشديدة في المعتاد درجات حرارة تبلغ على الأقل حوالي ٣٠ درجة مئوية, ويفضل أكثر ما يبلغ على الأقل حوالي ٣٧ درجة مئوية, والأفضل ما يبلغ على الأقل حوالي ٤٢ درجة مئوية. تعرف المتغيرات الإضافية المتباينة, مثل زمن التهجين, تركيز عامل التنظيف, على سبيل المثال, كبريتات دوديسيل الصوديوم sodium dodecyl sulfate (SDS), وإدراج أو استبعاد حمض DNA الحامل, جيداً لأولئك المتمرسين في المجال. ويتم تحقيق مستويات متنوعة من الشدة بدمج هذه الظروف المتنوعة حسب الحاجة. وفي نموذج مفضل: يحدث التهجين عند ٣٠ درجة مئوية في ٧٥٠ ملي مولار كلوريد الصوديوم sodium chloride (NaCl), ٧٥ ملي مولار سترات ثلاثي الصوديوم, و ١% SDS. في نموذج مفضل أكثر, يحدث التهجين عند ٣٧ درجة مئوية في ٥٠٠ ملي مولار NaCl, ٥٠ ملي مولار سترات ثلاثي الصوديوم, ١% SDS, ٣٥% فورماميد formamide, و ١٠٠ ميكرو جرام/مل مني

سلمون منزوع الخصائص الطبيعية للحمض النووي (ssDNA). في أفضل نموذج، يحدث التهجين عند ٤٢ درجة مئوية في ٢٥٠ ملي مولار NaCl، ٢٥ ملي مولار سترات ثلاثي الصوديوم، ١% SDS، ٥٠% فورماميد، و ٢٠٠ ميكرو جرام/مل ssDNA. سوف تكون التنوعات المفيدة من تلك الظروف واضحة بسهولة لذوي المهارة في المجال.

- ٥ وبالنسبة لمعظم التطبيقات، سوف تتنوع خطوات الغسل الخاصة بالتهجين في الشدة. يمكن تحديد ظروف الشدة الخاصة بالغسل من خلال تركيز الملح ودرجة الحرارة. وكما تم ذكره أعلاه، يمكن زيادة الشدة من خلال تقليل تركيز الملح أو من خلال زيادة درجة الحرارة. على سبيل المثال، فإن تركيز الملح الشديد الخاص بخطوات الغسل سوف يكون مفضلاً عندما يكون حوالي ٣٠ مل مولار من NaCl و ٣ مل مولار من سترات الصوديوم ويفضل أكثر أن يكون هناك أقل من حوالي ١٥ مل مولار من NaCl و ١,٥ مل مولار من سترات الصوديوم الثلاثية. سوف تشتمل ظروف درجة الحرارة الشديدة الخاصة بخطوات الغسل على درجات حرارة أقل من حوالي ٢٥ درجة مئوية ويفضل أكثر على الأقل حوالي ٤٢ درجة مئوية، ويفضل أكثر على الأقل حوالي ٦٨ درجة مئوية. في نماذج مفضلة تحدث خطوات الغسل عند ٢٥ درجة مئوية وفي ٣٠ مل مولار من NaCl و ٣ مل مولار من سترات ثلاثية الصوديوم و ٠,١% من SDS. في نماذج مفضلة، تحدث خطوات الغسل عند ٤٢ درجة مئوية في ١٥ مل مولار من NaCl و ١,٥ مل مولار من سترات ثلاثية الصوديوم و ٠,١% من SDS. في نماذج مفضلة بشكل أكبر، تتم خطوات الغسل عند ٦٨ درجة مئوية في ١٥ مل مولار من NaCl و ١,٥ مل مولار من سترات الصوديوم الثلاثية و ٠,١% من SDS. سوف تكون هناك تنوعيات إضافية واضحة من الظروف لذوي المهارة في المجال. وتكون تقنيات التهجين معروفة بشكل جيد لذوي المهارة في المجال وتم وصفها، على سبيل المثال، من خلال Benton and Davis (Science 196: 180, 1977); Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Sambrook et al., Molecular Cloning: A و Academic Press, New York)

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

يشير "متطابق إلى حد كبير" إلى بولي ببتييد أو جزئيء حمض نووي يعرض ٥٠% على الأقل من التطابق في المتوالية المرجعية من متوالية الحمض الأميني (على سبيل المثال، أي واحدة من متواليات الحمض الأميني الموصوفة في الطلب الحالي) أو متوالية الحمض النووي (على سبيل المثال، أي واحدة من متواليات الحمض النووي الموصوفة في الطلب الحالي). ويفضل أن يكون بالمتوالية المذكورة على الأقل ٦٠% ويفضل ٨٠% أو ٨٥% ويفضل أكثر ٩٠% أو ٩٥% أو ٩٩% من التطابق عند مستوي الحمض الأميني أو الحمض النووي المستخدم للمقارنة.

يتم قياس التطابق النمطي في المتوالية من خلال استخدام برنامج تحليل المتوالية (على سبيل المثال، Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group أو University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705 أو GAP, أو BESTFIT أو BLAST أو Avenue, Madison, Wis. 53705). تكون تلك البرامج عبارة عن متواليات مقارنة ومشابهة من خلال تحديد الدرجات الخاص بالتجانس للاستبدالات المختلفة والإلغاءات و/أو التعديلات الأخرى. تشمل الاستبدالات المحافظة بشكل نمطي على استبدالات في المجموعات التالية:

الجليسين glycine والألانين alanine والفالين valine وأيزو ليوسين isoleucine وحمض أسبارتيك aspartic وحمض جلوتاميك glutamic والأسبارجين asparagine والجلوتامين glutamine والسيرين serine والثريونين threonine واللايسين lysine والأرجينين arginine وفينيل ألانين phenylalanine وتيروسين tyrosine. في طريقة توضيحية لتحديد الدرجة الخاصة بالتطابق، يمكن استخدام برنامج BLAST مع احتمالية خاصة بالدرجة التي تكون بين e-3 و e-100 التي توضح المتوالية القريبة بشكل قريب.

من خلال التعبير "تظير" يُقصد به بولي ببتييد مرتبط من الناحية الهيكلية أو جزئيء حمض نووي له وظيفة بولي ببتييد أو جزئيء حمض نووي مرجعي .

التعبير "مركب ترابطي" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى جزيء يرتبط بمستقبل. على وجه الخصوص، المركب الترابطي يربط مستقبل على خلية أخرى، مما يسمح بالتعرف من خلية إلى أخرى و/أو تفاعلها.

التعبير "التعبير الأساسي" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى التعبير تحت جميع الظروف الفسيولوجية. ٥

من خلال التعبير "مرض" يُقصد به أية حالة أو اضطراب تتلف أو تتداخل مع وظيفة طبيعية لخلية، أو نسيج، أو عضو. تتضمن الأمثلة على الأمراض الأورام أو عدوى ممرضة للخلية.

من خلال التعبير "كمية فعالة" يُقصد به كمية كافية لتحقيق تأثير علاجي. في أحد النماذج، التعبير "كمية فعالة" يمثل كمية كافية لإيقاف، تخفيف، أو تثبيط التكاثر، النمو، أو انتشار الورم المتواصل (على سبيل المثال، اختراق، أو انتقال) الأورام. ١٠

من خلال التعبير "داخلي المنشأ" يُقصد به جزيء حمض نووي أو بولي ببتيد يتم التعبير عنه بصورة طبيعية في خلية أو نسيج.

من خلال التعبير "تطبيق احتمال" يُقصد به منع نشاط الخلايا ذاتية التفاعل أو الخلايا المستجيبة للمناعة التي تستهدف الأعضاء أو الأنسجة المزروعة .

من خلال التعبير "خارجي المنشأ" يُقصد به جزيء حمض نووي أو بولي ببتيد لا يكون موجود في الخلية على نحو داخلي المنشأ، أو لا يكون موجود عند مستوى كافي لتحقيق التأثيرات الوظيفية التي تم الحصول عليها عند التعبير المفرط. التعبير "خارجي المنشأ" يمكن بالتالي أن ينطوي على أي جزيء حمض نووي أو بولي ببتيد لنتاج عودة الاتحاد الجيني تم التعبير عنه في خلية، مثل جزيئات الحمض النووي والبولي ببتيدات الغريبة، غير المتجانسة، و التي تم الإفراط في التعبير عنها. ٢٠

المقصود بالتعبير "جزيء حمض نووي أو بولي ببتيد غير متجانس" جزيء حمض نووي (على سبيل المثال، cDNA، DNA أو جزيء RNA) أو بولي ببتيد لا يكون موجوداً بصورة طبيعية في خلية أو عينة تم الحصول عليها من خلية. يمكن أن يكون هذا الحمض النووي من كائن آخر،

أو يمكن أن يكون، على سبيل المثال، جزيء mRNA لا يتم التعبير عنه بصورة طبيعية في خلية أو عينة.

من خلال التعبير "خلية مستجيبة للمناعة" يُقصد به خلية تعمل في استجابة مناعية أو خلية سلف، أو ذرية منها.

٥ من خلال التعبير "زيادة" يُقصد به أن يتم التغيير على نحو إيجابي بنسبة تبلغ على الأقل ٥%. يمكن أن يكون التغيير بنسبة ٥%، ١٠%، ٢٥%، ٣٠%، ٥٠%، ٧٥%، أو حتى بنسبة ١٠٠%.

من خلال التعبير "خلية معزولة" يُقصد به خلية يتم فصلها عن المكونات الجزيئية و/أو الخلوية التي ترافق الخلية بصورة طبيعية.

١٠ التعبيرات "معزول" isolated "منقى" purified "أو" نقي حيويًا biologically pure " تشير إلى مادة تكون خالية إلى درجات متفاوتة من المكونات التي تصاحبها عادةً طبقاً لما هو موجود في الحالة الأصلية. "معزول" يشير إلى درجة الفصل عن المصدر الأصلي أو المكونات المحيطة. "ينقي" تشير إلى درجة الفصل التي تكون أعلى من العزل. يكون البروتين "المنقى" أو "النقي حيويًا" هو الخالي بدرجة كافية من المواد الأخرى بحيث لا تؤثر إلى شوائب مادياً على الخواص الحيوية للبروتين أو تسبب عواقب أخرى غير ملائمة. أي، تتم تنقية الحمض النووي أو الببتيد من هذا الاختراع إذا كان خالياً إلى حد بعيد من المادة الخلوية، المادة الفيروسية، أو وسط الخلية عند إنتاجه بواسطة تقنيات حمض DNA لنتاج عودة الاتحاد الجيني، أو المواد المنتجة الكيمائية أو العوامل الكيمائية الأخرى عند تخليقها.

٢٠ التعبيرات "معزول" "منقى" "أو" نقي حيويًا " تشير إلى مادة تكون خالية إلى درجات متفاوتة من المكونات التي تصاحبها عادةً طبقاً لما هو موجود في الحالة الأصلية. "معزول" يشير إلى درجة الفصل عن المصدر الأصلي أو المكونات المحيطة. "ينقي" تشير إلى درجة الفصل التي تكون أعلى من العزل. يكون البروتين "المنقى" أو "النقي حيويًا" هو الخالي بدرجة كافية من المواد الأخرى بحيث لا تؤثر إلى شوائب مادياً على الخواص الحيوية للبروتين أو تسبب عواقب أخرى غير ملائمة. أي، تتم تنقية الحمض النووي أو الببتيد من هذا الاختراع إذا كان خالياً

إلى حد بعيد من المادة الخلوية، المادة الفيروسية، أو وسط الخلية عند إنتاجه بواسطة تقنيات حمض DNA لنتاج عودة الاتحاد الجيني، أو المواد المنتجة الكيميائية أو العوامل الكيميائية الأخرى عند تخليقها. يتم نمطياً تحديد النقاء والتجانس باستخدام تقنيات الكيمياء التحليلية، على سبيل المثال، الاستشراد الكهربائي electrophoresis لجل بولي أكريل أميد polyacrylamide gel أو كروماتوجراف السائل عالي الأداء high performance liquid chromatography .
التعبير "منقى" يمكن أن يشير إلى أن الحمض النووي أو البروتين يشكل نطاق واحد بصورة أساسية في جل متعلق بالاستشراد الكهربائي. بالنسبة لبروتين يمكن خضوعه إلى تعديلات، على سبيل المثال، فسفرة phosphorylation أو معالجة بالجليكوسيل glycosylation، يمكن أن تؤدي التعديلات المختلفة إلى بروتينات معزولة مختلفة، يمكن تنقيتها على حدة.

التعبير "نطاق رابط لمولد ضد الورم" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى نطاق يمكنه الارتباط تحديداً بمحدد متعلق بمولد ضد معين أو مجموعة من محددات مولد الضد الموجودة على ورم.

التعبير "الحصول على" كما في "الحصول على عامل" يقصد به أن يتضمن شراء، تخليق أو الحصول بخلاف ذلك على العامل (أو المادة الأساسية أو المادة المبينة).

التعبير "رابط"، وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، يعني مجموعة وظيفية (على سبيل المثال، عامل كيميائي chemical أو بولي ببتيد) تربط تساهمياً اثنين أو أكثر من البولي ببتيدات أو الأحماض النووية بحيث يتم توصيلها ببعضها البعض. وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، التعبير "رابط ببتيد" يشير إلى واحد أو أكثر من حمض أميني مستخدم لاقتزان بروتينين معاً (على سبيل المثال، لاقتزان نطاقات VH و VL). تكون متوالية الرابط التمثيلية المستخدمة في الاختراع .GGGGSGGGGSGGGGS ٢٠

من خلال التعبير "يعدل" يُقصد به تغيير على نحو إيجابي أو سلبي. تتضمن التعديلات التمثيلية تغيير بنسبة ١%، ٢%، ٥%، ١٠%، ٢٥%، ٥٠%، ٧٥%، أو ١٠٠%.

من خلال التعبير "الأورام" يُقصد به مرض يتميز بتكاثر العلة من خلية أو النسيج وانتقاله التالي إلى أو اختراق الأنسجة أو الأعضاء الأخرى. نمطياً يكون نمو الأورام غير متحكم فيه وتدرجي،

ويحدث تحت ظروف يمكن ألا تحدث، أو يمكن أن تسبب توقف، تكاثر الخلايا الطبيعية. يمكن أن تؤثر الأورام على مجموعة متنوعة من أنواع الخلايا، الأنسجة، أو الأعضاء، بما في ذلك ولكن ليس على سبيل الحصر عضو منتقى من المجموعة التي تتكون من :

المثانة bladder ، العظام bone ، الدماغ brain ، الثدي breast ، الغضروف
٥ cartilage ، الدبقية glia ، المريء esophagus ، قناة فالوب fallopian tube ، المرارة
gallbladder ، القلب heart ، الأمعاء intestines ، الكلى kidney ، الكبد liver ، الرئة
lung ، العقدة الليمفاوية lymph node ، النسيج العصبي nervous tissue ، المبايض
ovaries ، البنكرياس pancreas ، البروستاتا prostate ، العضلات والهيكل العظمي
skeletal muscle ، الجلد skin ، الحبل الشوكي spinal cord ، الطحال spleen ،
١٠ المعدة stomach ، الخصيتين testes ، الغدة الصعترية thymus ، الغدة الدرقية thyroid ،
القصبية الهوائية trachea ، الجهاز البولي التناسلي urogenital tract ، الحالب ureter ،
مجرى البول urethra ، الرحم uterus ، و المهبل vagina ، أو نوع نسيج أو خلية منها.
تتضمن الأورام أنواع السرطان cancers, مثل الأورام اللحمية sarcomas, الأورام السرطانية
carcinomas, أو أورام الخلايا البلازمية plasmacytomas (ورم خبيث من خلايا البلازما
١٥ (malignant tumor of the plasma cells).

من خلال التعبير "كائن ممرض" يُقصد به فيروس، بكتيريا، فطر، طفيلي أو أوليات يمكنه أن يسبب مرض.

تتضمن الفيروسات التمثيلية، ولكن ليس على سبيل الحصر، Retroviridae (على سبيل المثال،
فيروسات نقص المناعة البشرية، مثل HIV-1 (يشار إليه كذلك باسم HDTV-III، LAV أو
٢٠ HTLV-III/LAV، أو HIV-III؛ ومواد معزولة أخرى، مثل HIV-LP؛ Picornaviridae (على
سبيل المثال، فيروسات شلل الأطفال polio viruses والتهاب الكبد الوبائي فيروس hepatitis A
virus . المعوي enteroviruses ، والفيروسات هومانو كوكسكي human Coxsackie
viruses ، الفيروسات الأنفية rhinoviruses ، الفيروسة الإيكوية echoviruses)؛
Calciviridae (على سبيل المثال، السلالات التي تسبب التهاب المعدة والأمعاء)؛
٢٥ Togaviridae (على سبيل المثال، فيروسات التهاب الدماغ الخيلي equine encephalitis

viruses ، فيروسات الحصبة الألمانية (rubella viruses)؛ Flaviridae (على سبيل المثال، فيروسات حمى الضنك والفيروسات التهاب الدماغ، فيروسات الحمى الصفراء)؛ Coronaviridae (على سبيل المثال، الفيروسات الإكليلية)؛ Rhabdoviridae (على سبيل المثال، فيروسات التهاب الفم الحويصلي، فيروسات داء الكلب)؛ Filoviridae (على سبيل المثال، فيروسات إيبولا)؛ Paramyxoviridae (على سبيل المثال، الفيروسات نظير الانفلونزا، فيروس النكاف، فيروس الحصبة، وفيروس الجهاز التنفسي المخلوي)؛ Orthomyxoviridae (على سبيل المثال، فيروسات الأنفلونزا)؛ Bungaviridae (على سبيل المثال، فيروسات Hantaan، وفيروسات bunga، وphleboviruses وفيروسات Naira)؛ Arena viridae (فيروسات الحمى النزفية)؛ Reoviridae (على سبيل المثال، فيروسات reoviruses، orbiviruses و rotaviruses)؛ ١٠ Hepadnaviridae؛ Birnaviridae (فيروس التهاب الكبد ب)؛ Parvoviridae (parvoviruses)، Papovaviridae (فيروسات الورم الحليمي، الفيروسات التورامية)؛ Adenoviridae (معظم الفيروسات الغدية)؛ Herpesviridae (فيروس الحلا البسيط (HSV) ١ و٢، فيروس الحماق النطاقي، الفيروس المضخم للخلايا (CMV)، فيروس الحلا Poxviridae (فيروسات الجدري، والفيروسات اللقاحية فيروسات الجدري)؛ و Iridoviridae (على سبيل المثال، ١٥ فيروس حمى الخنازير الأفريقية)؛ والفيروسات غير المصنفة (على سبيل المثال، عامل التهاب الكبد دلتا (يعتقد أنه ناقل معيب لفيروس التهاب الكبد ب)، وعوامل غير التهاب الكبد A، وغير التهاب الكبد B (الفئة ١ = منقول داخلياً؛ الفئة ٢ = منقول عن طريق الجهاز الهضمي (أي، التهاب الكبد C)؛ وفيروسات Norwalk وما يتعلق بها، وفيروسات نجمية).

تتضمن البكتيريا التمثيلية، ولكن ليس على سبيل الحصر، Staphylococci، Pasteurella، ٢٠ Escherichia coli، Streptococcus، Pseudomonas، ونوع Salmonella. تتضمن الأمثلة المحددة على البكتيريا المعدية ولكن ليس على سبيل الحصر، Helicobacter pyloris، Mycobacteria sps، Legionella pneumophila، Borelia burgdorferi (على سبيل المثال M. tuberculosis، M. avium، M. intracellulare، M. kansaii، M. Neisseria، Neisseria gonorrhoeae، Staphylococcus aureus، (gordoniae ٢٥ Streptococcus pyogenes، Listeria monocytogenes، meningitidis (المجموعة A

، (المجموعة Streptococcus B) ، Streptococcus agalactiae، (Streptococcus Streptococcus ،Streptococcus faecalis، (مجموعة المخضرات)، Streptococcus، Streptococcus pneumoniae (نوع لا هوائي)، Streptococcus، bovis، Campylobacter sp. مسبب للمرض، Enterococcus sp.، Haemophilus ، corynebacterium diphtheriae، Bacillus anthracis،influenzae ٥ ، Clostridium perfringers، Erysipelothrix rhusiopathiae،corynebacterium sp. ، Klebsiella pneumoniae، Enterobacter aerogenes،Clostridium tetani ، Fusobacterium nucleatum، Bacteroides sp.،Pasturella multocida ، Treponema pertenuه، Treponema pallidum،Streptobacillus moniliformis ، Actinomyces israeli و ، Rickettsia،Leptospira ١٠ .

من خلال التعبير "مستقبل" يُقصد به بولي ببتيد، أو جزء منه، موجود على غشاء خلية يربط على نحو انتقائي واحد أو أكثر من المركبات الترابطية.

من خلال التعبير "يخفض" يُقصد به أن يغير على نحو سالب بنسبة تبلغ على الأقل ٥%. يمكن أن يكون التغيير بنسبة ٥%، ١٠%، ٢٥%، ٣٠%، ٥٠%، ٧٥%، أو حتى بنسبة ١٠٠%.

١٥ من خلال التعبير "يتعرف على" يُقصد به يرتبط انتقائياً بهدف. خلية T تتعرف على فيروس يعبر نمطياً عن مستقبل يربط مولد ضد معبر عنه بواسطة الفيروس.

من خلال التعبير "مرجعي" أو "مقارن" يُقصد به مقياس مقارنة. على سبيل المثال، مستوى ارتباط scFV- مولد الضد بواسطة خلية تعبر عن CAR ويمكن مقارنة scFV بمستوى ارتباط scFV- مولد الضد في خلية مقارنة تعبر عن CAR بمفرده.

٢٠ من خلال التعبير "تم إفرازه" يُقصد به بولي ببتيد يتم إطلاقه من خلية عن طريق مسار الإفراز من خلال الشبكة الإندوبلازمية، جهاز Golgi، وكحويصلة تندمج على نحو عابر عند غشاء بلازما الخلية، تطلق البروتينات خارج الخلية.

من خلال التعبير "متوالية الإشارة" أو "متوالية رائد" يُقصد به متوالية ببتيد (٥، ١٠، ١٥، ٢٠، ٢٥، ٣٠ حمض أميني في الطول) موجود عند الطرف N لبروتينات مخلقة مجدداً توجه مدخلها إلى

مسار الإفراز. تتضمن متواليات الرائد التمثيلية متوالية الرائد kappa:
METDLLLLWLLLLWPGSTGD [متوالية بهوية رقم: ١٥] (بشري)،
METDLLLLWLLLLWPGSTGD [متوالية بهوية رقم: ١٦] (فأر)؛ ومتوالية رائد CDS:
MALPVTALLLPLALLLHAARP [متوالية بهوية رقم: ١٧].

٥ من خلال التعبير "قابل للذوبان" يُقصد به بولي ببتيد يكون قابل للانتشار بحرية في وسط مائي (على سبيل المثال، غير مرتبط بغشاء).

من خلال التعبير "يرتبط تحديداً" يُقصد به بولي ببتيد أو شظية منه تتعرف على وترتبط جزئياً حيوي محل أهمية (على سبيل المثال، بولي ببتيد)، ولكنه لا يتعرف إلى حد بعيد على ويرتبط جزيئات أخرى في عينة، على سبيل المثال، عينة حيوية، يتضمن على نحو طبيعي بولي ببتيد من الاختراع. ١٠

التعبير "مولد ضد الورم" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى مولد الضد (على سبيل المثال، بولي ببتيد) يتم التعبير عنه على نحو فريد أو على نحو متميز على خلية ورم مقارنة بخلية طبيعية أو غير متعلقة بورم جديد من نوع IS. بالإشارة إلى الاختراع، يتضمن مولد ضد الورم أي بولي ببتيد معبر عنه بواسطة ورم يمكنه تنشيط أو حث استجابة مناعية عن طريق مستقبل يتعرف على مولد الضد (على سبيل المثال، MUC1, CD19) أو يمكنه إخماد استجابة مناعية عن طريق ارتباط مستقبل-مركب ترابطي (على سبيل المثال، PD-L1/L2, CD47, B7.1/2).

من خلال التعبير "مولد الضد الفيروسي" يُقصد به بولي ببتيد معبر عنه بواسطة فيروس يمكنه حث استجابة مناعية.

٢٠ التعبيرات "يشتمل"، "تشتمل على"، ويقصد بها أن تحمل نفس المعنى الواسع المعزود إليها في قانون البراءات الأمريكي ويمكن أن تعني "يتضمن"، "متضمن" وما شابه ذلك.

وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، "معالجة" يشير إلى تدخل إكلينيكي في محاولة لتغيير مسار المرض للفرد أو الخلية الجاري علاجها، ويمكن إجراؤها إما للوقاية أو أثناء مسار المرض الإكلينيكي. تتضمن التأثيرات العلاجية للمعالجة، بدون حصر، منع حدوث أو انتكاس المرض، أو

تخفيف الأعراض، أو تقليل أي عواقب مرضية مباشرة أو غير مباشرة للمرض، ومنع انتشار الورم، وتخفيض معدل تقدم المرض، وتخفيف أو تسكين حالة المرض، والهجوم أو الإنذار المحسن. يمنع تقدم المرض أو الاضطراب، يمكن أن تؤدي المعالجة إلى منع التدهور نتيجة لاضطراب في خاضع متأثر أو تم تشخيص حالته أو خاضع يشك في أنه يعاني من اضطراب، ولكن كذلك يمكن أن تمنع المعالجة بدء الاضطراب أو عرض الاضطراب في خاضع على خطر الإصابة باضطراب أو يشك في أنه يعاني من اضطراب.

التعبير "خاضع" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى فقاري، يفضل ثديي، ويفضل أكثر إنسان.

التعبير "معرض مناعياً" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى خاضع لديه نقص في المناعة. ويكون الخاضع معرض للإصابة بحالات عدوى طفيلية، حالات عدوى تسببها كائنات حية لا تسبب عادة مرض لدى شخص يتسم بنظام مناعي سليم، غير أنه يمكن أن يؤثر على الأشخاص ذوي جهاز مناعة يعمل بصورة ضعيفة أو مخدم المناعة.

يتم وصف الجوانب الأخرى من الاختراع في الكشف التالي وتكون في مجال نطاق الاختراع.

شرح مختصر للرسومات

الوصف التفصيلي التالي، والمقدم على سبيل المثال، وليس المقصود منه أن يقصر الاختراع على نماذج محددة موصوفة، يمكن فهمه بالاشتراك مع الأشكال المرفقة.

الشكل ١ يصور خلايا T معدلة للتعبير عن مستقبل مولد الضد الخيمري chimeric antigen receptor (CAR) بمفرده أو في توليفة مع scFv قابلة للإفراز (على سبيل المثال PD-1)، PD-L1، CTLA-4، أو CD47). تكون خلايا T المعدلة للتعبير عن مستقبل مولد الضد الخيمري (CAR) بمفردها معرضة للإخماد في نطاق الوسط الدقيق العائل للورم. بدون التقيد بأية نظرية معينة، حسن التعديل الإضافي لهذه الخلايا للتعبير عن scFv قابلة للإفراز لإعاقة إرسال إشارة مخدم مناعياً الوظيفة المضادة للورم نتيجة لقدرتها على تعديل الوسط الدقيق للورم ومقاومة العوامل المخدمة resist suppressive factors.

الأشكال ٢ أ و ٢ ب تصور بنية بنيات scFv مضادة لـ CD47 قابلة للإفراز. الشكل ٢ أ يصور بنية scFv مضادة لـ CD47 قابلة للإفراز مصممة لتتضمن متواليات كبا (K) رائدة لتسمح بنقل هذا البروتين. تم ربط السلاسل الثقيلة (VH) والخفيفة (VL) للمتغير مع رابط جليسين سيرين (G4S) وتم إدراج ببتيد myc-tag لتسمح بكشف scFv. الشكل ٢ ب يصور أنه تم ربط scFv القابلة للإفراز ببنية CAR1928 z باستخدام عنصر P2A طبقاً لما هو موضح. ٥

الشكل ٣ يصور متواليات scFv B6HI2.2 المرتبطة على نحو تشغيلي مع متواليات راند Kappa [متواليات بهوية رقم: ١٨]. تم تضخيم متواليات السلسلة الثقيلة للمتغير (VH) والسلسلة الخفيفة للمتغير (VL) للورم الهجين B6HI2.2 بـ PCR مع متواليات راند Kappa، بطاقة c-myc وتم ربطها باستخدام رابط جليسين سيرين. يتم توضيح متواليات الحمض النووي ونقل الحمض الأميني.

الشكل ٤ يصور متواليات scFv B6HI2.2 المرتبطة على نحو تشغيلي مع متواليات راند CDS [متواليات بهوية رقم: ١٩]. تم تضخيم متواليات السلسلة الثقيلة للمتغير (VH) والسلسلة الخفيفة للمتغير (VL) للورم الهجين B6HI2.2 بـ PCR بمتواليات راند CDS، وبطاقة c-myc وتم ربطها باستخدام رابط جليسين سيرين serine glycine. يتم توضيح متواليات الحمض النووي ونقل الحمض الأميني. ١٠

الشكل ٥ يصور متواليات الحمض النووي لبنية z-2A-B6HI2.2 (راند كبا) [متواليات بهوية رقم: ٢٠]. تم استنساخ متواليات scFv B6HI2.2 في ناقل تعبير SFG للتعبير مع CAR1928 z مستهدف بـ CD19. تم استخدام عنصر P2A لربط العنصرين، طبقاً لما هو موضح. ١٥

الشكل ٦ يصور متواليات الحمض النووي لبنية HII28z-2A-B6HI2.2 (راند كبا) [متواليات بهوية رقم: ٢١]. تم استنساخ متواليات scFv B6HI2.2 في ناقل التعبير عن SFG للتعبير مع MUC-CD-targeted 4HII28z مستقبل مولد الضد الخيمري (CAR). تم استخدام عنصر P2A لربط العنصرين، طبقاً لما هو موضح. ٢٠

الأشكال ٧ أ و ٧ ب يصوران تكوين خلايا تعبئة 1928-92GIV-293 A-B6HI2.2. تم تكوين خلايا التعبئة الفيروسية باستخدام z-2A-B6HI2.2 أو ناقل z1928. الشكل ٧ أ يصور

انتقاء نسيلتين، ٥ و٦، بناء على التعبير عن CAR¹⁹²⁸ z، الذي كان قابلاً للمقارنة بالخلايا المقارنة z 293Glv9¹⁹²⁸. تم تحديد التعبير عن CAR بقياس تدفق الخلايا وبالتبقيع بالجسم المضاد d1112. الشكل ٧ ب يصور تجربة حيث تمت حضانة المحلول الطافي من خلايا تعبئة z¹⁹²⁸ أو z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸ مع CD47+ خلايا الورم، Nalm-6 و Raji، وتم غسل خلايا الورم وتم تبقيعها بمضاد CD47. خفضت خلايا الورم التي تمت حضانتها في المحلول الطافي z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸ (الخطوط الزرقاء) من الارتباط المضاد لـ CD47 مقارنة بالحضانة مع المحلول الطافي z¹⁹²⁸ (الخط الأسود). تم استخدام المحلول الطافي من خلايا الورم الهجين B6HI2.2 كمقارن (الخط الأحمر).

الأشكال ٨ و١٠ ب تصور تكوين خلايا T للدم الطرفي البشري z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸. تم تحويل الإشارة لخلايا T للدم الطرفي البشري باستخدام المحلول الطافي من خلايا تعبئة z¹⁹²⁸ أو z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸. الشكل ٨ أ يصور تحليل بقياس تدفق الخلايا للتعبير عن CAR باستخدام الجسم المضاد d1112 وعن المضاد لـ CD47 scFv المرتبط الذي تم تبقيعه باستخدام جسم مضاد لبطاقة anti-c-myc tag antibody مرمز على نحو متألق فلوري fluorescently tagged. الشكل ٦ ب يصور قدرة المضاد لـ CD47 scFv لإعاقة CD47، المحدد بتبقيع خلايا T بالجسم المضاد لـ CD47. أدت خلايا T z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸ إلى تخفيض الارتباط بمضاد CD47 (الخط الأزرق) مقارنة بخلايا T 1928z (الخط الأحمر). تم استخدام خلايا T 1928z التي تمت حضانتها في المحلول الطافي للورم الهجين B6HI2.2 كمقارن (الخط الأسود).

الأشكال ٩-١٠ ج تصور خلايا T 1928z-2A للدم الطرفي البشري. تم إجراء قياس تدفق الخلايا لتوصيف النمط الظاهري من z¹⁹²⁸ و z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸ خلايا T. الشكل ٩ أ يصور أن خلايا T z¹⁹²⁸ و z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸ اتسمت بنسبة متكافئة من خلايا CD4:CD8 T، وتعبير مكافئ عن مرقمات التنشيط CD69 و CD25. اتسمت خلايا T 1928z بتعبير متزايد عن CD62L مقارنة بخلايا T z-2A-B6HI2.2¹⁹²⁸. الشكل ٩ ب يصور قدرة خلايا 1928z و-1928z T 2A-B6HI2.2 لإفراز السيتوكينات، وفقاً لتقييم ذلك بواسطة قياس تدفق الخلايا عقب الحضانة مع خلايا aAPCs (CD19+/B7.1+) 3T3 ومثبطات نقل golgi، وتوصيل Golgi و Golgi ٢٥

Stop. أنتجت خلايا 1928z و 1928z-2A-B6H12.2 T مستويات مكافئة من IL-2 و FNng بعد التحفيز بخلايا 3T3(CD19+/B7.1+) الشكل ٩ ج يصور أن خلايا 1928z و 1928z-2A-B6H12.2 T تتسم بقدرة انحلال الخلايا مكافئة، طبقاً لتحديده بواسطة اختبار قياسي لإطلاق 51Chromium باستخدام خلايا الورم Raji.

٥ الأشكال ١٠ و ١٠ اب تصور الفعالية المضادة للورم من خلايا 1928z-2A-B6H12.2 T. تم بحث الفعالية المضادة للورم في الكائن الحي من خلايا 1928z-2A-B6H12.2 T باستخدام نموذج فأر SCID-Beige ما قبل الإكلينيكي. تم تطعيم الفئران في الوريد بـ ١٠٦×١ Nalm-6-FireFly + خلايا الورم وتمت معالجتها بعد ذلك باستخدام ٧,٥ × CAR+ I06 1928z, 1928z-2A-B6H12.2 أو سرطان المبيض المقارن المستهدف بـ ٤-H1128z ١٠ 2A-B6H12.2 خلايا T, التي تم التطعيم بها كذلك في الوريد. الشكل ١٠ أ يصور أن الفئران المعالجة بخلايا 1928z-2A-B6H12.2 T اتسمت ببقاء محسن مقارنة بالفئران المعالجة، أو غير المعالجة بـ 1928z أو ٤-H1128z-2A-B6H12.2. الشكل ١٠ ب يصور أن الفئران المعالجة بـ 1928z-2A-B6H12.2 تتسم بحمل ورم منخفض مقارنة بالفئران غير المعالجة، الفئران المعالجة بخلية 1928z أو 4H1128z-2A-B6H12.2 T باستخدام تصوير بالتألق الحيوي لمراقبة تطور الورم. ١٥

الشكل ١١ يصور متوالية C4 scFv^٥ المرتبطة على نحو تشغيلي مع متوالية رائد Kappa] متوالية بهوية رقم: ٢٢]. تم تصميم متواليات السلسلة الثقيلة للمتغير (VH) والسلسلة الخفيفة للمتغير (VL) لتسيلة الجسم المضاد C4^٥ مع متوالية رائد Kappa , بطاقة c-myc وتم ربطها باستخدام رابط جليسين سيرين. يتم توضيح متوالية الحمض النووي ونقل الحمض الأميني.

٢٠ الشكل ١٢ يصور متوالية الحمض النووي لبنية 1928z-2A-5C4 (رائد كبا) [متوالية بهوية رقم: ٢٣]. تم استنساخ متوالية C4 scFv^٥ في ناقل التعبير عن SFG للتعبير مع 1928z CAR مستهدف بـ CD19. تم استخدام عنصر P2A لربط العنصرين, طبقاً لما هو موضح.

الشكل ١٣ يصور متوالية الحمض النووي لبنية ٤-H1128z-2A-5C4 (رائد كبا) [متوالية بهوية رقم: ٢٤]. تم استنساخ C4 scFv^٥ في ناقل تعبير عن SFG ليتم التعبير عنه مع ٤ H1128z

CAR المستهدف بـ MUC-CD. تم استخدام عنصر P2A لربط العنصرين, طبقاً لما هو موضح.

الشكل ١٤ يصور تكوين خلايا z-2A-5C4١٩٢٨ (رائد كبا) Glv9٢٩٣. تم تكوين خلايا التعبئة الفيروسية باستخدام z-2A-5C4١٩٢٨. تم انتقاء نسيلتين, B6 A6, بناء على التعبير عن CAR١٩٢٨, الذي كان قابلاً للمقارنة بالخلايا المقارنة z 293Glv9١٩٢٨. تم تحديد التعبير عن CAR بقياس تدفق الخلايا وبالتتبع بالجسم المضاد d11١٢.

الشكل ١٥ يصور تكوين خلايا z-2A-5C4١٩٢٨T (رائد كبا) للدم الطرفي البشري. تم تحويل الإشارة لخلايا T للدم الطرفي البشري باستخدام المحلول الطافي من خلايا تعبئة z١٩٢٨ أو z-2A-5C4١٩٢٨. تم استخدام قياس تدفق الخلايا لتحليل التعبير عن CAR باستخدام الجسم المضاد d11١٢ وعن مضاد scFv CD47 المرتبط باستخدام التتبع بجسم مضاد ببطاقة مضادة لـ c-myc على نحو متألق فلوري.

الشكل ١٦ أ - ١٦ ج يصور التعبير عن PD-L1 على 3T3(CD19+/B7.1+) وخلايا Raji و Nalm-6. تم استخدام قياس تدفق الخلايا لتحديد التعبير عن PD-L1 على 3T3(CD19+/B7.1+) وخلايا Raji و Nalm-6 التي تم نقل الطاقة إليها للتعبير عن PD-L1. عبرت الخلايا المنقول إليها الطاقة عن مستويات كبيرة من PD-L1 مقارنة بخلايا مقارنة غير منقول إليها الطاقة وتم تخزين مجموعات مدارة للاستخدام في التجارب.

الشكل ١٧ يصور تمدد الخلية 1928z و T 1928z-2A-5C4. وتمت حضانة الخلايا 1928z و T 1928z-2A-5C4 مع 3T3(CD19+/B7.1+) أو 3T3(CD19+/B7.1+/PD-L1+), وتمت مراقبة تمدد الخلية T بأزرق تريبيان وتم تحديد التعبير عن CAR بقياس تدفق الخلايا. تم الربط بين التمدد والتعبير عن CAR بالتعبير عن الخلايا الممددة على خلايا 3T3(CD19+/B7.1+).

الشكل ١٨ و ١٨ أ يوضحان متواليات scFv J43 المرتبطة على نحو تشغيلي مع متواليات رائد من الفأر Kappa [متواليات بهوية رقم: ٢٥]. تم تصميم متواليات السلسلة الثقيلة للمتغير (VH) والسلسلة الخفيفة للمتغير (VL) لنسيلة الجسم المضاد J43 مع متواليات رائد من الفأر Kappa,

وبطاقة c-myc وتم ربطها باستخدام رابط جليسين سيرين. يتم توضيح المتواليات ونقل الحمض الأميني.

الشكل ١٩ يصور متواليات الحمض النووي لبنية 19m28mziRESJ43 (رائد كبا من الفأر) [متواليات بهوية رقم: ٢٦]. تم استنساخ J43 scFv في ناقل تعبير عن SFG للتعبير مع 19m28mz CAR مستهدف بـ CD19. تم استخدام عنصر موضع إدخال ريبوزوم داخلي (IRES) لربط العنصرين، طبقاً لما هو موضح. ٥

الشكل ٢٠ يصور متواليات الحمض النووي لبنية H11m28mziRESJ43 (رائد كبا من الفأر) [متواليات بهوية رقم: ٢٧]. تم استنساخ J43 scFv في ناقل تعبير عن SFG للتعبير مع H11m28mz CAR المستهدف بـ MUC-CD. تم استخدام عنصر موضع إدخال ريبوزوم داخلي (IRES) لربط العنصرين، طبقاً لما هو موضح. ١٠

الشكل ٢١ يصور استراتيجيات لتعديل خلايا CAR T بالهندسة الوراثية للتعبير عن جزيئات scFv ("خلايا CAR T") للتغلب على "الوسط الدقيق العائل للورم". يمكن تعديل خلايا CAR+ T لإفراز scFvs تضادية بوظائف تنظيم للمناعة. عند تنشيط CAR لتقارب مولد الضد (١)، يمكن حث خلايا T مدعمة معدلة بـ CAR لإفراز scFvs مضادة إلى مستقبل خلية T PD-1 التثبيطي على كل من خلايا T مدعمة معدلة بـ CAR وخلايا T مضادة للورم داخلية المنشأ تعزز وظيفة المرسل المضادة للورم (٢)، ومستحثة لإفراز scFvs مضادة إلى مستقبل خلية CTLA-4 T التثبيطي على كل من خلايا T المدمجة المعدلة بـ CAR وخلايا T مضادة للورم داخلية المنشأ تعزز وظيفة المرسل المضادة للورم (٣)، ومستحثة لإفراز scFvs مضادة إلى مستقبل CD47 معبر عنه على خلايا الورم التي تعكس حجب خلايا الورم من التعرف بواسطة الاستجابة المناعية العائلة الخاملة المضادة للورم الأمر الذي يؤدي إلى التعرف على الورم واستئصاله بالملتهامات الكبيرة العائلة. ٢٠

الشكل ٢٢-٢٢د تصور التعبير الأساسي لـ CD40L بواسطة خلايا T بشرية. (أ) رسم تخطيطي لبنية فيروس ارتجاعية تشفر ناقل CD40L بشري؛ LTR، تكرار بطرف طويل؛ SD، SA، مانح جديدة ومستقبل؛ Ψ ، عنصر تعبئة، (ب) قياس تدفق الخلايا لخلايا T معدلة بـ CD4+

و CD40L+ CD8 بعد نقل جين الفيروسه الارتجاعية؛ (CD154) CD40L مضادة للبشر مترافقة مع APC لمحور x. (ج) تكاثر محسن لخلايا T معدلة بـ CD40L مقارنة بخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة. (د) إفراز محسن لـ (sCD40L) CD40L قابلة للذوبان، $IFN-\gamma$ ، و GM-CSF لخلايا T معدلة بـ CD40L مقارنة بخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة. تُعد جميع النتائج تمثيلية لثلاث تجارب منفصلة على الأقل (* تشير إلى دلالة إحصائية).

الشكل ٢٣ وأ ٢٣ ب تصور توليد مناعة معزز من CD40+ خلايا الورم بواسطة خلايا T معدلة بـ CD40L. (A) قياس تدفق الخلايا يوضح زيادة متحكم فيها لجزيئات التحفيز المشترك (CD80 و CD86)، جزيئات التصاق (CD54، CD58، و CD70) HLA Class I) و HLA-DR)، ومستقبل Fas-لموت الخلية (CD95) على DOHH2 سلالة خلية الورم يلي ذلك المزرعة المشتركة مع خلايا T معدلة بـ Cd40L (خط متصل) مقارنة بالمزرعة بخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة من نفس المانح (خط رمادي). (ب) لا يظهر ورم CD40 (NALM6) (الموضح) أي تغييرات نمط ظاهري يلي ذلك المزرعة المشتركة مع خلايا T معدلة بـ Cd40L. تُعد جميع النتائج تمثيلية لثلاث تجارب منفصلة على الأقل.

الشكل ٢٤ وأ ٢٤ ب تصور توليد مناعة معزز من خلايا CLL بواسطة خلايا T خارجية المنشأ معدلة بـ Cd40L. (أ) قياس تدفق الخلايا لمريض مشتقة من خلايا T معدلة بـ Cd40L بعد نقل جين الفيروس الارتجاعي بـ CD40L تحتوي على ناقل فيروس ارتجاعي؛ (CD154) CD40L مضادة للبشر مترافقة مع APC لمحور x. (ب) قياس تدفق الخلايا يوضح زيادة متحكم فيها لجزيئات التحفيز المشترك (CD80 و CD86)، جزيئات التصاق (CD54، CD58، و CD70) و جزيئات HLA (HLA Class I و HLA-DR)، ومستقبل Fas-لموت الخلية (CD95) على خلايا CLL بعد الاستنابت المشترك مع خلايا T معدلة بـ CD40L ذاتية المنشأ (خط متصل) مقارنة بمزارع مشتركة مع خلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة من نفس المانح (خط رمادي). تُعد جميع النتائج تمثيلية لثلاث تجارب منفصلة على الأقل.

الشكل ٢٥ وأ ٢٥ ب تصور إفراز IL-12 وإنضاج الخلايا الشجرية المشتقة أحادية الخلايا (moDCs) بخلايا T معدلة بـ Cd40L. (أ) تحليل السيتوكين لأوساط المزرعة للمزارع المشتركة (٢٤ ساعة) بين moDCs وخلايا T معدلة بـ Cd40L من ثلاث مانحين منفصلين تظهر إفراز

مرتفع IL-12p70 . (ب) قياس تدفق الخلايا لـ moDCs يظهر إنضاج يلي ذلك المزرعة المشتركة مع خلايا T معدلة بـ Cd40L. تُعد جميع النتائج تمثيلية لثلاث تجارب منفصلة على الأقل.

الشكل ٢٦-ج تصور تحويل طاقة فعال لخلايا T بشرية بناقل CAR/CD40L مما يظهر سمية خلايا محسنة. (أ) رسم تخطيطي لبنية فيروس ارتجاعية تحتوي على جينات -IRES-1928z-CD40L و Pz1-IRES-CD40L، LTR، تكرار بطرف طويل؛ SA، SD، مانح جديدة ومستقبل؛ Ψ ، عنصر تعبئة، CD8 تشير إلى متوالية رائد CD8؛ scFv، شظية متغيرة لسلسلة مفردة؛ VH و VL، سلاسل ثقيلة وخفيفة للمتغير؛ TM، نطاق عبر الغشاء. (ب) تحليل FACS لخلايا T بشرية تم تحويل الإشارة إليها للتعبير عن ناقل 19-28z/CD40L (تحفيز مسبق) بتعبير محسن تالي عن CAR/CD40L بعد المزرعة المشتركة على AAPCs (أرومات ليفية NIH 3T3 تعبر عن CD19 و CD80؛ وتم توضيح خلايا 1928/CD40LT المستخدمة في تجارب في الكائن الحي. الجسم المضاد المحدد لـ CAR 1928z المترافق مع PE، لمحور x (19e3)؛ المضاد للبشر المترافق مع APC (CD154) CD40L. (ج) وفقاً لما تم تحديده بخلايا T 19-28z/40L لاختبار إطلاق 51Cr قياسي التي تتسم بقدرة متزايدة ذات دلالة إحصائية على انحلال خلايا ورم DOHH2 مقارنة بخلايا T 19-28z. تُعد جميع النتائج تمثيلية لثلاث تجارب منفصلة على الأقل (* تشير إلى دلالة إحصائية).

الشكل ٢٧ يصور استئصال الورم والبقاء على المدى البعيد بعد تسريب خلية 1928z/CD40L T-منحنى بقاء فئران SCID-Beige تم تطعيمها بخلايا ورم DOHH2 بالحقن في الوريد قبل جرعة مفردة في الوريد بيومين بخلايا T معدلة بـ CAR. تم إظهار البقاء المحسن على المدى البعيد في الفئران المعالجة بخلايا T-1928z/CD40L (ع = ١٠) مقارنة بمجموعة من خلايا T المقارنة (مجموعة 1928z ع = ٨؛ مجموعة Pz1 و Pz1/40L ع = ٥). تُعد جميع النتائج تمثيلية لثلاث تجارب منفصلة على الأقل (* تشير إلى دلالة إحصائية).

الشكل ٢٨ يصور توليد مناعة معزز من CD40+ خلايا الورم بواسطة sCD40L. (أ) قياس تدفق الخلايا يوضح زيادة متحكم فيها لجزء التحفيز المشترك (CD80)، جزيئات التصاق (CD54، CD58، و CD70) وجزيئات HLA (HLA Class I و HLA-DR)، ومستقبل Fas-

لموت الخلية على سلالة خلايا ورم DOHH2 بعد الاستنبات المشترك مع أوساط مكيفة (أوسط خلايا T معدلة بـ CD40L) تحتوي على مستويات مرتفعة من sCD40L (خط متصل) مقارنة بأوساط (أوساط خلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة) بدون مستويات مرتفعة من sCD40L (خط رمادي).

الشكل ٢٩ يصور خلايا T 1928z/CD40L توضحسمية خلايا محسنة. طبقاً لتحديده بواسطة خلايا T 19-28z/40L لاختبار إطلاق 51Cr قياسي لها قدرة متزايدة ذات دلالة إحصائية لانحلال خلايا ورم Raji مقارنة بخلايا T-19-28z.

الوصف التفصيلي:

يقدم الاختراع الحالي بصفة عامة خلايا، بما في ذلك خلايا مستجيبة للمناعة المعدلة بالهندسة الوراثية (على سبيل المثال، خلايا T، خلايا قاتل طبيعي (NK)، خلايا T لمفاوية سامة للخلايا (CTL) خلايا) تعبر عن توليفة على الأقل من مولد الضد -الذي يتعرف على المستقبل (على سبيل المثال، TCR أو CAR) وأي من (١) scFv التي تربط مولد الضد المخمد مناعياً (على سبيل المثال PD-1، PD-L1، CTLA-4، أو CD47)؛ (٢) scFv التي تربط مولد الضد المحفز مناعياً (على سبيل المثال CD28، OX-40، CD40، أو 4-1BB) أو (٣) CD40L، وطرق استخدام مثل هذه الخلايا لعلاج الأورام والأمراض الأخرى حيث تكون الزيادة في الاستجابة المناعية المحددة بمولد الضد مطلوبة. يستند الاختراع، جزئياً على الأقل، على اكتشاف أن scFvs التي تربط مولد الضد المخمد مناعياً (على سبيل المثال CD47 و PD-L1) طبقاً لما هو موضح في الطلب الحالي) تكون مفيدة للتنشيط تحفز خلية متفاعلة مناعياً. على وجه الخصوص، scFvs من الاختراع تقلل أو تمنع إخماد الاستجابة المناعية لخلية منشطة متفاعلة مناعياً في البيئة الدقيقة للورم. طورت خلايا T الخبيثة سلسلة من الآليات لحماية نفسها من التعرف المناعي والتقليل. توفر الطريقة التالية توليد للمناعة في البيئة الدقيقة للورم لاستئصال الورم، وتمثل تقدم كبير يفوق العلاج التقليدي الانتقائي بخلية T.

الوسط الدقيق للورم

تتسم الأورام بوسط دقيق يكون مضيف للاستجابة المناعية للمضيف يتضمن سلسلة من الآليات بواسطة الخلايا الخبيثة لحماية نفسها من التعرف المناعي والتلاشي. يتضمن هذا " الوسط الدقيق للورم المضيف" مجموعة متنوعة من العوامل المخمدة للمناعة تتضمن خلايا $CD4^+ T$ المنظمة للتسلل (Tregs)، وخلايا المخمد المشتقة من نخاع (MDSCs)، والملتهفات الكبيرة المرتبطة بالورم (TAMs)، والسيتوكينات المخمدة للمناعة بما في ذلك $IL-10$ و $TGF-\beta$ ، والتعبير عن المركبات الترابطية المستهدفة للمستقبلات المخمدة للمناعة المعبر عنها بواسطة خلايا T المنشطة (CTLA-4 و PD-1). تلعب هذه الآليات الخاصة بالإخماد المناعي دوراً في المحافظة على الاحتمال وإخماد الاستجابات المناعية غير الملائمة، ومع ذلك في نطاق الوسط الدقيق للورم تمنع هذه الآليات استجابة مناعية فعالة مضادة للورم. ويمكن أن تحت هذه العوامل المخمدة للمناعة مجتمعة أي من الطاقة المرمزة أو تلاشي خلايا T المعدلة بـ CAR المحولة على نحو تكيفي عند مواجهة مع خلايا الورم المستهدفة.

مولد الضد ٤ السام للخلايا لخلية لمفاوية T (CTLA-4)

تمثل CTLA-4 مستقبل تثبيطي يتم التعبير عنه بواسطة خلايا T المنشطة، والتي عند تداخلها مع المركبات الترابطية المناظرة ($CD80$ و $CD86$ ؛ $B7-1$ و $B7-2$ ، على التوالي)، تتوسط في تثبيط أو طاقة خلية T المنشطة. وفي كل من الدراسات ما قبل الإكلينيكية والإكلينيكية، أدت إعاقة CTLA-4 بواسطة تسريب الجسم المضاد الجهازى، إلى تحسين الاستجابة داخلية المنشأ المضادة للورم، على الرغم من أنه في الموقف الإكلينيكي، مع السميات الكبيرة غير المرئية. وبدون الرغبة في التقييد بأية نظرية معينة، تسمح إعاقة CTLA-4 المستهدفة من خلال إعطاء scFvs المضادة بواسطة خلايا T المعدلة بـ CAR المستهدفة بالورم بسمية منخفضة فضلاً عن أنه يقدم مجموعة مؤازرة "داخلية المنشأ" لخلايا T المستهدفة بالورم (مجموعة خلية CART) المحمية من الإخماد المناعي. يمكن استخدام دراسات ما قبل الإكلينيكية (على سبيل المثال، نماذج الورم البشري للطعم الخارجي ونماذج الورم الفأري من الأورام الخبيثة لخلية B والأورام السرطانية للمبيض) لتقييم تأثير إفراز scFv على كل من مجموعة خلية T المعدلة بـ CAR فضلاً عن على الاستجابة المناعية داخلية المنشأ المضادة للورم. يمكن توليد scFv المضاد لـ CTLA-4 من الورم الهجين

9D9، الذي يفرز الأجسام المضادة وحيدة النسيلة لـ CTLA-4 المضادة للفأر، أو الورم الهجين 9H10، الذي يفرز الأجسام المضادة وحيدة النسيلة لـ CTLA-4 المضادة للفأر من الهامسر.

بروتين موت الخلية المبرمج ١ (PD-1) : يمثل PD-1 منظم مناعي سالب لخلايا T المنشطة عند التداخل مع المركبات الترابطية المناظرة له PD-L1 و PD-L2 المعبر عنها على الملتهمات الكبيرة داخلية المنشأ والخلايا الشجرية. تمثل الزيادة المتحكم فيها من PD-L1 خلايا ورم ذات آلية واحدة يمكن أن تتجنب النظام المناعي العائل. ومرة أخرى، في كل من التجارب ما قبل الإكلينيكية والإكلينيكية المنشورة مؤخراً، حثت إعاقة PD-1 بواسطة الأجسام المضادة استجابات مضادة للورم تم التوسط فيها من خلال النظام المناعي العائل داخلي المنشأ. ويمكن استخدام نماذج الورم الفأرية من الطعم الخارجي والمماثلة جينياً لتوضيح أن scFvs المضادة لـ PD-1 المفرزة بواسطة خلايا T المعدلة بـ CAR المستهدفة بالورم تعزز من الفعالية المضادة للورم لـ scFv هذه التي تفرز خلايا T المعدلة بـ CAR.

CD47

CD47 تمثل بروتين غشاء بتوزيع نسيج واسع وبروتين تيبين أنه في النماذج الحديثة ما قبل الإكلينيكية يحمي مدى واسع من خلايا الورم من التعرف على الملتهمات الكبيرة. وفي هذه النماذج، ترتب على تسريب الأجسام المضادة وحيدة النسيلة المضادة لـ CD47 تخفيض في تقدم الورم المثبت. بعبارة أخرى، أدت إعاقة CD47 على خلايا الورم إلى تعريض هذه الخلايا الورمية للتعرف والتهام الخلايا بواسطة الملتهمات الكبيرة العائلة. مع وجود، التعبير الشامل إلى حد بعيد لمولد الضد المذكور، يمكن أن تؤدي الإعاقة الجهازية لتسريب الجسم المضاد بصورة محتملة إلى سمية غير مستهدفة. مرة أخرى، في مجارة نموذج الإعطاء المستهدف، يعمل إفراز scFvs المضاد لـ CD47 للإعاقة على نحو مماثل المعطى مباشرة إلى الوسط الدقيق للورم بواسطة خلايا T المعدلة بـ CAR على حث/ تحسين تأثير مطلوب مضاد للورم، وفي هذه الحالة يتوسط فيه النظام المناعي العائل التكيفي بدلاً من الخامل. علاوة على ما سبق، لا تقتصر هذه الطريقة على علاج تكوين الأورام الجديدة، وإنما يكون قابل للتعديل طبقاً لمدى واسع من التطبيقات حيث يكون المطلوب زيادة في الاستجابة المناعية المحددة بمولد الضد، ولا تتضمن مثل هذه التطبيقات فقط علاج تكوين الأورام الجديدة، وإنما كذلك تحسين الاستجابة المناعية ضد عدوى بكائن ممرض أو

مرض معدي ولتقوية الاحتمال المناعي في الخلايا T المنظمة في سياق المناعة الذاتية أو زرع الأعضاء المختلفة وراثياً.

CD40L : يتسم المركب الترابطي CD40L (CD154، CD40L)، وبروتين الغشاء من النوع II الذي ينتمي إلى العائلة العليا من جين عامل تتركز الورم (TNF) tumor necrosis factor، بإمكانية تحسين وظيفة الخلية T المحددة بالورم. ومن الناحية المبدئية، يتم تمييز ذلك على خلايا T CD4+ المنشطة، ويكون التعبير عن CD40L قابل للحث على منظومة واسعة من خلايا المناعة، المكونة للدم، الطلائية، البطانية وخلايا العضلة الملساء. في خلايا T المنشطة، يتم التعبير عن CD40L في غضون دقائق، وتصل في الذروة في غضون ٦ ساعات، وبعد ذلك تقل مع الوقت على مدى ١٢-٢٤ ساعة التالية. ترتبط CD40L بـ CD40 لمستقبل قريب منها يتم التعبير عنه على نحو تكويني على مجموعة متنوعة من خلايا مناعية وغير مناعية رابطة لخلايا B، وملتهفات كبيرة، والخلايا الشجرية (DCs) dendritic cells. بصورة ملحوظة، يتم كذلك التعبير عن CD40 على العديد من الأورام الخبيثة الدموية وغير الدموية بما في ذلك سرطان الدم الليمفاوي المزمن (CLL) chronic lymphocytic leukemia، سرطان الدم الليمفاوي الحاد (ALL) acute lymphoblastic leukemia، الورم اللمفاوي من غير نوع (NHL) Hodgkin، الورم اللمفاوي من نوع Hodgkin،

سرطان البلعوم، سرطان عظمي، ورم سرطاني Ewing، ورم ميلانيني، وسرطان الثدي، المبيض، وسرطان عنق الرحم مما يدل على إمكانية تطبيق خلايا T CAR/CD40L على مجموعة واسعة من الأورام الخبيثة. انظر المراجع ٨-١٧ المدرجة في المراجع على المثال ٦، فيما يلي.

سلالات الخلية المكونة للأوعية الدموية

توفر الخلايا المكونة للأوعية الدموية الثديية (الدم) مدى متنوع من الأنشطة الفسيولوجية. يتم تقسيم الخلايا المكونة للأوعية الدموية إلى سلالات لمفاوية، ونخاعية ومولدة للكريات الحمراء. توفر السلالة اللمفاوية، التي تشتمل على خلايا B، و T وقاتلة طبيعية (NK) لإنتاج الأجسام المضادة، وتنظيم النظام المناعي الخلوي، وكشف العوامل الغريبة في الدم، وكشف الخلايا الغريبة للعائل، وما شابه ذلك. التعبير " خلايا T " وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى خلايا لمفاوية

تنضج في الغدة الصعترية وتكون مسؤولة بصورة أساسية عن المناعة التي تتوسط فيها الخلية. تشترك خلايا T في النظام المناعي التكيفي. التعبير "خلايا القاتل الطبيعي (NK)" وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي يشير إلى خلايا لمفاوية تمثل جزء من المناعة التي تتوسط فيها الخلية وتعمل أثناء الاستجابة المناعية الخاملة. ولا تتطلب تنشيط مسبق لإجراء تأثيرها السام للخلايا على خلايا T المستهدفة. خلايا T السامة للخلايا (CTL أو الخلايا T القاتلة) تمثل مجموعة فرعية من خلايا T للمفاوية التي يمكنها حث موت الخلايا السدوية أو الورمية المصابة بالعدوى.

٥ خلايا للاستخدام في طرق الاختراع : يقدم الاختراع الحالي خلايا تعبر عن توليفة من مولد الضد - الذي يتعرف على المستقبل الذي ينشط خلية مستجيبة للمناعة (على سبيل المثال, TCR, CAR) و scFv التي تربط مولد الضد المخمد مناعياً (على سبيل المثال PD-1, PD-L1, CTLA-4, أو CD47), وطرق استخدام مثل هذه الخلايا الخاصة بعلاج مرض يتطلب استجابة مناعية محسنة. في إحدى الطرق, يتم استخدام خلايا T المحددة بمولد ضد الورم, خلايا NK, خلايا CTL أو خلايا أخرى مستجيبة للمناعة للتعبير عن scFv التي تربط مولد الضد المخمد مناعياً, لمعالجة أو الوقاية من الأورام. على سبيل المثال, خلية T تعبر عن مستقبل مولد الضد الخيمري z1928 الذي يتعرف على CD19 يتم التعبير المشترك عنها في خلية T التي تعبر عن scFv التي تربط CD47. يتم إعطاء مثل هذه الخلايا إلى خاضع بشري في حاجة إلى ذلك لمعالجة أو الوقاية من أنواع سرطان الدم (على سبيل المثال اللوكيميا, الأورام للمفاوية, والأورام النخاعية). في طريقة أخرى, يمكن استخدام خلايا T الفيروسية المحددة بمولد الضد, خلايا NK, خلايا CTL لعلاج الأمراض الفيروسية. على سبيل المثال يتم التعبير المشترك عن مستقبل مولد ضد خيمري مشترك التحفيز يتعرف على مولد ضد CMV أول و scFv تربط PD-1 في خلايا T لمفاوية سامة للخلايا الخاصة بعلاج CMV.

١٥ يمكن تعديل خلايا T الخاصة بالمريض بالهندسة الوراثية لاستهداف الأورام من خلال إدخال جينات تشفر مستقبلات خلية T اصطناعية يطلق عليها مستقبلات مولد الضد الخيمرية (CARs). يتألف الجيل الأول من CARs نمطياً من نطاق التعرف على مولد الضد المشتق من الجسم المضاد, جسم مضاد بطول شظية مفرد (scFv) مدمج في نطاق متغير عبر الغشاء, مدمج في نطاق إرسال إشارة سيتوبلازمي لسلسلة مستقبل الخلية T. يحسن الإدراج الإضافي لواحد أو اثنين

من نطاقات مستقبل إرسال الإشارة بالتحفيز المشترك يتضمن CD28, ٤-IBB, و OX-40 قريبا من سلسلة C من إرسال إشارة CAR الذي يترتب عليه الجيل الثاني والثالث من CARs على التوالي.

- ٥ خلايا لمفاوية T محددة بمولد ضد الورم (وخلايا NK) : تتضمن أنواع الخلايا للمفاوية البشرية المحددة بمولد الضد التي يمكن استخدامها في طرق الاختراع، بدون حصر، الخلايا للمفاوية المحيطية من المانح المعدلة وراثياً للتعبير عن مستقبلات مولد الخيمرية (CARs) Sadelain, (M., et al. 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45) المعدلة وراثياً للتعبير عن معقد مستقبل خلية T يتعرف على مولد ضد الورم ذي الطول الكامل الذي يشتمل على دايمر غير متجانس ألفا وبيتا (Morgan, R.A., et al. 2006 Science) tumor infiltrating lymphocytes (TILs) في خزعات حية من الورم tumor biopsies (Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:495-504; Panelli, M.C., et al. 2000 J Immunol 164:4382-4392)، وعلى نحو انتقائي في كرات الدم البيضاء المحيطية المحددة بمولد الضد الممددة في المعمل على نحو انتقائي التي تستخدم خلايا اصطناعية تقدم مولد الضد artificial pulsed dendritic cells (AAPCs) أو الخلايا الشجرية النبضية (Dupont, J., et al. 2005 Cancer Res 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A., et al. 2003 Blood 102:2498-2505). يمكن أن تكون خلايا T ذاتية المنشأ، أو مغايرة المصدر، أو مشتقة في المعمل من خلايا منذرة أو خلايا جذعية معالجة بالهندسة الوراثية. ويكون أي مولد ضد ورم مناسب (ببتيد مولد للضد antigenic peptide) للاستخدام في النماذج المتعلقة بالورم الموصوفة في الطلب الحالي. وتتضمن مصادر مولد الضد، ولكن ليس على سبيل الحصر، بروتينات السرطان. ويمكن التعبير عن مولد الضد في صورة ببتيدي أو في صورة بروتين سليم أو جزء منه. يمكن أن يكون البروتين السليم أو جزء منه أصلي أو مطفر.
- ١٠
- ١٥
- ٢٠
- ٢٥ تتضمن مولدات الضد المناسبة مولد ضد غشاء محدد بالبروستاتا prostate specific membrane antigen (PSMA) ومولد ضد خلية جذعية للبروستاتا (PCSA) prostate stem cell antigen.

خلايا T لمفاوية فيروسية محددة بمولد الضد (وخلايا NK)

تتضمن مولدات الضد المناسبة للاستخدام في علاج عدوى من كائن ممرض أو مرض معدي آخر، على سبيل المثال، في خاضع معرض مناعياً ، بدون حصر، مولدات الضد الفيروسية الموجودة في الفيروس المضخم للخلايا Cytomegalovirus (CMV)، فيروس Epstein Barr (EBV)، فيروس نقص المناعة البشري (HIV) Human Immunodeficiency Virus، وفيروس الأنفلونزا.

يمكن أن يكون المصدر غير المنقى من CTLs أي مصدر معروف في المجال، مثل نخاع العظم، والخلايا الجنينية، وخلايا حديث الولادة أو خلايا بالغين أو مصدر خلايا آخر مكون للأوعية الدموية، على سبيل المثال، كبد جنين، أو دم محيطي أو دم حبل سري. يمكن استخدام التقنيات المتنوعة لفصل الخلايا. على سبيل المثال، يمكن أن تزيل طرق الانتقاء السالبة الخلايا من غير CTL بصفة أولية. ويمكن أن تكون mAbs مفيدة على وجه الخصوص لتمييز المرقمات المرتبطة بسلالات خلايا معينة و/ أو مراحل معينة من التمايز لكل من الانتقاعات الموجبة والسالبة.

يمكن إزالة نسبة كبيرة من الخلايا المتميزة عند الطرف بصورة أولية بواسطة فصل الخام نسبياً. على سبيل المثال، يمكن استخدام عمليات فصل بالخرزة المغنطيسية بصورة أولية لإزالة أعداد كبيرة من خلايا T غير ذات الصلة. ويفضل، على الأقل حوالي ٨٠%، تتم عادة إزالة على الأقل ٧٠% من إجمالي الخلايا المكونة للأوعية الدموية قبل عزل الخلية.

تتضمن إجراءات الفصل، ولكن ليس على سبيل الحصر، الطرد المركزي متدرج الكثافة؛ إعادة الضبط؛ الاقتران بالجسيمات التي تعدل كثافة الخلية؛ والفصل المغنطيسي بخرزات مغنطيسية مغطاة بالجسم المضاد؛ وكروماتوجراف الألفة؛ وعوامل سامة للخلايا مرتبطة بـ أو مستخدمة بالاشتراك مع mAb، بما في ذلك ولكن ليس على سبيل الحصر، المتمم والسيتوكسينات؛ والتمييز بجسم مضاد مرفق بمصفوفة صلبة، على سبيل المثال لوح، شريحة، تصويل أو أية تقنية ملائمة أخرى.

تتضمن تقنيات الفصل والتحليل، ولكن ليس على سبيل الحصر، قياس تدفق الخلايا، التي يمكن أن تتسم بدرجات متفاوتة من التعقيد، على سبيل المثال، مجموعة من قنوات الألوان، والزوايا المنخفضة وقنوات كشف انتشار الضوء منفرجة الزوايا، وقنوات الإعاقة.

يمكن انتقاء الخلايا ضد الخلايا الميتة، باستخدام أصباغ مرتبطة بالخلايا الميتة مثل يوديد بروبيديوم (PI) propidium iodide. ويفضل، أن يتم انتقاء الخلايا في وسط يشتمل على ٢% مصل جنين بقري (FCS) fetal calf serum أو ٠,٢% زلال مصل بقري bovine serum albumin (BSA) أو أي وسط مناسب آخر، يفضل معقم، أو متساوي التوتر السطحي isotonic medium.

بناء على ما سبق، يقدم الاختراع بصفة عامة خلية مخددة للمناعة، مثل خلية T محددة بالفيروس أو محددة بالورم تشتمل على مستقبل يربط مولد الضد الأول وينشط الخلية المخددة للمناعة ومستقبل يرتبط بمولد ضد ثاني ويحفز الخلية المخددة للمناعة.

نواقل التعبير

يمكن تحقيق التعديل الجيني للخلايا المخددة للمناعة (على سبيل المثال، خلايا T، خلايا CTL، خلايا NK) بتحويل طاقة تركيبية الخلية المتجانسة إلى حد بعيد ببنية حمض DNA لنتاج عودة الاتحاد الجيني. يفضل، أن يتم استخدام ناقل فيروس ارتجاعي (إما فيروس جاما ارتجاعي أو فيروس بطيء) لإدخال بنية DNA في الخلية. على سبيل المثال، يمكن استنساخ بولي نيوكليويد تشفر مستقبل يرتبط بمولد ضد (على سبيل المثال، مولد ضد الورم، أو صورة مغايرة، أو شظية منه)، في ناقل فيروسية عكسية ويمكن اشتقاق التعبير من معززه داخلي المنشأ، من تكرار طرف بطول فيروس ارتجاعي، أو من معزز محدد لخلية T مستهدفة من النوع محل الأهمية. يمكن استخدام النواقل غير الفيروسية كذلك.

للتعديل الجيني الأولي للخلايا لتوفير الخلايا المحددة بمولد الضد للورم أو الفيروس، يتم استخدام ناقل فيروسية عكسية بصفة عامة لتحويل الإشارة، ومع ذلك يمكن استخدام أي ناقل فيروسي مناسب آخر أو نظام نقل غير فيروسي. للتعديل الجيني التالي للخلايا لتوفير خلايا تشتمل على مولد الضد تقدم معقد يشتمل على اثنين على الأقل من مركبات ترابطية مشتركة التحفيز، يثبت

بالمثل نقل جين الفيروس الارتجاعي (تحويل الإشارة) أنه فعال. كما تكون التوليفات من ناقل الفيروس الارتجاعي وخط التعبئة مناسبة كذلك، حيث تكون بروتينات القفيصة فعالة وظيفياً لنقل العدوى إلى خلايا بشرية. تعرف سلالات الخلايا التي تنتج الفيروسات مزدوجة الألفة المتنوعة، بما في ذلك، ولكن ليس على سبيل الحصر، PA12 (Miller, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902); and CRIP (Danos, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464). كما تعد الجسيمات غير المزدوجة الأيونات مناسبة كذلك، على سبيل المثال، الجسيمات ذات النمط الزائف بمغلف VSVG، RD114 أو GALV وأي نوع آخر معروف في المجال.

تتضمن طرق تحويل الإشارة الممكنة كذلك الاستنابات المشتركة المباشر للخلايا مع الخلايا المنتجة، على سبيل المثال، من خلال طريقة Bregni, et al. (1992) Blood 80:1418-1422، أو الاستنابات مع المحلول الطافي الفيروسي بمفرده أو خامات مركزة من الناقل مع أو بدون عوامل النمو المناسبة والكاتيونات المتعددة، على سبيل المثال، من خلال طريقة Xu, et al. (1994) Exp. Hemat. 22:223-230; and Hughes, et al. (1992) J. Clin. Invest. 89:1817.

يمكن استخدام نواقل فيروسية أخرى لنقل الإشارة للتعبير عن المركب الترابطي للتحفيز المشترك من الاختراع في خلية مخمدة مناعية. يفضل، أن يظهر ناقل التعبير المختار فعالية مرتفعة في العدوى والدمج والتعبير الثابت (انظر، على سبيل المثال، Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996; and Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997). وتتضمن نواقل التعبير الفيروسية الأخرى التي يمكن استخدامها، على سبيل المثال، الفيروس الغدي، والفيروس البطيء، والنواقل الفيروسية المرتبطة بالغدة، وفيروسات اللقاحات، وفيروس الورم الحليمي البقري، أو فيروس الحلا البسيط، مثل فيروس Epstein-Barr (انظر كذلك، على سبيل المثال، نواقل التعبير الخاصة بـ Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281,

- 1989; Eglitis et al., BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev et al., Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller et al., Biotechnology ٥
7:980-990, 1989; LeGal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993
Johnson, Chest 107:77S- 83S, 1995). تم على وجه الخصوص تطوير نواقل
الفيروس الارتجاعي وتم استخدامها في المواقف الإكلينيكية (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson et al., U.S. Pat. No. 5,399,346).
- ١٠ كما يمكن استخدام الطرق غير الفيروسية للتعبير عن البروتين في خلية. على سبيل المثال، يمكن إدخال جزيء حمض نووي في خلية بإعطاء الحمض النووي في وجود حقن دهني (Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger et al., Methods in Enzymology 101:512, 1983)، ترافق أزيالوروسوموكويد- متعدد الليسين (Wu) asialoorosomucoid-polylysine (1983) ١٥
Wu et al., Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu et al., Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989)، أو بواسطة الحقن الدقيق تحت تأثير الظروف الجراحية (Wolff et al., Science 247:1465, 1990). تتضمن الوسائل الأخرى غير الفيروسية لنقل الجين نقل العدوى في المعمل باستخدام فوسفات الكالسيوم، ودكستران DEAE، والاستشراد الكهربائي، واندماج الجبلة المُجرّدة. ويمكن كذلك أن تكون الجسيمات الدهنية مفيدة لنقل DNA في خلية ما. يمكن كذلك تحقيق نقل جينات طبيعية في الأنسجة المتأثرة لخاضع ٢٠
بنقل الحمض النووي الطبيعي في نوع خلية قابل للزرع خارج الكائن الحي (على سبيل المثال، خلية رئيسية أو جزء منذر منها ذاتي النشأة أو غير متجانس)، وبعد ذلك يتم حقن الخلية (أو سلالاتها) في النسيج المستهدف أو يتم حقنها جهازياً. ويمكن كذلك اشتقاق مستقبلات ناتج عودة الاتحاد الجيني أو الحصول عليه باستخدام إنزيمات نقل أو إنزيمات نووية مستهدفة (على سبيل ٢٥

المثال، إنزيمات نووية لأصبع الزنك، وإنزيمات ميجانو، أو إنزيمات نووية (TALE). يمكن كذلك الحصول على تعبير عابر بواسطة الاستشراء الكهربائي RNA.

يمكن توجيه التعبير عن cDNA للاستخدام في علاج متعدد النيوكليوتيد من أي معزز مناسب (على سبيل المثال، الفيروس المضخم للعضلات البشري human cytomegalovirus

5 (CMV)، فيروس منوي 40 (SV40)، أو معززات ميتالو ثيونين)، ويتم تنظيمها بواسطة أي

عنصر أو إنترون تنظيمي ثديي مناسب (على سبيل المثال، معزز/مقوي/بنية إنترون intron structure لعامل الإطالة أ). على سبيل المثال، في حالة الرغبة في ذلك، يمكن استخدام

محسّنات معروفة أنها توجه على نحو تفضيلي التعبير عن الجين في أنواع خلايا محددة لتوجيه التعبير عن حمض نووي. يمكن أن تتضمن المحسّنات، بدون تقييد، تلك التي تتميز بأنها محسّنات

10 محددة بالخلية أو النسيج. وبصورة بديلة، في حالة استخدام نسيلة جينومية كبنية علاجية، يمكن أن

يتوسط في تنظيمها متواليات تنظيمية متقاربة، أو في حالة الرغبة في ذلك، بواسطة متواليات

التنظيم المشتقة من مصدر غير متجانس، بما في ذلك أي من المعززات أو العناصر التنظيمية الموصوفة فيما سبق.

يمكن إنماء الخلايا الناتجة تحت تأثير ظروف مماثلة لتلك الخاصة بالخلايا غير المعدلة،

15 وبالتالي يمكن تمديد الخلايا المعدلة واستخدامها لعدة أغراض.

البولي ببتيدات والنظائر

ينطوي الاختراع كذلك على بولي ببتيد B6H12.2، 4H1128z، CD3 \square ، CD28، aCD19،

scFv، 5C4 scFv، و J43 scFv أو شظايا منها يمكن تعديلها والتي يتم تعديلها بطريقة تعزز

من نشاطها المضاد لتكوين الأورام الجديدة (على سبيل المثال، جسم مضاد وحيد النسيلة متوافق

20 مع البشر) عند التعبير في خلية مخددة للمناعة. ويقدم الاختراع طرقاً لتحسين متواليات الحمض

الأميني أو متواليات حمض نووي بإنتاج بديل في المتواليات. ويمكن أن تتضمن التبديلات المذكورة

تطبيقات، أو عمليات حذف، أو إدخال، معينة، أو تعديلات بعد الترجمة الوراثة. كما يقدم

الاختراع نظائر من أي من البولي ببتيدات الحادثة بصورة طبيعية من الاختراع. ويمكن أن تختلف

النظائر من البولي ببتيدات الحادثة بصورة طبيعية من الاختراع بواسطة فروق متواليات الحمض

الأميني، أو تعديلات بعد الترجمة الوراثية، أو بكل منهما. تظهر نظائر الاختراع بصفة عامة تطابق بنسبة تبلغ على الأقل ٨٥%، ٩٠%، ٩١%، ٩٢%، ٩٣%، ٩٤%، ٩٥%، ٩٦%، ٩٧%، ٩٨%، ٩٩% أو تطابق أكثر مع جميع أو جزء من متواليه الحمض الأميني الحادثة بصورة طبيعية من الاختراع. ويبلغ طول مقارنة المتواليه على الأقل ٥، ١٠، ١٥ أو ٢٠ وحدة بنائية للحمض الأميني، ويفضل على الأقل ٢٥، ٥٠، أو ٧٥ وحدة بنائية للحمض الأميني، ويفضل أكثر من ١٠٠ وحدة بنائية للحمض الأميني. مرة أخرى، في طريقة تمثيلية لتحديد درجة التطابق، يمكن استخدام برنامج BLAST، باستخدام درجة احتمالية بين e-3 و e-100 مما يبين متواليه مرتبطة على نحو وثيق. وتتضمن التعديلات الاشتقاق الكيميائي للبولي ببتيدات في الكائن الحي وفي المعمل، على سبيل المثال، المعالجة بالأسيتيل acetylation ، والمعالجة بالكربوكسيل carboxylation ، أو المعالجة بالفوسفوريل phosphorylation ، أو المعالجة بالجليكوسيل glycosylation ؛ يمكن أن تحدث مثل هذه التعديلات أثناء تخليق البولي ببتيد أو معالجة أو بعد المعالجة بإنزيمات معدلة معزولة. ويمكن كذلك أن تختلف النظائر عن البولي ببتيدات الحادثة بصورة طبيعية من الاختراع بالتغيرات في المتواليه الرئيسية. وتتضمن هذه التغيرات الصور المغايرة الجينية، كل من الطبيعية والمستحثة (على سبيل المثال، الناتجة من التطهير العشوائي بالإشعاع أو بالتعرض إلى إيثنان ميثيل كبريتات ethanemethylsulfate أو بالتطهير المحدد بالموضع طبقاً لما تم وصفه في (Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed.), CSH Press, 1989, or Ausubel et al., عاليه). كما يتم إدراج ببتيدات حلقيه ، وجزئيات، ونظائر تحتوي على الوحدات البنائية الأخرى غير أحماض L-أميना، على سبيل المثال، أحماض D-أمينية أو أحماض أمينية amino acids غير حادثة بصورة طبيعية أو تصنيعية synthetic، على سبيل المثال، أحماض بيتا beta ، أو جاما gamma ، أو أمينية.

بالإضافة إلى البولي ببتيدات ذات الطول التام، يقدم الاختراع كذلك شظايا من أي من واحد من البولي ببتيدات أو نطاقات ببتيدات من الاختراع. وفقاً لاستخدامه في الطلب الحالي، التعبير "شظية" يعني على الأقل على الأقل ٥، ١٠، ١٣، أو ١٥ حمض أميني. في نماذج أخرى تبلغ الشظية على الأقل ٢٠ حمض أميني متماس، على الأقل ٣٠ حمض أميني متماس، أو على الأقل

٥٠ حمض أميني متماس، وفي نماذج أخرى على الأقل ٦٠ إلى ٨٠، ١٠٠، ٢٠٠، ٣٠٠ أو أكثر من الأحماض الأمينية المتماسة. يمكن توليد شظايا الاختراع بواسطة الطرق المعروفة لدى أولئك المتمرسون في المجال أو يمكن أن تنتج عن معالجة بروتين طبيعية (على سبيل المثال، إزالة حمض أميني من البولي ببتيدي حديث التكوين التي لا تكون مطلوبة للنشاط الحيوي أو إزالة حمض أميني بواسطة عمل جديدة بديلة من mRNA أو أحداث معالجة بروتين بديلة).

٥ تتسم النظائر غير البروتينية ببنية كيميائية مصممة لمحاكاة النشاط الوظيفي للبروتين وفقاً للاختراع. ويتم إعطاء مثل هذه النظائر طبقاً للطرق الخاصة بالاختراع. ويمكن أن تتجاوز مثل هذه النظائر النشاط الفسيولوجي للبولي ببتيديات الأصلية. تعد طرق تصميم النظير معروفة جيداً في المجال، ويمكن إجراء تخليق النظائر طبقاً لمثل هذه الطرق بتعديل البنيات الكيميائية بحيث تزيد النظائر الناتجة من الفعالية المضادة لتكوين الأورام الجديدة للبولي ببتيديات الأصلية عندما يتم التعبير عنها في خلية مخمدة للمناعة. وتتضمن هذه التعديلات الكيميائية، ولكن ليس على سبيل الحصر، استبدال مجموعات R بديلة وتباين درجة التشبع عند ذرات كربون محددة لبولي ببتيدي مرجعي. ويفضل، أن تكون نظائر البروتين مقاومة نسبياً لانحلال في الكائن الحي، مما يترتب عليه تأثير علاجي أكثر طولاً عند الإعطاء. وتتضمن تجارب قياس النشاط الوظيفي، ولكن ليس على سبيل الحصر، تلك الموصوفة في الأمثلة فيما يلي.

المركبات الترابطية للتحفيز المشترك

٢٠ يوفر التفاعل مع مركب ترابطي واحد على الأقل للتحفيز المشترك إشارة هامة غير مولدة للضد للتنشيط التام للخلية المناعية (على سبيل المثال، خلية T). وتتضمن المركبات الترابطية للتحفيز المشترك، بدون تقييد، المركبات الترابطية لعامل تنكر الورم (TNF)، والسيتوكينات cytokines (مثل IL-2، IL-12، IL-15 أو IL-21)، والمركبات الترابطية للعائلة العليا للجلوبولين المناعي (Ig). ويعد عامل تنكر الورم tumor necrosis factor (TNF) سيتكون مشترك في الالتهاب الجهازية ويحفز تفاعل الطور الحاد. ويتمثل دوره الرئيسي في تنظيم خلايا المناعة. تشارك المركبات الترابطية لعامل تنكر الورم (TNF) عدد من السمات المشتركة. ويتم تخليق الغالبية من المركبات الترابطية في صورة بروتينات عبر الغشاء من النوع II (الطرف C خارج الخلية) التي تحتوي على قسم سيتوبلازمي قصير ومنطقة طويلة نسبياً خارج الخلية. وتتضمن المركبات

الترابطة لعامل TNF، بدون تقييد، عامل نمو العصب (NGF)، CD40L،
CD137L/4-1BBL، (CD40L)/CD154، وعامل تنكز الورم ألفا (TNF α)،
CD134L/OX40L/CD252، والمركب الترابطي Fas (FasL)،
CD30L/CD153، وعامل تنكز الورم بيتا (TNF β)، (TNF β) / لمفوتوكسين-ألفا (LT α)،
لمفوتوكسين-بيتا (LT β)، وعامل تنشيط خلية CD257/B (BAFF)/Blys/THANK/Tail-1،
والمركب الترابطي لمستقبل TNF المستحث بجلوكوكورتيكويد glucocorticoid (GITRL)،
والمركب الترابطي الذي يحث تلاشي الخلية المرتبط بـ TNF (TRAIL)، LIGHT،
(TNFSF14). تعد العائلة العليا للجلوبيولين المناعي immunoglobulin (Ig) مجموعة كبيرة
من بروتينات سطح الخلية وقابلة للذوبان تكون مشتركة في التعرف، والارتباط، أو عمليات
الالتصاق للخلايا. وتتشارك هذه البروتينات في السمات البنائية مع الجلوبيولينات المناعية—فهي
تتسم بنطاق جلوبيولين مناعي (مطوي). وتتضمن المركبات الترابطة للعائلة العليا للجلوبيولين
المناعي، بدون تقييد، CD80 و CD86، كل من المركبات الترابطة لـ CD28.

الإعطاء

يمكن توفير التركيبات التي تشتمل على الخلايا المخدمة للمناعة المعدلة وراثياً وفقاً للاختراع (على
سبيل المثال، خلايا T، أو خلايا NK، أو خلايا CTL، أو أسلافها) جهازياً أو مباشرة إلى
خاضع لعلاج تكوين أورام جديدة، أو عدوى بكائن ممرض، أو مرض معدي. في أحد النماذج، يتم
حقن خلايا الاختراع مباشرة في عضو محل الاهتمام (على سبيل المثال، عضو متأثر بتكوّن
الأورام الخبيثة neoplasia). بصورة بديلة، يتم توفير التركيبات التي تشتمل على الخلايا المخدمة
للمناعة المعدلة وراثياً بصورة غير مباشرة إلى العضو محل الأهمية، على سبيل المثال، بالإعطاء
في الجهاز الدوري، (على سبيل المثال، الأوعية الدموية للورم tumor vasculature). ويمكن
توفير عوامل التمدد والتمايز قبل، أو أثناء أو بعد إعطاء الخلايا لزيادة إنتاج خلايا T، أو خلايا
NK، أو خلايا CTL أو في المعمل أو في الكائن الحي.

يمكن إعطاء الخلايا المعدلة في أي ناقل مقبول فسيولوجياً، عادة في الأوعية، على الرغم من أنه
يمكن إدخالها كذلك في العظم أو موضع آخر ملائم حيث يمكن أن تجد الخلايا موضع مناسب
للتجديد والتمايز (على سبيل المثال، العُدَّة الصَّعْتَرِيَّة tumor vasculature). عادة، على الأقل

١٠ × ٥ من الخلايا، لتصل في النهاية ١٠١٠×١ أو أكثر. يمكن أن تتضمن الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً وفقاً للاختراع مجموعة منقاة من الخلايا. بمقدور أولئك المتمرسين في المجال أن يحددوا بسهولة النسبة المئوية من الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً في مجموعة باستخدام الطرق المتنوعة المعروفة جيداً، مثل فرز الخلايا المنشطة ومضياً fluorescence activated cell sorting (FACS). تكون قيم المدى المفضلة من النقاء في المجموعات التي تتضمن الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً حوالي ٥٠ إلى حوالي ٥٥%، حوالي ٥٥ إلى حوالي ٦٠%، وحوالي ٦٥ إلى حوالي ٧٠%. ويفضل أكثر أن يكون النقاء حوالي ٧٠ إلى حوالي ٧٥%، حوالي ٧٥ إلى حوالي ٨٠%، حوالي ٨٠ إلى حوالي ٨٥%؛ ويفضل أكثر كذلك أن يكون النقاء حوالي ٨٥ إلى حوالي ٩٠%، حوالي ٩٠ إلى حوالي ٩٥%، وحوالي ٩٥ إلى حوالي ١٠٠%. يمكن تضبيب الجرعات بسهولة من قبل أولئك المتمرسين في المجال (على سبيل المثال، يمكن أن يتضمن التخفيض في النقاء زيادة في الجرعات). يمكن إدخال الخلايا بالحقن، أو القسطرة، أو ما شابه ذلك. إذا كانت هناك رغبة، يمكن كذلك إدراج العوامل، بما في ذلك ولكن ليس على سبيل الحصر، إنترليوكينات interleukins ، على سبيل المثال IL-2، IL-3، IL-6، IL-11، IL7، IL12، LIS، IL21، فضلاً عن الإنترليوكينات الأخرى، عوامل تحفيز المستعمرات، مثل G-، M- و GM-CSF، إنترفيرونات interferons ، على سبيل المثال، إنترفيرون جاما، ومكون وعائي.

تتضمن تركيبات الاختراع التركيبات الصيدلانية التي تشتمل على الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً أو أسلافها ومادة حاملة مقبولة صيدلانياً. يمكن أن يكون الإعطاء ذاتي أو غير متجانس. على سبيل المثال، يمكن الحصول على الخلايا المخمدة للمناعة، أو أسلافها من خاضع واحد، ويتم إعطاؤها إلى نفس الخاضع أو خاضع مختلف، أو خاضع متوافق. يمكن إعطاء الخلايا المخمدة للمناعة وفقاً للاختراع المشتقة من الدم الطرفي أو أسلافها (على سبيل المثال، مشتقة في الكائن الحي، أو خارج الكائن الحي أو في المعمل) عن طريق الحقن الموضعي، بما في ذلك الإعطاء بالقسطرة، الحقن الجهازي، الحقن الموضعي، أو الحقن في الوريد، أو الإعطاء عن غير طريق القناة الهضمية. عند إعطاء تركيبية علاجية من الاختراع الحالي (على سبيل المثال، تركيبية

صيدلانية تحتوي على خلية معدلة وراثيا مخمد للمناعة)، تتم صياغتها بصفة عامة في صورة قابلة للحقن من وحدة جرعة (محلول، معلق suspension، مستحلب emulsion).

الصيغ : يمكن توفير تركيبات الاختراع التي تتضمن الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً على نحو ملائم في صورة مستحضرات سائلة معقمة، على سبيل المثال، محاليل مائية متساوية التوتر السطحي، معلقات، مستحلبات، مشتتات، أو تركيبات لزجة، يمكن تنظيمها وفقاً لرقم هيدروجيني pH منتقى. عادة ما تكون المستحضرات السائلة أسهل في تحضيرها من الجلات gels، والتركيبات اللزجة الأخرى، والتركيبات الصلبة. بصورة إضافية، تكون التركيبات السائلة أكثر ملائمة إلى حد ما في الإعطاء، وخصوصاً بالحقن. يمكن صياغة التركيبات اللزجة، من ناحية أخرى، في نطاق مدى اللزوجة المناسبة لتوفير فترات تلامس أطول مع أنسجة معينة. يمكن أن تتضمن التركيبات السائلة أو اللزجة مواد حاملة، يمكن أن تكون مذيب أو وسط تشتيت يتضمن، على سبيل المثال، ماء، محلول ملحي، محلول ملحي منظم بفوسفات phosphate، عديد الهيدروكسيل polyol (على سبيل المثال، جليسيرول glycerol، بولي إيثيلين جليكول polyethylene glycol، بولي إيثيلين جليكول سائل liquid polyethylene glycol، وما شابه ذلك) وخليط مناسبة منها.

يمكن تحضير المحاليل المعقمة القابلة للحقن بإدراج الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً المستخدمة في تطبيق الاختراع الحالي بالكمية المطلوبة من المذيب المناسب مع كميات متنوعة من المكونات الأخرى، حسب الحاجة. ويمكن أن تكون مثل هذه التركيبات في مزيج مع مادة حاملة، أو مخفف، أو سواغ مناسبة مثل ماء معقم، ومحلول ملحي فسيولوجي، وجلوكوز، ودسكتروز، أو ما شابه ذلك. يمكن تجفيف التركيبات بالتجميد. ويمكن أن تحتوي التركيبات على مواد مساعدة مثل عوامل الترطيب، أو التشتيت، أو تكوين المستحلب (على سبيل المثال، ميثيل سليولوز)، عوامل تنظيم الرقم الهيدروجيني، أو مواد إضافة لتكوين الجلات أو تحسين اللزوجة، أو مواد حافظة، أو عوامل إكساب نكهة، أو ألوان، وما شابه ذلك، بناء على مسلك الإعطاء والتحضير المطلوب. يمكن الرجوع إلى النصوص القياسية، مثل "REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985، المدرج في الطلب الحالي كمرجع، لتحضير المستحضرات المناسبة، بدون تجارب لا داعي لها.

يمكن إضافة مواد الإضافة المتنوعة التي تحسن من ثبات وتعقيم التركيبات، بما في ذلك المواد الحافظة المضادة للميكروبات antimicrobial، ومضادات الأكسدة antioxidants، والعوامل الخالبة chelating agents، والمحاليل المنظمة buffers. ويمكن ضمان الوقاية من تأثير الكائنات الحية الدقيقة بواسطة عوامل متنوعة مضادة للبكتيريا antibacterial ومضادة للفطريات antifungal، على سبيل المثال، بارابينات parabens، وكلورو بيوتانول chlorobutanol، وفينول phenol، وحمض سوربيك sorbic acid، وما شابه ذلك. يمكن تحقيق الامتصاص المطول للصورة الصيدلانية القابلة للحقن باستخدام عوامل تأخير الامتصاص، على سبيل المثال، أحادي ستيريات الألومنيوم aluminum monostearate والجيلاتين. ومع ذلك، طبقاً للاختراع الحالي، يمكن أن تكون أية مادة ناقلة، أو عامل تخفيف، أو مادة إضافة، مستخدمة متوائمة مع الخلايا المخددة للمناعة المعدلة وراثياً أو أسلافها. ٥ ١٠

يمكن أن تكون التركيبات متساوية التوتر السطحي، أي، يمكن أن يكون لها نفس الضغط الأسموزي كمائع الدم والدمعي. يمكن تحقيق تساوي التوتر السطحي المطلوب للتركبات من هذا الاختراع باستخدام كلوريد الصوديوم sodium chloride، أو عوامل أخرى مقبولة صيدلانياً مثل دكستروز dextrose، أو حمض بوريك boric acid، أو طرطرات الصوديوم sodium tartrate، أو جليكول بروبيلين propylene glycol أو ذوابات غير عضوية أو عضوية أخرى. ١٥ يفضل كلوريد الصوديوم Sodium chloride بصفة خاصة لمحاليل التنظيم التي تحتوي على أيونات الصوديوم sodium ions.

يمكن الإبقاء على لزوجة التركيبات حسب الرغبة عند مستوى منتقى باستخدام عامل تغليظ القوام المقبول صيدلانياً. ويفضل ميثيل سليلوز لأنه متاح بسهولة ومتوفر تجارياً ويسهل العمل معه. وتتضمن عوامل تغليظ القوام المناسبة الأخرى، على سبيل المثال، صمغ زنتان xanthan gum، ٢٠ كاربوكسي ميثيل السليلوز carboxymethyl cellulose، هيدروكسي بروبيل السليلوز hydroxypropyl cellulose، كربومير carbomer، وما شابه ذلك. يعتمد التركيز المفضل لعامل تغليظ القوام على العامل المنتقى. تتمثل النقطة المهمة في استخدام المقدار الذي يحقق اللزوجة المنتقاة. ومن الواضح، أن اختيار المواد الحاملة المناسبة وغيرها من المواد المضافة يعتمد ٢٥ على المسلك الصحيح من الإعطاء وطبيعة شكل الجرعات المعينة، على سبيل المثال، شكل

الجرعات السائلة (على سبيل المثال، ما إذا كان المطلوب صياغة التركيبة في محلول، معلق، أو جل أو صورة سائلة أخرى، مثل صورة زمن الإطلاق أو صورة مملوءة بالسائل).

يذكر أولئك المتمرسون في المجال أنه ينبغي انتقاء مكونات التركيبة بحيث تكون خاملة كيميائياً وأنها لن تؤثر على حيوية أو فعالية الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً طبقاً لما تم وصفه في الاختراع الحالي. ولن يحدث هذا أية مشكلة لدى أولئك المتمرسين في المجالات الكيميائية والصيدلانية، أو يمكن تجنب المشاكل بسهولة بالرجوع إلى النصوص القياسية أو بالتجارب البسيطة (التي لا تتضمن التجارب التي لا داعي لها)، من هذا الكشف والوثائق المنوه بها في الطب الحالي.

يكن أحد الاعتبارات التي تتعلق بالاستخدام العلاجي للخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً وفقاً للاختراع في كمية الخلايا الضرورية لتحقيق تأثير أمثل. يمكن أن تتفاوت كمية الخلايا المطلوب إعطاؤها للخاضع الجاري علاجه. وفي أحد النماذج، يتم إعطاء ما يتراوح بين ١٠ ٤ إلى ١٠ ١٠ بين ١٠ ٥ إلى ١٠ ٩، أو بين ١٠ ٦ و ١٠ ٨ من الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً وفقاً للاختراع إلى خاضع من البشر. يمكن إعطاء الخلايا الأكثر فعالية بأعداد أصغر كذلك. في بعض النماذج، يتم إعطاء على الأقل حوالي ١٠×١، ١٠×٢، ١٠×٣، ١٠×٤، ١٠×٥ و ١٠×٨ من الخلايا المخمدة للمناعة المعدلة وراثياً وفقاً للاختراع إلى خاضع من البشر. يمكن أن يكون التحديد الدقيق لما يمكن اعتباره جرعة فعالة مبنياً على عوامل فردية وفقاً لكل خاضع، بما في ذلك حجم، وعمر، وجنس، ووزن وحالة الخاضع المعين. يمكن التأكيد على الجرعات بسهولة من قبل أولئك المتمرسين في مجال من هذا الكشف والمعرفة في الفن.

بمقدور الحاذق المتمرس أن يحدد بسهولة مقدار الخلايا والمواد المضافة الاختيارية، المواد الناقلة، و/ أو المادة الحاملة في التركيبات والمطلوب إعطاؤها في طرق من الاختراع. نمطياً، توجد أية مواد إضافية (بالإضافة إلى الخلية (الخلايا) النشطة و/أو العامل (العوامل)) بكمية تتراوح من ٠,٠٠١ إلى ٥٠% (بالوزن) محلول في محلول ملحي منظم بفوسفات، ويكون المكون النشط موجود في حدود ميكرو جرامات إلى مليجرامات، مثل حوالي ٠,٠٠٠١ إلى حوالي ٥ % بالوزن، على نحو مفضل حوالي ٠,٠٠٠١ إلى حوالي ١ % بالوزن، على نحو مفضل أكثر كذلك حوالي ٠,٠٠٠١ إلى حوالي ٠,٠٥ % بالوزن أو حوالي ٠,٠٠١ إلى حوالي ٢٠ % بالوزن، على نحو مفضل حوالي

٠,٠١ إلى حوالي ١٠ % بالوزن، وعلى نحو مفضل أكثر كذلك حوالي ٠,٠٥ إلى حوالي ٥ % بالوزن. بطبيعة الحال، بالنسبة إلى أية تركيبة مطلوب إعطاؤها إلى حيوان أو إنسان، وبالنسبة لأية طريقة إعطاء معينة، يفضل أن يتم تحديد لها: السمية، مثل بواسطة تحديد الجرعة المهلكة (LD) و LD50 في نموذج حيوان مناسب على سبيل المثال، قارض مثل الفأر؛ و، جرعات التركيبية (التركيبات) ، تركيز المكونات فيها وتوقيت إعطاء التركيبية (التركيبات) ، التي تحفز استجابة مناسبة. لا تتطلب مثل هذه التحديدات تجارب لا داعي لها من معرفة الحاذق المتمرس، يمكن التأكيد من هذا الكشف والوثائق المقتبس منها. و، زمن الإعطاءات التتابعية دون تجارب لا داعي لها.

طرق العلاج

- ١٠ يتم في الطلب الحالي تقديم طرق لعلاج الأورام لدى خاضع. أيضاً يتوقع في الطلب الحالي طرق لعلاج عدوى ممرضة أو مرض معدي آخر لدى خاضع، مثل خاضع من البشر معرض مناعياً. تتضمن الطرق إعطاء خلية T ، خلية NK ، أو خلية CTL من الاختراع بكمية فعالة لتحقيق التأثير المطلوب، ليكون مثلاً تخفيف حالة موجودة أو الوقاية من انتكاس. للمعالجة، تمثل الكمية المعطاة كمية فعالة في إحداث التأثير المطلوب. يمكن توفير كمية فعالة في إعطاء واحد أو سلسلة من الإعطاءات. ويمكن توفير كمية فعالة في جرعة كبيرة أو بواسطة الإرواء المتواصل.
- ١٥ تعد "الكمية الفعالة" (أو، "الكمية الفعالة علاجياً") كمية كافية لإحداث نتيجة إكلينيكية مفيدة أو مطلوبة عند المعالجة. يمكن إعطاء الكمية الفعالة إلى خاضع في جرعة واحدة أو أكثر من الجرعات. من حيث المعالجة، تكون الكمية الفعالة هي الكمية الكافية لتخفيف، تهدئة، تثبيت، عكس أو إبطاء تطور المرض، أو تخفيض بطريقة أخرى عواقب المرض. يتم تحديد الكمية الفعالة بصفة عامة بواسطة الطبيب على أساس حالة تلو الحالة ويكون ذلك في نطاق مهارة الشخص المتمرس في المجال. يتم نمطياً أخذ العديد من العوامل في الاعتبار عند تحديد جرعات مناسبة لتحقيق الكمية الفعالة. تتضمن هذه العوامل عمر الخاضع، وجنسه ووزنه، والحالة المطلوب علاجها، وحدة الحالة والصورة والتركيز الفعال للشظية الرابطة لمولد الضد المعطى.
- ٢٠

للعلاج المناعي التكميلي باستخدام خلايا T محددة لمولد الضد , يتم تسريب جرعات الخلايا في مدى ١٠-١٠-١٠ (على سبيل المثال, ١٠ ٩) نمطياً . عند إعطاء خلايا معدلة وراثياً في العائل والتمايز التالي, يتم حث خلايا T التي تكون موجهة تحديداً ضد مولد الضد المحدد.

يمكن أن يتضمن "حث" خلايا T إيقاف تنشيط خلايا T المحددة بمولد الضد مثلاً بواسطة الحذف أو أنرجي. إيقاف التنشيط يكون مفيداً بصفة خاصة لتثبيت أو إعادة تثبيت الاحتمال مثلاً في اضطرابات مناعة ذاتية. يمكن إعطاء الخلايا المعدلة بواسطة أية طريقة معروفة في المجال بما في ذلك, ولكن ليس على سبيل الحصر, في الوريد , تحت الجلد subcutaneous, في العقد intranodal, في الورم intratumoral, في الغمد intrathecal, داخل الجنبه intrapleural , في الغشاء البريتوني intraperitoneal ومباشرة في الغدة الدرقية directly to the thymus.

١٠ الطرق العلاجية

يقدم الاختراع طرق لزيادة استجابة مناعية لدى خاضع في حاجة إلى ذلك. في أحد النماذج, يقدم الاختراع طرق لعلاج أو الوقاية من الأورام لدى خاضع. يقدم الاختراع علاجات تكون مفيدة على وجه الخصوص لعلاج خاضعين يعانون من أنواع من سرطان الدم (على سبيل المثال اللوكيميا, الأورام اللمفاوية, و الأورام النخاعية) أو سرطان المبيض, التي لا تكون قابلة للتدخلات العلاجية التقليدية. يتضمن الخاضعون المناسبون من البشر للعلاج نمطياً مجموعتي معالجة يمكن التمييز بينهما بواسطة المعايير الإكلينيكية. يتمثل الخاضعون الذين يعانون من "مرض متقدم" أو "حمل ورم عالي" في أولئك الذين يحملون ورم قابل للقياس إكلينيكيًا. يكمن الورم القابل للقياس إكلينيكيًا في ذلك الذي يمكن كشفه على أساس كتلة الورم (على سبيل المثال, بالجس, بالمسح بـ CAT, بالموجات الصوتية, التصوير الشعاعي للثدي أو أشعة إكس؛ ولا تكون المرقمات الحيوية الكيميائية الموجبة أو المرضية النسيجية في حد ذاتها كافية لتمييز هذه المجموعة). ويتم إعطاء تركيبة صيدلانية متضمنة في هذا الاختراع إلى هؤلاء الخاضعين لحفز استجابة مضادة للورم, بهدف تلطيف حالتهم. من الناحية المثالية, يحدث تخفيض في كتلة الورم كنتيجة لذلك, ولكن يشكل أي تحسن إكلينيكي فائدة. يتضمن التحسين الإكلينيكي خطر أو معدل تطور منخفض أو تخفيض في النتائج المرضية للورم.

تكون المجموعة الثانية من الخاضعين المناسبين معروفة في المجال باسم "مجموعة مساعدة". ويتمثل هؤلاء في الأفراد الذين لديهم تاريخ من الإصابة بورم جديد، ولكن كانوا مستجيبين لطريقة علاج أخرى. ويمكن أن يتضمن العلاج السابق، ولكن لا يقتصر على ذلك، استئصال جراحي وعلاج إشعاعي، وعلاج كيميائي تقليدي. كنتيجة لذلك، لا يعاني هؤلاء الأفراد من ورم قابل للقياس إكلينيكيًا. ومع ذلك، فإنه يشك في أنهم على خطر تطور المرض، إما قريباً من موضع الورم الأصلي، أو بأورام نقيلية. ويمكن تقسيم هذه المجموعة بصورة إضافية فرعياً إلى أفراد على خطر مرتفع وعلى خطر منخفض. يتم التقسيم الفرعي على أساس السمات الملحوظة قبل أو بعد العلاج الأولي. وتعرف هذه السمات في الفنون الإكلينيكية، وتكون معرفة على نحو مناسب لكل ورم جديد مختلف. وتكون السمات النمطية للمجموعات الفرعية ذات الخطر العالي تلك التي يكون فيها الورم قد اخترق الأنسجة المجاورة، أو التي تظهر تضمينا للعقد اللمفاوية.

هناك مجموعة أخرى لديها استعداد وراثي مسبق للإصابة بورم جديد ولكن لم تظهر بعد أي آثار إكلينيكية على وجود ورم جديد. على سبيل المثال، النساء اللاتي تبدي نتيجة إيجابية للاختبار لتطهير وراثي مرتبط بسرطان الثدي، ولكن لا تزال في عمر يسمح لها بالحمل، يمكن أن ترغب في تناول واحد أو أكثر من الأجزاء الرابطة لمولد الضد الموصوف في الطلب الحالي في علاج على نحو وقائي لمنع حدوث ورم جديد حتى يكون مناسباً لإجراء جراحة وقائية.

يكون الخاضعون من البشر المصابين بورم جديد ممن لديهم أي من الأورام الجديدة التالية:

ورم أرومي دبقي glioblastoma ، سرطان الجلد melanoma ، ورم أرومي عصبي neuroblastoma ، ورم سرطاني غدي adenocarcinoma ، ورم دبقي glioma ، وسركوما نسيج رخو soft tissue sarcoma ، وأورام سرطانية various carcinomas متنوعة (بما في ذلك سرطان البروستاتا prostate والرئة لخلية صغيرة cell lung cancer) خاضعين مناسبين بصفة خاصة. وتتضمن الأورام السرطانية المناسبة أيضاً أي أورام معروفة في مجال الأورام، بما في ذلك ولكن ليس على سبيل الحصر، ورم الخلايا النجمية astrocytoma ، ورم سرطاني ليفي fibrosarcoma ، ساركومة مخاطية myxosarcoma ، ساركومة دهنية liposarcoma ، ورم الدبقيات القليلة التغصن oligodendroglioma ، ورم بطاني عصبي ependymoma ، ورم أرومي نخاعي medulloblastoma (في المخيخ)، بدائية ورم الأدمة العصبية primitive

- ، chondrosarcoma عُضْرُوفِيَّةٌ ساركومة (PNET) neural ectodermal tumor ،
الساركوما المكونة للعظم osteogenic sarcoma ، السركومة الغدية القنوية البنكرياسية
pancreatic ductal adenocarcinoma ، الأورام السرطانية الغدية للثة للخلية الصغيرة
والكبيرة small and large cell lung adenocarcinomas ، وَرْمٌ حَبْلِيّ chordoma ،
ساركومةٌ وَعَائِيَّةٌ angiosarcoma ، ساركومة بطانية endotheliosarcoma ، وسرطان الخلايا ٥
الحرشفية squamous cell carcinoma ، ورم سرطاني بالقصبات
bronchoalveolarcarcinoma ، ورم سرطاني غدي ظهاري epithelial
adenocarcinoma ، والورم النقيلي الكبدي liver metastases thereof منها، ساركومة
وَعَائِيَّةٌ لِمَفِيَّةٌ lymphangiosarcoma ، ساركومةٌ بِطَانَةِ الأَوْعِيَةِ اللَّمْفِيَّةِ
lymphangioendotheliosarcoma ، وَرْمٌ كَبِدِيّ hepatoma ، سَرَطَانَةُ الأَفْنِيَةِ الصَّفْرَاوِيَّةِ ١٠
cholangiocarcinoma ، ورم زليلي synovioma ، ورم الظهارة المتوسطة mesothelioma
، ورم Ewing ، سركومة العضلية المخططة rhabdomyosarcoma ، ورم سرطان القولون
colon carcinoma ، ورم سرطان الخلايا القاعدية basal cell carcinoma ، وسرطان الغدة
العرقية sweat gland carcinoma ، والسرطان الحليمي papillary carcinoma ، وسرطان
الغدة الدهنية sebaceous gland carcinoma ، وورم سرطان غدي حليمي papillary ١٥
adenocarcinoma ، وورم سرطان غدي كيسي cystadenocarcinoma ، وورم سرطان
نخاعي medullary carcinoma ، وورم سرطان قصبي المنشأ bronchogenic carcinoma
، وورم سرطان الخلايا الكلوية renal cell carcinoma ، وورم سرطان القناة الصفراوية bile
duct carcinoma ، وورم سرطان المشيمة choriocarcinoma ، ورم منوي، ورم سرطاني
جنيني seminoma, embryonal carcinoma ، ورم Wilms ، ورم الخصية testicular ٢٠
tumor ، ورم أرومي نخاعي medulloblastoma ، ورم قحفي بلعومي
craniopharyngioma ، ورم بطاني عصبي ependymoma ، ورم الغدة الصنوبرية
pinealoma ، ورم أرومي وعائي دموي hemangioblastoma ، ورم العصب السمعي
acoustic neuroma ، ورم الدبقيات القليلة التغصن oligodendroglioma ، ورم سحائي
meningioma ، ورم أرومي عصبي neuroblastoma ، ورم أرومي شبكي ٢٥
retinoblastoma ، وسرطان الدم leukemia ، الورم النخاعي المتعدد multiple myeloma

، ورم وُجُودُ الجلوبولينِ الكَبْرُويِّ بِالْدَمِ Waldenstrom's macroglobulinemia ، وداء السلسلة الثقيلة heavy chain disease ، وأورام الثدي breast tumors مثل الورم السرطاني الغدي القنوي والفصي ductal and lobular adenocarcinoma ، أورام السرطان للخلايا الحرشفية squamous والغدية لعنق الرحم adenocarcinomas، وعنق الرحم uterine cervix وأورام سرطان ظهارية بالمبيض ovarian epithelial carcinomas ، وورم سرطان غدي بالبروستاتا prostatic adenocarcinomas ، وورم سرطان خلية حرشفية انتقالية في المثانة transitional squamous cell carcinoma of the bladder ، أورام لمفاوية لخلية B و T cell lymphomas (nodular and diffuse) (عقدي ومنتشر) لورم خلايا بلازما plasmacytoma ، اللوكيميا الحادة والمزمنة acute and chronic leukemias ، وسرطان الجلد الخبيث malignant melanoma ، الأورام اللحمية للأنسجة الرخوة soft tissue sarcomas وأورام ساركومة عَضَلِيَّةٌ مُلَسَاءٌ leiomyosarcomas .

يمكن أن يعاني الخاضعون من صورة متقدمة من المرض، وفي هذه الحالة يمكن أن يتضمن هدف العلاج تخفيف أو عكس تطور المرض، و/ أو تخفيف الآثار الجانبية. يمكن أن يعاني الخاضعون من تاريخ إصابة بالحالة، التي يعالجون منها بالفعل، وفي مثل هذه الحالة يتضمن الهدف العلاجي نمطياً تخفيض أو تأخير خطر حدوث انتكاس.

وبناء عليه، يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو الوقاية من تكوّن الأورام الخبيثة لدى خاضع، تشتمل الطريقة على إعطاء كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تشتمل على مستقبل يربط مولد ضد الورم وينشط الخلية المخددة للمناعة (على سبيل المثال، TCR ، CAR) وناقل يشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة (scFv) التي تربط مولد الضد له نشاط مخمد للمناعة (على سبيل المثال، CD47 ، CTLA-4 ، PD-1، ومركبات ترابطية منها). في أحد النماذج، تكون الأورام منتقاة من المجموعة التي تتكون من أنواع سرطان الدم (على سبيل المثال اللوكيميا، الأورام اللمفاوية، و الأورام النخاعية)، سرطان المبيض، سرطان البروستاتا، سرطان الثدي، سرطان المثانة، سرطان المخ، سرطان القولون، سرطان الأمعاء، سرطان الكبد، سرطان الرئة، سرطان البنكرياس، سرطان البروستاتا، سرطان الجلد، سرطان المعدة، ورمّ أروميّ دَبَقِيّ، وسرطان الحلق. في نموذج آخر، مولد ضد الورم يكون واحد أو أكثر من أنهيدراز كربوني (CAIX) (IX)، مولد الضد سرطاني جنيني

(CEA) ، CD34 ، CD33 ، CD30 ، CD22 ، CD20 ، CD19 ، CD10 ، CD7 ، CDS ،
CD38 ، CD41 ، CD44 ، CD49f ، CD56 ، CD74 ، CD133 ، CD138 ، الخلية المصابة
بالعدوى من مولد ضد الفيروس المضخم للخلايا (CMV) (على سبيل المثال، خلية مولد ضد
السطح)، بروتين سكري ظهاري-٢ (EGP-2)، بروتين سكري ظهاري epithelial
glycoprotein -٤٠ (EGP-40)، جزيء التصاق خلية ظهارية (EpCAM)، إنزيمات كيناز
بروتين تيروسين tyrosine-protein kinases المستقبل erb-B2,3,4، بروتين رابط فولات
(FBP) folate، مستقبل أسيتيل كولين جنيني (AChR) fetal acetylcholine receptor،
مستقبل فولات-ألفا ، (Ganglioside G2 (GD2) ، Ganglioside G3 (GD3) ، مستقبل عامل
نمو ظهاري بشري ٢ (HER-2)، إنزيم ترانسكريباز عكسي تيلوميراز بشري human
telomerase reverse transcriptase (hTERT) ، وحدة فرعية لمستقبل إنترليوكين
Interleukin -١٣ ألفا-٢ (IL-13R α 2) ، سلسلة خفيفة ألفا، مستقبل نطاق وليجة كيناز
kinase insert domain receptor (KDR) ، Lewis Y (LeY) ، جزيء التصاق خلية
L1 adhesion molecule (L1CAM) ، عائلة مولد ضد لورم ميلانيني melanoma
antigen family أ (MAGE-A1) 1 ، Mucin 16 (MUC16) ، Mucin 1 (MUC1) ،
Mesothelin (MSLN) ، المركبات الترابطية NKG2D ligands ، NY-ES0-1 لمولد ضد
سرطان الخصية cancer-testis antigen ، مولد ضد ورمي جنيني oncofetal antigen
(h5T4) ، مولد ضد خلية جذعية للبروستاتا prostate stem cell antigen (PSCA) ، مولد
ضد غشاء محدد بالبروستاتا prostate-specific membrane antigen (PSMA) ، بروتين
سكري مرتبط بالورم tumor-associated glycoprotein ٧٢ (TAG-72) ، عامل نمو بطاني
وعائي vascular endothelial growth factor R2 (VEGF-R2) ، أو بروتين ورم Wilms
(WT-1).

كنتيجة للتعبير عند السطح عن مستقبل يربط مولد ضد الورم وينشط الخلية المخددة للمناعة (على
سبيل المثال، TCR ، CAR) وناقل يشفر شظية متغيرة ذات سلسلة مفردة (scFv) يرتبط بمولد
ضد له نشاط مخمد للمناعة (على سبيل المثال، CD47 ، PD-1 ، CTLA-4) ، ومركبات ترابطية
منها)، يتم تزويد خلايا Tor NK بشرية منقولة على نحو انتقائي بفعالية حالة للخلايا معززة

وانتقائية عند موضع الورم. علاوة على ما سبق، عقب تحديد الموقع بالنسبة للورم أو العدوى الفيروسية وتكاثرها، تحول خلايا T مشتركة التحفيز التي تعبر عن المركب الترابطي أو موضع العدوى الفيروسية إلى وسط موصل بدرجة عالية لمدى واسع من الخلايا المناعية المتضمنة في الاستجابة الفسيولوجية المضادة للورم أو المضادة للفيروس (خلايا لمفاوية تخترق الورم، خلايا NK-، خلايا NKT-، الخلايا الشجرية، والملتهفات الكبيرة).

في نماذج أخرى، يقدم الاختراع طرق لعلاج خاضعين يعانون من عدوى ممرضة (على سبيل المثال، عدوى فيروسية، عدوى بكتيرية، عدوى فطرية، عدوى طفيلية، أو عدوى بالخلايا الأولية). يكون الاختراع مفيداً على وجه الخصوص لتحسين استجابة مناعية في خاضع معرض مناعياً. تتضمن حالات العدوى الفيروسية التمثيلية القابلة للمعالجة باستخدام طريقة من الاختراع، ولكن ليس على سبيل الحصر، حالات العدوى بالفيروس المضخم للخلايا (CMV)، فيروس Epstein Barr (EBV)، فيروس نقص المناعة البشري (HIV)، وفيروس الأنفلونزا.

وبناء عليه، يقدم الاختراع طريقة لعلاج أو الوقاية من عدوى ممرضة لدى خاضع، تشتمل الطريقة على إعطاء كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة وفقاً لما تم وصفه في الطلب الحالي.

مجموعات العلاج

يقدم الاختراع مجموعات العلاج لمعالجة أو الوقاية من تكوّن الأورام الخبيثة، عدوى ممرضة، اضطراب مناعي أو غريسة خفيفة. في أحد النماذج، تتضمن المجموعة العلاجية تركيبية علاجية أو وقائية تحتوي على كمية فعالة من خلية مستجيبة للمناعة تشتمل على تنشيط مستقبل مولد الضد وشظية متغيرة ذات سلسلة مفردة (SCFV) ترتبط بمولد ضد له نشاط مخمد للمناعة في صورة وحدة جرة. في نماذج معينة، تتضمن الخلايا كذلك مركب ترابطي مشترك التحفيز. في بعض النماذج، تتضمن المجموعة العلاجية حاوية معقمة تحتوي على لقاح علاجي أو وقائي يمكن أن تكون الحاويات المذكورة صناديق، أمبولات، زجاجات، قوارير، أنابيب، حقائب، أكياس، عبوات فقاعية، أو صور أخرى مناسبة للحاويات معروفة في المجال. يمكن أن تكون الحاويات المذكورة مصنوعة من بلاستيك، زجاج، ورق رقائقي، ملف معدني، أو مواد أخرى مناسبة لاحتواء الأدوية.

في حالة الرغبة في ذلك يتم توفير الخلية المخمدة للمناعة إلى جانب تعليمات لإعطاء الخلية إلى خاضع يعاني من أو على خطر الإصابة بتكوّن الأورام الخبيثة، عدوى ممرضة، اضطراب مناعي أو غريسة خَفِيَّة. تتضمن التعليمات بصفة عامة معلومات حول استخدام التركيبة لمعالجة أو الوقاية من الأورام، عدوى ممرضة، اضطراب مناعي أو غريسة خَفِيَّة. في نماذج أخرى، تتضمن التعليمات واحد على الأقل من التالي: وصف العامل العلاجي؛ الجدول الزمني للجرعات وإعطاء للمعالجة أو الوقاية من تكوّن الأورام الخبيثة، عدوى بكائن ممرض، اضطراب مناعي أو غريسة خَفِيَّة أو أعراضها؛ تنبيهات؛ تحذيرات؛ مؤشرات؛ بيانات مضادة؛ معلومات الجرعة الزائدة؛ ردود الفعل غير الملائمة؛ الأدوية المتعلقة بالحيوان؛ الدراسات الإكلينيكية؛ و / أو المراجع. يمكن طباعة التعليمات مباشرة على الحاوية (عندما تكون موجودة)، أو في صورة ملصق موضوع على الحاوية، أو في صورة ورقة منفصلة، كتيب، بطاقة، أو مجلد يتم الإمداد به في أو مع الحاوية. ٥ ١٠

الأمثلة

تستخدم عملية تطبيق الاختراع الحالي، ما لم يتم تحديد خلاف ذلك، تقنيات تقليدية للبيولوجيا الجزيئية (بما في ذلك تقنيات ناتج عودة الاتحاد الجيني)، والبيولوجيا الدقيقة، وبيولوجيا الخلايا، والكيمياء الحيوية وعلم المناعة، التي تكون معلومة جيداً في نطاق الحاذق المتمرس في الفن. ويتم شرح مثل هذه التقنيات بالكامل في المراجع، مثل، "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991) تكون هذه التقنيات قابلة للتطبيق على إنتاج البولي نيوكليوتيدات وبولي ببتيدات من الاختراع، وبناء عليه، يمكن وضعها في الاعتبار في تحضير وتطبيق الاختراع. وسيتم شرح التقنيات المفيدة على وجه الخصوص لنماذج معينة في الأقسام التالية. ١٥ ٢٠ ٢٥

يتم ذكر الأمثلة التالية لتزويد أولئك ذوي المهارة العادية في المجال بكشف ووصف كاملين لكيفية تحضير واستخدام الاختبار، والفحص، والطرق العلاجية من الاختراع، وليس المقصود منها أن تحد من نطاق ما يعتبره المخترعون اختراعاً لهم.

المثال ١. خلايا T تقوم بالتعبير المشترك عن مستقبل مولد الضد الخيمري (CAR) وأورام مستأصلة مضادة لـ SCD47 scFv.

تم توليد scFv ترتبط تحديداً خلايا CD47 البشرية وأظهرت خلايا T للدم الطرفي البشري معدلة بـ scFv المذكورة وCAR التي تتعرف على مولد ضد الورم (CD19)، فعالية مضادة للورم في المعمل فضلاً عن فعالية محسنة مضادة للورم في نموذج قبل إكلينيكي.

تم توليد البنيات التي تشتمل على 1928z-2A-B6H12.2 (الأشكال ١-٥) في صورة مؤكدة بواسطة عمل متواليات من CAR ومتواليات scFv . بالإضافة إلى ما سبق، تم توليد البنيات المقارنة باستخدام CAR محدد لسرطان المبيض مولد الضد، MUC-CD، الذي يطلق عليه H1128z4 (الشكل ٦). تم توليد سلالات الخلايا المنتجة الثابتة للبنيات باستخدام متواليات الرائد Kappa، وتم التحقق منها بقياس تدفق الخلايا (الشكل ٧أ). أمكن أن يقوم المحلول الطافي من سلالات خلايا التعبئة، الذي يحتوي على مضاد CD47 scFv- المفرزة بإعاقة الجسم المضاد CD47 عن الارتباط بخلايا الورم Nalm-6 و Raji في اختبار أساسه قياس تدفق الخلايا. تم كذلك تبقيع خلايا الورم التي تمت حضانتها باستخدام المحلول الطافي من خلايا التعبئة أيضاً باستخدام جسم مضاد لبطاقة مضادة لـ c-myc، لإظهار ارتباط scFv (الشكل ٧ب).

تم استخدام خلايا التعبئة لتحويل خلايا T للدم الطرفي البشري حيث تم تقييم كفاءة التحويل بواسطة قياس تدفق الخلايا تحليل للتعبير عن CAR (الشكل ٨أ). أمكن أن تعمل scFv المفرزة بطريقة ذاتية، حيث يكون الجسم المضاد لـ CD47 قد خفض الارتباط بخلايا 1928z-2A-B6H12.2 T مقارنة بخلايا T 1928z. أظهر التبقيع الموجب بالجسم المضاد لبطاقة مضادة لـ c-myc scFv مرتبط (الشكل ٨ب). تم بحث النمط الظاهري لخلايا T التي تم تحويلها من خلال قياس تدفق الخلايا وبدا أنها متماثلة بين خلايا 1928z-2A-B6H12.2 و T 1928z، باستثناء CD62L، والتي تبين أنها تنخفض على T 1928z-2A-B6H12.2 (الشكل ٩أ). وتم بحث

وظيفة خلايا T التي تنتج المضاد لـ CD47 scFv باستخدام قياس تدفق الخلايا متعدد المتغيرات واختبار إطلاق 51Cr القياسي. وقد تبين أن خلايا T 1928z-2A-B6H12.2 تتسم بإنتاج سيتوكين مكافئ ووظيفة سامة للخلايا عند المقارنة بخلايا T 1928z (الأشكال ٩ب و ٩ج).

تم بحث قدرة خلايا T 1928z-2A-B6H12.2 على الاستجابة للورم في الكائن الحي باستخدام نموذج فأر SCID-Beige قبل الإكلينيكي. تم حقن فئران SCID-Beige في الوريد بـ 10×10^6 من خلايا ورم Nalm-6 معدلة للتعبير عن إنزيم لوسيفيراز luciferase ذبابة النار، وتمت معالجة الفئران بعد ذلك بثلاثة أيام بـ $5,7 \times 10^6$ من خلايا CAR+ 1928z أو 1928z-2A-B6H12.2 أو control 4H1128z-2A-B6H12.2، كذلك في الوريد. تمت مراقبة تطور الورم إكلينيكيًا وباستخدام التصوير الومضي الحيوي. أدت معالجة الفئران التي تحمل الورم بخلايا T 1928z-2A-B6H12.2 إلى تخفيض حمل الورم وتحسين بقاء الفئران التي تحمل الورم مقارنة بالمعالجة بخلايا T 1928z (الأشكال ١٠أ و ١٠ب).

المثال ٢. خلايا T تقوم بالتعبير المشترك عن مستقبل مولد الضد الخيمري (CAR) ومضاد PD-1 بشري scFv زاد من التكاثر وحافظ على التعبير عن CAR.

تم توليد PD-1 scFv مضاد للبشر بناء على سلاسل VH و VL من جسم مضاد لـ (النسيلة 5C4) (البراءة الأمريكية رقم 8,008,449). تم تصميم 5C4 scFv ليتضمن متواليات رائد كبا، رابط جليسين سيرين وبطاقة c-myc (الشكل ١١). وتم استنساخ بنية scFv المذكورة في السلسلة الرئيسية للفيروس الارتجاعي SFG لتوليد 1928z-2A-5C4 و 4H1128z-2A-5C4 (الأشكال ١٢ و ١٣). لتطوير scFv ذات ألفة عالية ترتبط بـ PD-1 بشري (على سبيل المثال، للتعبير في خلية CART 1928z/4H1128z)، ويتم فحص مجموعة عرض ملتزمة جسم مضاد بشري لتحديد scFvs التي ترتبط تحديداً بـ PD-1 بشري (ومن المحتمل PD-1 من الفأر). تم إنتاج سلالات خلية تعبئة 293Glv9 ثابتة وتم تقييم التعبير عن CAR 1928z و 4H1128z CAR من خلال قياس تدفق الخلايا (الشكل ١٤). تم استخدام المحلول الطافي من خلايا التعبئة هذه لتحويل الطاقة لخلايا T مجمعة من الدم الطرفي البشري وتم تقييم فعالية تحويل الطاقة من خلال قياس تدفق الخلايا لكشف التعبير عن CAR (الشكل ١٥).

تم بحث قدرة PD-1 scFv هذا المضاد للبشر لزيادة تكاثر خلايا T استجابة لخلايا تقديم مولد الضد الصناعي (aAPCs). تم توليد خلايا ورم موجبة لـ PD-L1 و 3T3 aAPCs للدراسة (الشكل ١٦). عقب المزرعة المشتركة لخلايا T التي تم تحويل طاقتها بـ 3T3 aAPCs يعبر عن CD19 بشري، وزادت B7.1 بشري، PD-L1 بشري، وخلايا T 1928z-2A-C4 بشرية من التكاثر واحتفظ بالتعبير عن CAR مقارنة بخلايا T 1928z (الشكل ١٧). يمكن تحديد النمط الظاهري والوظيفة المضادة للورم لخلايا T ذات التعبير المشترك عن CAR 1928z والمضادة لـ PD1 scFv باستخدام قياس تدفق الخلايا، وإضافة اللمعة على دراسات تحليل السيتوكين، واختبارات إطلاق الكروم، ونموذج قبل الإكلينيكي لفئران SCID-Beige لتحديد الوظيفة المضادة للورم في الكائن الحي.

١٠ المثال ٣. التعبير المشترك عن مستقبل مولد الضد الخيمري (CAR) و PD-1 scFv المضاد للفأر يحفز خلايا T من الفأر.

١٥ تم توليد PD-1 scFv مضاد للفأر بناء على سلاسل VH و VL من جسم مضاد لـ (النسيلة J43) (البراءة الأمريكية رقم 7,858,746). تم تصميم J43 scFv ليتضمن متواليات رائدة لسلسلة كبا من الفأر، رابط جليسين سيرين وبطاقة c-myc (الشكل ١٨). وتم استنساخ بنية scFv المذكورة في السلسلة الرئيسية للفيروس الارتجاعي SFG التي تعبر عن CAR يستهدف CD19 بشري أو MUC-CD بشري يرسل إشارة من خلال C28 من الفأر و CD3zeta من الفأر، لذلك تحفز خلايا T من الفأر. تم استخدام هذه البنيات 19m28mz-IRES-J43 (الشكل ١٩) و 4H11m28mz-IRES-J43 (الشكل ٢٠) لتوليد سلالات خلية تعبئة Phoenix ثابتة ويعدل وراثياً خلايا T الفأرية الرئيسية، وفقاً لما تم وصفه فيما سبق (Lee et al., Cancer Res 2011, 71(8):2871). تم استنبات خلايا 19m28mz-IRES-J43 و T 19m28mz-IRES-J43 من الفأر مع خلايا ورم توتي EL4 تم تعديلها للتعبير عن CD19 بشري، و PD-L1 من الفأر، تكاثر خلايا T لمراقبة عدات الخلية الحية وترميز CFSE.

٢٥ بالنسبة لخلايا T فأرية تعبر عن CAR 4H11m28mz تستهدف مولد الضد MUC-CD، يمكن تقييم الوظيفة استجابة لخلايا ورم IDS المعدلة للتعبير عن MUC-CD و PD-L1 من الفأر (Chekmasova et al., Clin Cancer Res, 2010, 16:3594). يتم استنساخ

scFv بشري يرتبط بالجسم PD-1 الفأري، طبقاً لما تم وصفه فيما سبق، في بنيات ناقل التعبير SFG-19m28mz و 4H11m28mz وتم استخدامها لتعديل خلايا T الفأرية. تتوفر نماذج مؤازرة لتقييم تأثيرات في الكائن الحي تأثيرات مضادة للورم لخلايا T معدلة للتعبير عن scFv بشرية تربط PD-1 فأري: ونموذج ورم سرطان مبيض يستخدم خلايا ورم ID8-MUC-CD، تم تلقيحها في الغشاء البريتوني في فئران C57BL/6؛ وفئران محورة وراثياً تعبر عن CD19 بشري بدلاً من CD19 فأري، ويتم تلقيحها مع خلايا ورم توتي EL4 معدلة للتعبير عن CD19 بشري (Pegram et al., Blood 2012, 119(18):4133). وبالتالي، يمكن تقييم التأثير المضاد للورم في نموذج تنافسي مناعي، ولذلك، يسمح بتقييم تأثير المضاد لـ PD-1 scFv على الوسط الدقيق للورم.

١٠ المثال ٤. التعبير المشترك عن مستقبل مولد الضد الخيمري (CAR) و scFv المساعد في الخلايا المناعية.

في أحد النماذج، يقدم الاختراع خلية مناعية تعبر عن مستقبل رابط لمولد الضد (على سبيل المثال، CAR أو TCR) وشظية متغيرة ذات سلسلة واحدة (scFv) التي تربط مولد الضد له نشاط تحفيز مناعي مساعد (على سبيل المثال، CD28، OX-40، 4-1BB، ومركبات ترابطية منها).

١٥ لتكوين scFvs المساعدة التي تستهدف جزيء التحفيز المشترك 4-1BB، تم الحصول على سلالة خلية الورم الهجين 3H3 (Shuford et al., J Exp Med 1997, 186:47-55;) provided by Professor Mick Croft (La Jolla Institute for Allergy and Immunology). لتوليد scFvs المساعدة التي تستهدف جزيء التحفيز المشترك OX-40، تم الحصول على سلالة خلية ورم هجين OX-86 (al-Shamkhani et al., Eur J Immunol 1996, 26(8):1695-9; European Collection of Cell Cultures (Catalogue number 96110601)). تم عزل حمض mRNA للورم الهجين من الخلايا باستخدام مجموعة QIAGEN RNaseasy، طبقاً لتعليمات جهة التصنيع (QIAGEN, CA, USA)، وبعد ذلك تم تحضير cDNA باستخدام مجموعة تخليق الجديلة الأولى New England Biolabs Protoscript AMV First، طبقاً لتعليمات جهات التصنيع (New England

٢٠

(Biolabs, MA, USA). تم بعد ذلك تضخيم السلاسل الثقيلة (VH) والخفيفة (VL) للمتغير باستخدام PCR المضخم باتباع بادئات التحلل التالية:

Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1989, 86:3833-37) Orlandi بادئات

5'- tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc ttg gee cca g -3 [متوالية بهوية
رقم: ٢٨] ٥

5'- agg tsm arc tgc ags agt cwg g -3 [متوالية بهوية رقم: ٢٩]

5'- gtt aga tct cca gcttg tee c -3 [متوالية بهوية رقم: ٣٠]

5'- gac att cag ctg ace cag tct cca -3 [متوالية بهوية رقم: ٣١]

Cooper بادئات (Wang et al., Blood 2002, 99:2459-2467)

5'-GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGGRAC-3 [متوالية بهوية
رقم: ٣٢] ١٠

5'-CTCATTCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGG-3 [متوالية بهوية رقم: ٣٣];

RACE بادئات (Kettleborough et al., Eur. J Immunol 1993, 23:206-211)

Vkfr1a: Ata tee atg gca gac gtc cag atg ate cag tct cca [متوالية بهوية رقم: ٣٤]

Vkfr1b: ata tee atg gca gac att gtg ctg act cag tct cc [متوالية بهوية رقم: ٣٥] ١٥

Vkfr1c: ata tee atg gca gat gtt gtg atg ace caa act cca [متوالية بهوية رقم: ٣٦]

Vkfr1d: ata tee atg gca caa att gtt etc ace cag tct cc [متوالية بهوية رقم: ٣٧]

Vkfr1e: ata tee atg gca gac att gtg atg aca cag tct cca [متوالية بهوية رقم: ٣٨]

Vkfr1f: ata tee atg gca gat att gtg atg acg cag get gca [متوالية بهوية رقم: ٣٩]

Vkfr1g: ata tee atg gca gac att gtg atg ace cag tct c [متوالية بهوية رقم: ٤٠] ٢٠

Kappa: get tea aca gga atg agt gtt aac tcg agg tag
[٤١]

لتجميع VH و VL في scFv, تمت إضافة رابط جليسين سيرين أثناء PCR لسلاسل VH و VL, فضلاً عن بطاقة c-myc وسلسلة Ig Kappa الفأرية أو متوالية راند CDS. تم استنساخ بولي نيوكلويد الناتج في ناقل تعبير لفيروس ارتجاعي ناتج (سلسلة أساسية SFG) الذي يشفر 1928z مستقبل مولد ضد الخيمري (CAR), لتكوين SFG-1928z-2A-3H3 أو 1928z-2A-OX86.

تم توليد سلالات خلية التعبئة الثابتة طبقاً لما تم وصفه لـ scFv J43 PD-1 المضاد للفأر، وتم اختبارها في نموذج فأري مماثل من نقل خلية T انتقائي.

١٠ تشير النتائج المقدمة في الطلب الحالي إلى خلايا T معدلة وراثياً تعبر عن جزيئات scFv ("خلايا CAR T مدرعة") مخددة للمناعة ويمكن أن تتغلب على الوسط الدقيق للورم "العذائي"، وبالتالي، تكون فعالة في معالجة الورم الخبيث. يتم تعديل خلايا CAR+ T لإفراز scFvs مضادة ذات وظائف تنظيمية مناعية (الشكل ٢١). عند تنشيط CAR لتلامس مولد ضد (١)، يمكن حث خلايا T المعدلة بـ CAR لإفراز scFvs مضادة لمستقبل خلية T PD-1 التثبيطي على كل من خلايا T المعدلة بـ CAR التي تم تسريبها وخلايا T المضادة للورم داخلية المنشأ التي تحسن من وظيفة المرسل العصبي المضاد للورم (٢)، ويتم حثها لإفراز scFvs المضادة إلى مستقبل خلية T CTLA-4 التثبيطي على كل من خلايا T المعدلة بـ CAR وخلايا T المضادة للورم داخلية المنشأ التي تحسن من وظيفة المرسل العصبي المضاد للورم (٣)، أو يتم حثها لإفراز scFvs المضادة إلى مستقبل CD47 معبر عنه على خلايا الورم التي تعكس تغطية خلايا الورم من التعرف بواسطة استجابة مناعية مضادة للورم لعائل حامل تؤدي إلى التعرف واستئصال الورم بواسطة الملتهفات الكبيرة العائلة.

تم الحصول على النتائج الواردة في الطلب الحالي باستخدام الطرق والمواد التالية ما لم يتم بيان خلاف ذلك.

توليد مضاد CD47 B6H12.2 scFv

تم الحصول على سلالة الورم الهجين B6H12.2 من American Tissue Culture Collection (ATCC, VA, USA; catalogue number HB-9771). تم عزل B6H12.2 mRNA من خلايا الورم الهجين باستخدام مجموعة QIAgen RNAeasy، طبقاً لتعليمات جهة التصنيع (QIAgen, CA, USA)، وتم تحضير cDNA باستخدام مجموعة تخليق cDNA للجديلة New England Biolabs Protoscript AMV First، طبقاً لتعليمات جهة التصنيع (New England Biolabs, MA, USA). تم تضخيم السلسلة الثقيلة للمتغير (VH) والسلسلة الخفيفة للمتغير (VL) باستخدام PCR لبادئات مصممة لدمج متوالية رائد كبا، رابط جليسين سيرين وبطاقة c-myc (انظر الشكل ١) على النحو التالي:

البادئ ١. B6H12.2 VH البادئ الأمامي [متوالية بهوية رقم: ٤٢]:

5'- CCA TGG AGA CAG ACA CAC TCC TGC TAT GGG TAC TGC TGC ١٠
TCT GGG TTC CAG GTT CCA CTG GTG ACG AGG TGC TGC AGC
TGG TGG AGT CCG GGG -3'

البادئ ٢. B6H12.2 VH البادئ العكسي [متوالية بهوية رقم: ٤٣]:

5'- AGA TCC ACC TCC ACC AGA TCC ACC TCC ACC TGA TCC ACC ١٥
TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT TCC TTG ACC -3'

البادئ ٣. B6H12.2 VL البادئ الأمامي [متوالية بهوية رقم: ٤٤]:

5'- GGT GGA GGT GGA TCA GGT GGA GGT GGA TCT GGT GGA ٢٠
GGT GGA TCT GAC ATT GTG ATG ACT CAG TCT CCA GCC ACC -3'

البادئ 4. B6H12.2

٢٠ VL البادئ العكسي [متوالية بهوية رقم: ٤٥]:

5'- CTC GAG TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTG
TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC TCC ACC GAA CG-3'

بالإضافة إلى التصميم السابق، تم توليد متوالية scFv مع CD8L لتحديد متوالية رائد فعال لنقل scFv من خلايا T باستخدام البادئ الأمامي البديل التالي:

البادئ ٥. B6H12.2 VH CD8L أمامي [متوالية بهوية رقم: ٤٦]:

5'- TAT ACC ATG GCC TTA CCA GTG ACC GCC TTG CTC CTG CCG
CTG GCC TTG CTG CTC CAC GCC GCC AGG CCG GAG GTG CAG ٥
CTG GTG GAG TCC GGG -3'

تم استنساخ المنتجات VH و VL PCR في pCR2.1TOPO، طبقاً لتعليمات جهة التصنيع (Invitrogen, NY, USA). تم عمل المتواليات باستخدام بوادئ M13R2 و M13F2 (Invitrogen) بوسيلة قلب المتواليات لحمض MSKCC DNA للتأكيد على متوالية نواتج كل من VH و VL. تم إجراء PCR للتداخل باستخدام نواتج VH و VL PCR وبوادئ ١ أو ٥ و ٤ لتوليد المضاد لـ CD47 scFv (انظر الشكل ١).

تم استنساخ بنية مضادة لـ CD47 scFv في ناقل التعبير للفيروس العكسي الموجود (الجزء الأساسي لـ SFG) الذي يشفر مستقبل مولد الضد الخيمري 1928z (CAR)، لتوليد SFG-1928z-2A-B6HI2.2. تم عمل متواليات من DNA SFG-1928z-2A-B6HI2.2 للتأكيد على المتوالية.

توليد سلالة خلية تعبئة ثابتة لخلايا T بشرية

لتكوين سلالة خلية تعبئة ثابتة، تم نقل العدوى لخلايا H29 على نحو عابر باستخدام ١٠ ميكرو جرام من DNA SFG-1928z-2A-B6HI2.2 باستخدام مجموعة نقل العدوى لفوسفات الكالسيوم من Promega، طبقاً لتعليمات جهة التصنيع (Promega). تم استخدام المحلول الطافي من المحلول الطافي H29 لتحويل خلايا 293Glv9، التي تم استنساخها بعد ذلك فرعياً لتوليد خلايا تعبئة ثابتة. وكان انتقاء اثنتين من النسائل الفرعية (النسيلة ٥ والنسيلة ٦) مبنياً على التعبير عن كل من CAR 1928z وقدرة المحلول الطافي 293Glv9 على تحويل خلايا T من الدم الطرفي البشري (طبقاً لتحديد ذلك من خلال قياس تدفق الخلايا بعد تبييع باستخدام الجسم

المضاد 12dII). وتم إجراء تحويل الطاقة لخلايا T من الدم الطرفي البشري طبقاً لما تم وصفه فيما سبق (Brentjens et al., Clin Cancer Res 2007, 13(18Pt1):5426).

تقييم إنتاج/ وظيفة مضادة لـ CD47 scFv

تم تحديد إنتاج مضاد CD47 scFv من 293Glv9١٩٢٨ z-2A-B6HI2.2 وحول خلايا T للدم الطرفي البشري بواسطة حضانة خلايا الورم +CD47 (Raji و Nalm-6) في المحلول الطافي من هذه الخلايا. تم بعد ذلك غسل خلايا الورم وتم تتبعها باستخدام الجسم المضاد لبطاقة مضادة لـ c-myc مترافقة على نحو فلوري (fluorescently Cell Signaling, MA, USA) لكشف البروتين المشتق من المحلول الطافي المرتبط بخلايا الورم. تم كذلك تتبع خلايا الورم باستخدام مضاد CD47 مترافق على نحو فلوري (نسيلة B6HI2.2, eBioscience) لكشف قدرة B6HI2 scFv على إعاقة CD47. ١٠

نموذج نقل انتقائي في الكائن الحي

تم حقن الفئران في الوريد بـ 1×10^6 نالم-6 معدلة للتعبير عن Firefly لوسيفيراز (اليوم صفر). في اليوم ٣، تمت معالجة الفئران بـ 5×10^6 خلايا CAR+ T، التي تم التطعيم بها كذلك في الوريد. تمت مراقبة تطور الورم إكلينيكياً واستخدام التصوير الحيوي الومضي، طبقاً لما تم وصفه فيما سبق (Santos et al., Nature Medicine 2009, 15(3):338). ١٥

توليد 5C4 مضاد PD-1 scFv بشري

تم الحصول على متوالية للجسم المضاد ترتبط تحديداً بـ PD-1 بشري، وتم الحصول على نسيلة C4٥، طبقاً لما تم وصفه فيما سبق. تم تعديل هذه المتوالية بحيث تتضمن متوالية رائد Kappa، رابط جليسين سيرين وبطاقة c-myc وتم شراؤها من GeneArt (Invitrogen، الشكل ٩). تم تحقيق استنساخ scFv المذكور في الجزء الأساسي SFG للفيروس الارتجاعي، توليد خلايا تعبئة ثابتة، وتحويل طاقة خلايا T للدم الطرفي البشري وتقييم كفاءة التحويل طبقاً لما تم وصفه فيما سبق.

تقييم وظيفة PD-1 مضاد للبشر

تم تضخيم المركب الترابطي PD-1 ، PD-L1 بـ PCR من SKOV3 (ATCC) خلايا الورم التي تمت حضانتها في ٢٠٠ نانو جرام/ مل من جاما إنترفرون بشرية لنتاج عودة الاتحاد الجيني (RnD systems, MN, USA). تم توضيح بادئات مستخدمة لتضخيم PD-L1 البشري فيما يلي:

البادئ ٦. بادئ أمامي لـ PD-L1 البشري [متوالية بهوية رقم: ٤٧]

'-3 CACGTGCCATGGATGAGGATAT TTGCTGTCTT TATAT 5'- البادئ ٧.

PD-L1 البشري البادئ العكسي [متوالية بهوية رقم: ٤٨]

'5'CTCGAGTTACGTCTCCTCCAAATGTGTATCACTTT3'

١٠ تم استنساخ متوالية PD-L1 البشري في الجزء الأساسي للفيروس العكسي SFG ، وتم تحويله في سلالات خلايا 3T3, Raji و Nalm-6 طبقاً لما تم وصفه فيما سبق (Brentjens et al., Clin Cancer Res 2007, 13(18 Pt 1):5426). تم تقيع الخلايا بمضاد PD-L1 (النسيلة MIH1 ، BD Pharmingen, CA, USA) و FACS مفرز لضمان مجموعة الخلية الكلية المعبر عنها بـ PD-L1 (الشكل ١٤).

١٥ تم استنبات خلايا 1928z-2A-5C4 و 1928z T بشرية مع 3T3 (CD19/B7.1/PD-L1) aAPCs وتم إجراء عدات خلايا حية باستخدام استبعاد أزرق تريبان وتم إجراء قياس تدفق الخلايا لتحديد التعبير عن CAR. وتم الربط بين هذا وبين تمدد خلايا T عند استنباتها مع 3T3 aAPCs (CD19/B7.1).

توليد scFv PD-1 المضاد للفأر

٢٠ تم الحصول على متوالية الجسم المضاد التي ترتبط تحديداً PD-1 فأري، اسم النسيلة J43، طبقاً لما تم وصفه فيما سبق. تم تعديل هذه المتوالية بحيث تتضمن متوالية رائد سلسلة Kappa ومتوالية بطاقة c-myc ، برابط جليسين سيرين لتشكيل scFv وتم شراؤها من GeneArt (Invitrogen)، الشكل ١٦). تم استنساخ هذا في ناقل تعبير لفيروس ارتجاعي موجود (SFG)

يشفر CAR فأري، حيث يتم التوسط في إرسال الإشارة من خلال جزيئات CD28 من الفأر و CD3 زيتا. تم توليد m28mz-IRES-J4319 و H11m28mz-IRES-J434 لاستهداف خلية B وورم مبيض على التوالي (الأشكال ١٧ و ١٨).

تقييم مضاد وظيفة PD-1 من الفأر

٥ تم تضخيم المركب الترابطي PD-1، وتم تضخيم PD-L1 بـ PCR من خلايا الورم Renca (ATCC)، وتم توضيح بادئات مستخدمة لتضخيم PD-L1 من الفأر فيما يلي:

البادئ ٨. PD-L1 من الفأر بادئ أمامي [متواليه بهوية رقم: ٤٩]

'TAT TAC ACG TGT TAC ATG AGG ATA TTT GCT GTC TTT -3 -5

البادئ ٩. PD-L1 من الفأر البادئ العكسي [متواليه بهوية رقم: ٥٠]

١٠ 'TAT AGG ATC CTC GAG GAT GTT ACG TCT CCT CCA AAT GTG -3 -5
'TA 3

تم استنساخ PD-1 scFv المضاد للفأر في جزء أساسي للفيروس العكسي SFG ، وتم تحويله في سلالات خلايا 3 aAPCs, T3, IDS و EL4. تم فرز الخلايا الذي تم تبقيتها باستخدام مضاد PD-L1 (النسيلة MIH1 BD Pharmingen) بـ FACS لضمان إجمالي مجموعة الخلايا PD-L1 المعبر عنها. ١٥

اختبارات إخماد إطلاق كروم CTL

تم ترميز الخلايا المستهدفة التي تعبر عن مولد الضد المطلوب بـ ⁵¹Cr و تم استنباتها على نحو مشترك بخلايا T عند نسب منخفضة من المرسل العصبي: الهدف. وبعد ٤ ساعات من المزرعة، تمت إزالة المحلول الطافي وتم استخدامه لقياس النشاط الإشعاعي المطلق من الكروم ٢٠ chromium . وتم تحديد الانحلال المحدد بطرح النشاط الإشعاعي للخلفية للخلايا المستهدفة والقسمه على النشاط الإشعاعي المقاس من الخلايا المستهدفة المنحلة تماماً باستخدام ٠,٢% Triton X-100.

المثال ٥. إعاقه CD47 تحسن العلاج بخلية CAR T.

يمكن تعديل خلايا T وراثياً لاستهداف مولدات ضد الورم المستهدفة من خلال التعبير عن مستقبل مولد ضد الخيمري (CAR). أظهر النقل الانتقائي لخلايا CAR T المحددة بـ CD19 فعالية إكلينيكية لدى بعض المرضى المصابين بأورام خبيثة دموية، ومع ذلك اتسم المرضى المصابون بسرطان الدم الليمفاوي المزمن باعتلال عقد لمفية كبير باستجابات دون المثلى للعلاج بخلية CAR T. علاوة على ما سبق، أخفق العلاج بخلية CAR T في إظهار الفعالية ضد الأورام الصلبة في التجارب الإكلينيكية. لتحسين الفعالية الإكلينيكية لخلايا CAR T نقترح توظيف استجابة مناعية خاملة مضادة للورم من خلال إفراز شظية متغير لسلسلة مفردة تعيق CD47 (scFv) من خلايا CAR T. توضح الدراسات السابقة أنه يترتب على إعاقه التفاعل بين CD47 على خلايا الورم و SIRPa على الملتصقات الكبيرة التهام الخلايا لخلايا الورم. لإقران هذا التأثير، تم تعديل خلايا T للتعبير عن CAR (1928z) المحددة بـ CD19 وتفرز scFv محددة لـ CD47 بشري، المستنسخة من ورم هجين B6H12.2 (خلايا T 1928z/B6H12.2). تم توضيح أن خلايا T 1928z/B6H12.2 تفرز scFv وظيفي محدد لـ CD47 بشري، لم يؤثر على إفراز السيتوكين الذي يتوسط فيه CAR أو سمية الخلايا في المعمل. حفز المحلول الطافي من T 1928z/B6H12.2 وليس خلايا T 1928z عمليات التهام الخلايا لخلايا الورم الملتصقة في المعمل. أدى النقل الانتقائي الذي تتوسط فيه خلايا T 1928z/B6H12.2 إلى تحسين تأثيرات مضادة للورم واستئصال أورام Nalm6 في نموذج فأري قبل إكلينيكي. تجمع هذه الاستراتيجية الجديدة بين التأثيرات التي تتوسط فيها خلية CAR T والتدمير الذي تتوسط فيه الخلية المناعية الخاملة لخلايا الورم، مما يمكن أن يحسن من الفعالية المضادة للورم للعلاج بخلية CAR T.

المثال ٦. تحسين الفعالية المضادة للورم لخلايا T المعدلة بمستقبل مولد ضد الخيمري من خلال التعبير التكويني عن CD40L.

يمثل العلاج الانتقائي بالخلية باستخدام خلايا T المعدلة وراثياً التي تعبر عن مستقبل مولد ضد الخيمري (CAR) علاج واعد للمرضى المصابين بـ B-ALL. ومع ذلك، في معظم التجارب الإكلينيكية أخفقت خلايا T معدلة بـ CAR في إظهار فائدة علاجية ذات دلالة، تحديداً في سياق

أورام خبيثة لخلية B بدرجة منخفضة وأورام صلبة. في التجارب المقدمة في قسم الأمثلة هذا، نحسن كذلك الفعالية المضادة للورم من خلايا T معدلة بـ CAR بواسطة الهندسة الوراثية لخلايا T للتعبير على نحو تكويني عن مركب ترابطي CD40 (CD154, CD40L). أدت خلايا T المعدلة للتعبير على نحو تكويني عن CD40L (خلايا T معدلة بـ CD40L) إلى زيادة التكاثر وإفراز سيتوكينات TH1 مساعدة على الالتهاب. علاوة على ما سبق، أدت خلايا T معدلة بـ Cd40L إلى تعزيز توليد المناعة لـ CD40+ خلايا الورم بواسطة الزيادة المتحكم فيها من الجزيئات مشتركة التحفيز (CD80 و CD86)، أدت جزيئات التصاق (CD54, CD58، و CD70)، وجزيئات HLA (الفئة I و HLA-DR) ومستقبل موت Fas (CD95) على سطح خلية الورم.

بصورة إضافية، أدت خلايا T معدلة بـ CD40L إلى حث الإنضاج وحفزت إفراز السيتوكين المساعد على الالتهاب IL-12 بواسطة الخلايا الشجرية المشتقة أحادية الخلايا. في النهاية، أدت الخلايا CAR/CD40L المستهدفة بالورم لخلايا T إلى زيادة سمية الخلايا مقابل أورام CD40+ وأدت إلى تمديد بقاء الفئران التي تحمل الورم في نموذج غريسة خارجية من الورم للمفاوي الجهازية. تدعم هذه البيانات ما قبل الإكلينيكية الاستخدام الإكلينيكي لخلايا T CAR معدلة بصورة إضافية للتعبير على نحو تكويني عن CD40L بفعالية محسنة متوقعة مضادة للورم ونتيجة إكلينيكية محسنة.

المواد والطرق :

مزرعة الخلية : تم الإبقاء على سلالات خلية الورم DoHH2، Raji و NALM-6 (تجميعية مزرعة من نوع أمريكي) في وسط PMI 1640 (Gibco) مكمل بـ ١٠% من مصل جنين بقرى تم إيقاف تنشيطه بالحرارة (FBS)، وحمض أميني غير أساسي، وبيروفات الصوديوم sodium HEPES pyruvate (حمض ٢-N-هيدروكسي إيثيل بيرازين-N'-٢-إيثان سلفونيك) (N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) محلول منظم، و٢-مركابتو إيثانول من (Invitrogen). تم وصف سلالات خلايا منتج الفيروس الارتجاعي GP-٢٩٣ GLV9 فيما سبق وتم استنباتها في (Invitrogen) DMEM مكمل بـ ١٠% من خلايا FBS.29 NIH-3T3 صناعية تقدم مولد الضد (AAPC) في DMEM مكمل بـ ١٠% مصل عجل مانح

تم إيقاف نشاطه بالتسخين donor calf serum (DCS) طبقاً لما تم وصفه فيما سبق. تم عزل خلايا T بشرية من دم طرفي لمانحين أصحاء بموجب بروتوكول 95-054 معتمد من BD IRB Memorial Sloan-Kettering Cancer Center باستخدام أنابيب Vacutainer CPT (Becton Dickinson) طبقاً لتعليمات جهة التصنيع. تم الحصول على خلايا T من المريض وخلايا CLL من المرضى الخاضعين للعلاج بموجب بروتوكول 06-138 معتمد من MSKCC IRB وتم عزلها باستخدام Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28 (Invitrogen) beads. تم استنبات خلايا T في RPMI 1640 مكمل بـ ١٠% FBS و ٢٠ وحدة دولية/ملي لتر (R&D Systems) IL-2. تم الحصول على الخلايا الشجرية المشتقة من الخلايا الأحادية (moDCs) Monocyte derived dendritic cells من خلايا أحادية النواة من الدم الطرفي الملتصق ببيلاستيك مزرعة النسيج peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) من مانحين أصحاء ومستنبتة في RPMI 1640 مكمل بـ ١% مصل A/B بشري مجمع، محلول منظم HEPES، ٢-مركابتو إيثانول (Invitrogen) Mercaptoethanol، إنترليوكين-٤ (IL-4؛ ٥٠٠ وحدة دولية/مل - R&D Systems) وعامل تحفيز مستعمرة خلية حبيبية أحادية النواة- (GM-CSF؛ ١٠٠٠ وحدة دولية/مل - R&D Systems) وفقاً لما تم وصفه فيما سبق. تم استكمال جميع الوسائط بـ ٢ ملي مول /لتر L-جلوتامين interlukin (Invitrogen)، ١٠٠ وحدة/ملي لتر بنسيلين penicillin، و ١٠٠ ميكرو جرام/ملي لتر ستربتومايسين (Invitrogen) streptomycin

تكوين بنيات فيروسية ارتجاعية : تم تضخيم CD40L cDNA بشري بـ PCR من PBMCs معزولة من PBMCs معزولة من مانح سليم باستخدام البادئات التالية (١)

5'-CACGTGCATGATCGAAACATACAACCAAACCTTCTCCCCGATCTGC- ٢٠
3

[متوالية بهوية رقم: ٣]

و (٢) 5'-CTCGAGGGATCCTCAGAGTTTGAGTAAGCCAAAGGA-3' [متوالية بهوية رقم: ٤] (الشكل ١٢٢). تم بناء CD40L بشري يشفر ناقل فيروس ارتجاعي جاما باستخدام

الجزء الأساسي لناقل التعبير SFG. تم وصف بناء ناقل التعبير SFG لـ 1928z و Pz1 (CAR مضاد لمولد ضد غشاء محدد للبروستاتا؛ مضاد PSMA) فيما سبق. تم تكوين بناء 1928z-IRES-40L وناقل فيروس ارتجاعي جاما Pz1-IRES-40L باستخدام PCR متداخل (الشكل ٢٦).

٥ تحويل طاقة الفيروس الارتجاعي لخلايا لمفاوية T بشرية

تم فيما سبق وصف توليد سلالات خلايا منتج الفيروس الارتجاعي الثابتة GP-GLV9٢٩٣ والتعديل الجيني لخلايا T بشرية. لتحويل طاقة خلية T تم تنشيط PBMCs لمانح صحيح معزولة باستخدام راصة دموية نباتية phytohemagglutinin (PHA) بتركيز ٢ ميكرو جرام/ملي لتر (Sigma)، في حين تم عزل خلايا T مشتقة من المريض، وتم تنشيطها، وتم تمديدتها باستخدام خرزات Dynabeads ClinExVivo CD3/CD28 باتباع توصيات جهة التصنيع. تم

تحويل طاقة خلايا T المنشطة بنظام فيروس ارتجاعي على أطباق معالجة بمزرعة غير نسيجية مغلقة بريترونيكتين طبقاً لما تم وصفه فيما سبق. تم تقييم نقل الجين في اليوم ٧ من خلال قياس تدفق الخلايا. تم ت وليد خلايا T محول إليها الطاقة بمحاكي مقارن بنفس الطريقة فيما عدا المحلول الطافي تم اشتقاقه من مزارع خلية 293GP-GLV9 فارغة. تم تقييم تكاثر خلايا T المعدلة بـ CD40L بواسطة عداد خلايا guava® easyCyte™ باستخدام مادة تفاعل guava® (EMD Millipore) ViaCount طبقاً لتعليمات جهة التصنيع. تم إجراء تمدد خلايا T المعدلة لتجارب في الكائن الحي باستخدام AAPCs مشتقة من أرومة ليفية فأرية NIH-3T3 معالجة بالهندسة الوراثية للتعبير عن مولد الضد المستهدف (CD19 أو PSMA) إلى جانب التحفيز المشترك (CD80) طبقاً لما تم وصفه فيما سبق.

٢٠ اختبارات المزرعة المشتركة

تم الاستنبات المشترك لخلايا الورم (DOHH2, Raji, Ph+ ALL 3.1, NALM-6) بنسبة ١:٥ خلايا T معدلة بـ Cd40L وخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة. تم إجراء قياس تدفق الخلايا بعد ثلاثة أيام لتحديد النمط الظاهري من خلايا الورم. تم الاستنبات المشترك لـ moDCs (٢,٥ x ١٠٥) مع خلايا T معدلة ذاتية المنشأ بـ Cd40L أو خلايا T تم تحويل طاقتها بالمحاكاة بنسبة

١:٥ وتم تحليل المحلول الطافي لمزرعة النسيج بعد ٢٤ ساعة لـ IL-12p70 على نظام Luminex IS100 (انظر أدناه). تم كذلك الاستنبات المشترك لـ moDCs بنسبة ١:٥ خلايا T معدلة بـ Cd40L وخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة وتم تحليل النمط الظاهري من moDC بقياس تدفق الخلايا بعد ٢٤ ساعة.

٥ اختبار سمية الخلايا

تم تحديد القدرة على انحلال الخلايا لخلايا T تم تحويل الطاقة إليها باستخدام اختبار قياسي لإطلاق 51Cr وفقاً لما تم وصفه فيما سبق.

اختبارات كشف السيتوكين

تم تقييم كشف السيتوكين في المحلول الطافي لمزرعة النسيج باستخدام MILLIPLEX Human Cytokine Detection System (Millipore Corp.) بالاشتراك مع Luminex IS100 system وبرنامج IS 2.3 (Luminex Corp.) طبقاً لتعليمات جهة التصنيع.

قياس تدفق الخلايا

تم إجراء قياس تدفق الخلايا باستخدام مقياس الخلايا FACScan وتم تحليل البيانات باستخدام برنامج FlowJo الإصدار ٩,٢ (Tree Star). وتم كشف التعبير عن CAR باستخدام جسم مضاد وحيد النسيلة 19E3 من هامستر أرميني محدد لـ CAR (1928z) و(1928z 12D11) (MSKCC monoclonal antibody facility) Pz1, and. وتم كشف التعبير CD40L باستخدام CD154 من الفأر المضاد للبشر (BD Biosciences). وتم تبقيع خلايا T البشرية بـ CD3 من الفأر المضاد للبشر (BD Biosciences)، CD4 و CD8 (Invitrogen). وتم تبقيع moDCs باستخدام CD11b، HLA-DR، CD83، و CD86 من الفأر المضاد للبشر (Invitrogen). تم كشف DOHH2، Raji، و NALM6 النمط الظاهري لخلية الورم باستخدام CD19، CD40، CD54، CD86، CD80، و HLA-Class و HLA-DR (Invitrogen)، CD58، CD70، و CD95 (BD Biosciences).

دراسات خلية CAR T في الكائن الحي

قمنا بتطعيم فئران SCID/Beige (CB17.Cg-PrkdcscidLystbg-J/Crl) بعمر يتراوح من ٨ إلى ١٢ أسبوعاً من (Charles River Laboratories) بخلايا الورم DOHH2 (٥ × ١٠ × ٥ خلية) بالحقن في الوريد. وبعد يومين تم تسريب خلايا T المحول إليها الطاقة في وريد الفئران (١ × ١٠ × ٧ خلايا CAR T). تمت مراقبة تطور الورم إكلينيكيًا وتم قتل الفئران قتلاً رحيماً عندما أصبح المرض ظاهر إكلينيكيًا (تطور من شلل بالطرف الخلفي أو استجابة منخفضة للمحفزات). تم إجراء جميع دراسات الفئران طبقاً لبروتوكول معتمد من Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee (00-05-065).

التحليل الإحصائي

تم حساب جميع التحليلات باستخدام برنامج Graphpad Prism 5.0، وتم تقييم بيانات البقاء باستخدام تحليل تصنيف لو وتم تحقيق جميع التحليلات الأخرى باختبار Mann-Whitney (اختبار مفصل على شخص معين).

النتائج

التعبير الأساسي لـ CD40L بواسطة خلايا T بشرية

قمنا بصورة أولية بتحويل طاقة خلايا T من مانح سليم باستخدام ناقل فيروس ارتجاعي CD40L (الشكل ٢٢أ). ترتب على تحويل الطاقة للفيروس الارتجاعي لخلايا T باستخدام جين CD40L روتينياً $\leq 40\%$ نقل للجين باستخدام تعبير ثابت عن CD40L في كل من المجموعات الفرعية لخلية CD4+ T و CD8+ T (الشكل ٢٢ب). وتمت زيادة تكاثر خلايا T المعدلة بـ CD40L بدرجة ذات دلالة إحصائية مقارنة بخلايا T المحول إليها الطاقة بالمحاكاة المتولدة من نفس المانحين الثلاثة (الشكل ٢٢ج). تم تحليل أوساط مزرعة النسيج من خلايا T المعدلة بـ CD40L وتم توضيح أنها تتسم بـ CD40L (sCD40L) قابلة للذوبان المتزايد على نحو ذي دلالة إحصائية كما هو متوقع، فضلاً عن الإفراز المتزايد بدرجة ذات دلالة إحصائية لسيتوكينات IFN- γ و GM-CSF مساعدة للالتهاب عند المقارنة بخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة (الشكل ٢٢د).

خلايا T معدلة بـ Cd40L تغير من النمط الظاهري لكل من سلالات خلايا الورم CD40+ وخلايا CLL المأخوذة من المريض

- ٥ لدراسة قدرة مسار CD40L/CD40 على تعديل النمط الظاهري لخلايا الورم تم إجراء مزرعة مشتركة من خلايا الورم B-CD40+ خلية وخلايا T معدلة بـ Cd40L أو خلايا T تم تحويل الطاقة إليها بالمحاكاة . أدت المزارع المشكلة بخلايا T معدلة بـ Cd40L, ولكن ليس خلايا T تم تحويل الطاقة إليها بالمحاكاة, إلى الزيادة المتحكم فيها من جزيئات مشتركة التحفيز (CD80 و CD86), وجزيئات التصاق (CD54, CD58, و CD70), جزيئات HLA (HLA Class I and HLA-DR), وموت مستقبل Fas (CD95) على سطح DOHH2 خلايا الورم (الشكل ٢٣). كانت هناك تغييرات نمط ظاهري ظاهرة أيضاً عندما تم استنبات خلايا الورم DOHH2
- ١٠ في أوساط مكيفة من خلية T معدلة بـ CD40L تحتوي على مستويات مرتفعة من sCD40L (الشكل ٢٨). لتحديد ما إذا كان التعبير عن CD40 على خلية الورم يكون مطلوباً لتغيير النمط الظاهري لخلية الورم تم إجراء مزرعة مشتركة من سلالة خلية الورم CD40 (NALM6) مع خلايا T معدلة بـ Cd40L وخلايا T محول إليها الطاقة بالمحاكاة . لم يترتب على هذه الدراسات أي تغيير في النمط الظاهري مما يظهر الحاجة إلى التعبير عن CD40 بواسطة الورم لحث التغييرات التي يتوسط فيها CD40L في النمط الظاهري لخلية الورم (الشكل ٢٣ب).
- ١٥

- للتحقق من هذا التأثير بصورة إضافية في موقف ذي صلة إكلينيكياً قمنا باستنبات مشترك لخلايا T المعدلة بـ CD40L المأخوذة من مرضى لديهم CLL بخلايا ورم CLL ذاتية المنشأ. ترتب على تحويل طاقة الفيروس الارتجاعي لخلايا T مأخوذة من مريض لديه CLL روتينياً $\leq 40\%$ من نقل الجين بتعبير ثابت عن جين CD40L (الشكل ٢٤أ). في هذا الموقف، أظهرت خلايا T المعدلة بـ CD40L المأخوذة من المريض، ولكن ليس خلايا T المحول إليها الطاقة بالمحاكاة، قدرة على زيادة متحكم فيها لجزيئات التحفيز المشترك، وجزيئات الالتصاق، وجزيئات HLA ومستقبل موت Fas على سطح خلايا CLL ذاتية المنشأ (الشكل ٢٤ب).
- ٢٠

تقوم خلايا T المعدلة بـ CD40L بحث إفراز IL-12p70 والتوسط في إنضاج moDCs

مع توفير دور CD40L في إنضاج DC وإفراز سيتوكين IL-12 المساعد على الالتهاب قمنا بعد ذلك بدراسة ما إذا كانت خلايا T المعدلة بـ CD40L يمكن أن تحث على نفس التأثير عندما تم استنباتها على نحو مشترك بـ moDCs ذاتية المنشأ. على نحو ذي دلالة إحصائية، تبين لنا أن ٥ خلايا T المعدلة بـ CD40L قد حثت إفراز IL-12p70 في مزارع مشتركة تحتوي على moDCs وخلايا T المعدلة بـ CD40L ذاتية المنشأ من ثلاثة مانحين منفصلين (الشكل ١٢٥). تمت كذلك ملاحظة إنضاج moDCs طبقاً لما تم تحديده من خلال الزيادة المتحكم فيها لجزيئات تحفيز مشترك على السطح (HLA-DR، CD86 و CD83) بعد المزرعة المشتركة مع خلايا T المعدلة بـ CD40L ولكن بعد المزرعة المشتركة مع خلايا T المحول إليها الطاقة بالمحاكاة (الشكل ١٠ بـ ٢٥).

ترتب على التعبير عن كل من CAR و CD40L بواسطة خلايا T سمية خلايا محسنة في المعمل وفي الكائن الحي

قمنا بعد ذلك بتقييم قدرة خلايا T للتعبير عن كل من مضاد (1928z) CD19 CAR و CD40L باستخدام ناقل فيروس ارتجاعي ثنائي السيسترون (1928z/CD40L؛ الشكل ١٢٦). ١٥ ترتب على تحويل الطاقة لخلايا T روتينياً $\leq 40\%$ من التعبير عن كل من 1928z و CD40L (خلايا T 1928z/CD40L؛ الشكل ١٢٦ ب). تم كذلك تكوين نواقل الفيروس الارتجاعي المقارنة بما في ذلك مضاد (1928z) CD19 CAR ومضاد (Pz1) PSMA CAR و Pz1/CD40L؛ الشكل ١٢٦ ب). لتقييم النشاط المضاد للورم في المعمل لخلايا 1928z/CD40L T، تم إجراء اختبار قياسي لإطلاق 51Cr لمدة ٤ ساعات. أدى التعبير التكويني لـ CD40L إلى تحسين قدرة خلايا T 1928z التحليلية إحصائياً مقابل خلايا الورم CD19+ عند المقارنة ٢٠ بمجموعة من خلايا T المقارنة تتضمن خلايا T معدلة للتعبير عن 1928z CAR بمفردها (الشكل ١٢٦ ج). كما تم إظهار سمية الخلايا المحسنة مقابل سلالات خلية ورم CD19+/CD40+ أخرى (الشكل ١٢٩).

لدراسة النشاط المضاد للورم في الكائن الحي لخلايا T 1928z/CD40L قمنا باستخدام نموذج غريسة خارجية من الورم للمفاوي DOHH2 الجهازى. لاحظنا فيما سبق أن خلايا الورم DOHH2 الجهازى يعد مستعصياً بصورة ملحوظة للعلاج بخلية CAR T المستهدفة من CD19 في فئران SCID/Beige. لتقييم ما إذا كان التعديل الإضافى لخلايا CAR T بـ CD40L يمكن أن يحسن من الفعالية المضادة للورم في هذا النموذج قمنا بتلقيح ومعالجة فئران SCID/Beige تحمل ورم DOHH2 جهازى بخلايا CAR/CD40L T. بصورة ذات دلالة إحصائية، أظهر العلاج باستخدام خلايا T 1928z/CD40L مقارنة بالعلاج بخلايا T 1928z أو خلايا T المقارنة (خلايا Pz1 و Pz1/CD40L T) بقاء محسن وترتب عليه بقاء على المدى البعيد في ٣٠ % من الفئران المعالجة بخلايا T 1928z/40L (الشكل ٢٧).

١٠ المناقشة

أوضح العلاج المختار باستخدام خلايا CAR T استجابات إكلينيكية واحدة لدى المرضى المصابين بأورام خبيثة بخلية B. وقد أظهرت هذه الدراسات قوة خلايا CAR T بوصفها خلية مرسل وحيد مضاد للورم. ومع ذلك، يمكن أن يكون لهذه الطريقة نجاح محدود ضد الأورام ذات وسط دقيق لورم مخمد للمناعة قوى. علاوة على ما سبق، في صورته الحالية لم تظهر خلايا CAR T قدرة على الاستجابة لانفلات الورم بعد فقد مولد الضد المستهدف. من إحدى الطرق الممكنة للتغلب على هذه القيود المزيد من معالجة خلايا CAR T من خلال التعبير التكويني لخلايا CD40L في مجهود لتحسين القدرة/ التكاثر الحالة لخلايا T، وتعزيز توليد المناعة للورم، وتحسين تقديم/ وظيفة مولد ضد DC. ويمكن كذلك تنشيط تعديل خلايا CAR T من خلال التعبير التكويني لخلايا CD40L بصورة إضافية للاستجابة المناعية داخلية المنشأ وبالتالي يتم تحسين الفعالية المضادة للورم.

لتقييم دور التعبير التكويني لخلايا CD40L بواسطة خلايا T قمنا أولاً بتكوين ناقل فيروس ارتجاعي يحتوي على جين CD40L بمفرده. عند نقل الطاقة في خلايا T يتم إظهار كل من التعبير التكويني عن المجموعات الفرعية لخلية CD4+ T و CD8+ T (الشكل ٢٢ب). في حين تم مؤخراً الإبلاغ عن الارتباط بصورة أكثر شيوعاً مع خلايا CD4+ T، التعبير عن CD40L ووظيفة المساعد في خلايا الذاكرة CD8+ T. ويُعرف كذلك أن التعبير عن CD40L يعزز تكاثر

خلية T وإفراز سيتوكينات TH1 المساعدة على الالتهابات (γ -IFN، GM-CSF). تظهر خلايا T المعدلة بـ CD40 القدرة على إفراز سيتوكينات مساعدة على الالتهاب وتكاثر محسن مقارنة بخلايا T المنشطة على نحو مماثل ولكن المحول إليها بالطاقة بالمحاكاة من نفس المانح (الشكل ٢٢ ج و ٢٢د). أدت تقوية خلايا T من خلال التعبير التكويني عن خلايا CD40 إلى إمكانية تحسين وظيفتها/ تنشيطها المضاد للورم.

غالباً ما يتم استخدام التخفيض المتحكم فيه لبروتينات سطح الخلية بما في ذلك HLA Class I، جزيئات التعبير المشترك و/ أو جزيئات الالتصاق بواسطة أورام لتجنب التعرف المناعي. يمكن كذلك حدوث المقاومة لتلاشي الخلايا بفقد مستقبل الموت Fas على سطح الخلايا الخبيثة.

ولمضادة هذا، يمكن أن تتفاعل خلايا CD40L مع CD40 على الخلايا الخبيثة للتوسط في الزيادة المتحكم فيها لجزيئات التحفيز المشترك (CD80 و CD86) (جزيئات الالتصاق CD54، CD58، و CD70)، وجزيئات HLA (HLA Class I و HLA-DR) وتسهل تلاشي الخلايا من خلال مسار على أورام Fas/FasL على أورام خلية B الخبيثة. ترتب على خلايا T المعدلة بـ

CD40L المعدلة نمط ظاهري لخلايا ورم CD40+ زيادة متحكم فيها لهذه البروتينات الحرجة على سطح الخلية وبالتالي تضاد قدرة خلايا الورم على المراوغة المناعية (الشكل ٢). كان هذا

التأثير ٨ معتمداً على التعبير عن CD40 بواسطة خلايا الورم نظراً لأن تغييرات الصورة النمطية تكون غير موجودة عندما تم الاستنبات المشترك لخلايا الورم CD40- مع خلايا T المعدلة بـ CD40L (الشكل ٢٣ أ-ب). تمت ملاحظة هذا التأثير في موقف أكثر صلة إكلينيكياً تم فيه

اشتقاق خلايا T المعدلة بـ CD40L مشتركة الاستنبات من مرضى CLL عزز من توليد المناعة لخلايا CLL ذاتية المنشأ (الشكل ٢٤ أ-ب). توضح هذه النتيجة القدرة المحتفظ بها لخلايا T على

تعزيز توليد المناعة لخلايا خبيثة ذاتية المنشأ من خلال التعبير التكويني عن CD40L. الأهم من ذلك، لا يكون تلامس خلية مع خلية أمر حيوي لتعديل النمط الظاهري لخلية الورم كأوساط تحتوي

على مستويات مرتفعة من sCD40L أدى إلى تغييرات مماثلة متعلقة بالنمط الظاهري (الشكل ٢٨). تبين كذلك أن تعزيز توليد المناعة لخلايا سرطان من خلال مسار CD40L/CD40 يحث

استجابة مضادة للورم داخلية المنشأ في دراسات لقاح منشورة من قبل باستخدام تسريب خلايا ورم CLL ذاتية المنشأ محول إليها بالطاقة بنقل فيروس غدي يشفر CD40L (خلايا Ad-CD40L

(CLL). ويمكن كذلك أن يتسم تسريب خلايا T المحددة بالورم التي عدلت بصورة إضافية للتعبير بصورة تكوينية عن CD40L بقدرة مماثلة كذلك لحث استجابة مضادة للورم داخلية المنشأ. يمكن أن يترتب على هذا نشر للقيمة اللاصقة من خلال توظيف خلية NK أو T مضادة للورم داخلية المنشأ تقيد بهذه الطريقة قدرة انفلات الورم من خلال التخفيض المتحكم فيه لمولد ضد مستهدف مفرد. ٥

تمت إعاقة وظيفة الخلية الشجرية (DC) Dendritic cell (DC) في وسط دقيق للورم. عادة تتضج الخلايا الشجرية، وتنتقل وتقدم مولد الضد داخل العقد اللمفاوية وبالتالي تحفز الذراع التكيفي للنظام المناعي وفقاً لوجود ورم خبيث أو كائن ممرض. ومع ذلك، تتسم الخلية الشجرية المعرضة للوسط الدقيق للورم المخمد بوظيفة متناقضة لحث Tregs وتهيئة خلايا T المحددة بالورم. لمضادة هذا،

يمكن أن يعزز مسار CD40L/CD40 تقديم مولد الضد DCs، وإنتاج سيتوكين IL-12 المساعد ١٠

على الالتهاب، وتعزيز وظيفة خلية T- CD8+ السامة للخلايا. وتبين من قبل أن الأجسام المضادة CD40 للمساعد تنشط DCs وتعزز استجابة خلية T- CD8+ وبالتالي تحل محل الحاجة لمساعدة خلية T CD4+. علاوة على ما سبق، تبين أن خلايا T CD8+ المحددة بالورم المعدلة بـ CD40L تحفز إنضاج الخلايا DCs وتعزز الاستجابات المضادة للورم لخلايا CD8+

T المنقولة على نحو انتقائي في فئران تحمل الورم. لاختبار قدرة خلايا T المعدلة بـ CD40L على ١٥

تعزيز وظيفة الخلايا البشرية DCs، تم استخدام تجربة استنبات مشترك في المعمل مع خلايا moDCs ذاتية المنشأ. على نحو ذي دلالة إحصائية حفزت خلايا T المعدلة بـ CD40L إفراز IL-12p70 من الخلايا moDCs (الشكل ٢٥-أب). IL-12 يمثل سيتوكين عديد المظاهر بالعديد من الوظائف المحفزة للمناعة بما في ذلك القدرة على تعزيز تكاثر خلية T ، قدرة سامة

للخلايا، والتوسط في المقاومة إلى إخماد Treg كما أوضحنا وآخرون ذلك من قبل. يمكن ترجمة ٢٠

قدرة خلايا T CAR/40L على تحفيز إنتاج IL-12 من الخلايا DCs إلى تأثير محسن مضاد للورم للخلايا T CAR المنقولة على نحو انتقائي فضلاً عن توظيف وتنشيط خلايا T المحددة بالورم داخلية المنشأ وخلايا قاتل طبيعي (NK). بتعزيز إنتاج IL-12 في قرب وثيق للورم نتوقع

حد أدنى من السمية المرتبطة بـ IL-12 على النقيض من الدراسات السابقة التي توضح السمية الحادة بعد إعطاء IL-12 الجهازى. بالإضافة إلى تحفيز إنتاج IL-12، تعزز خلايا T المعدلة بـ ٢٥

CD40L الذي في سياق سمية خلايا CAR T ينبغي أن يعزز كذلك من امتصاص وتقديم مولد ضد ورم خلية DC الأمر الذي يترتب عليه توظيف/ تنشيط لاستجابة مضادة للورم داخلي المنشأ بواسطة خلايا T للمرسل العصبي وخلايا NK (الشكل ٢٥-أ-ب). ينبغي أن يؤدي الجمع بينها وبين وظيفة خلية DC إلى تحويلها إلى فعالية محسنة مضادة للورم لخلايا T محددة بالورم معدلة بالهندسة الوراثية من خلال توظيف استجابة مناعية داخلية المنشأ مضادة للورم. ٥

تم إظهار قدرة خلايا CAR T على إعادة توجيه تحديد خلايا T في عدد من التقارير قبل الإكلينيكية والإكلينيكية. وقمنا بتطوير ناقل فيروس ارتجاعي يحتوي على مضاد CD19 CAR (1928z) وجين CD40L (الشكل ٢٨-أ). وكان التعبير التكويني عن كل من 1928z و CD40L بواسطة خلايا T قابل للتحقيق بسهولة (الشكل ٢٨-ب). بدرجة كبيرة عند اختبار الإمكانية السامة للخلايا لخلايا T 1928z/40L مقابل مجموعة من أهداف CD19+ لاحظنا سمية متزايدة للخلايا مقارنة بخلايا T المعدلة بخلية CAR 1928z بمفردها (الشكل ٢٨-ج). ١٠

مؤخراً، أورد Laurin وزملاؤه سمية خلايا معززة بواسطة خلايا CAR T مقابل سلالات خلية الورم بعد زيادة متحكم فيها معتمدة على CD40/IL-4 لجزيئات الالتصاق بالسطح مما يمكن أن يشرح كذلك سمية الخلايا المتزايدة الملحوظة في تجاربنا. لاختبار إمكانية خلايا T CAR/CD40L في الكائن الحي تم استخدام نموذج الغريسة الخارجي باستخدام سلالة خلية ورم لمفاوي جريبي محول اختراقي DOHH2. كان هذا النموذج مقاوم من الناحية التاريخية للاستئصال بواسطة الخلايا T 1928z (الشكل ٢٨). ومع ذلك، مع التعديل المضاف من CD40L فإن خلايا T 1928z/CD40L الخاصة بنا تم بقاء الفئران التي تحمل الورم عند المقارنة بالفئران المعالجة بخلايا T 1928z بمفردها وترتب على ذلك ٣٠% بقاء على المدى البعيد في المجموعة المعالجة ١٥

بخلية T 1928z/CD40L (الشكل ٢٧). في حين يظهر هذا النموذج فرق في البقاء، فإن الافتقار إلى النظام المناعي المنافس بواسطة فئران SCID/Beige يجعل هذا النموذج مناسب لبحث الفائدة التامة التي تشكل التعبير عن CD40L بواسطة خلايا CAR T التي يمكن أن تتسم بها في استئصال الأورام الموجودة. وفي حين نلاحظ فعالية محسنة مضادة للورم في نموذجنا، فإن هذا الأمر يحتمل أن يكون مرتبط بسمية الخلايا المحسنة لخلايا CAR T بواسطة مسار CD40/CD40L للغدة الكظرية / نظير الصماوية، وليس من خلال توظيف/ تنشيط الاستجابة ٢٥

المناعية داخلية المنشأ بواسطة خلايا CAR T المعدلة بـ CD40L. ويمكن استخدام نموذج ورم مماثل جينياً منافس للمناعة لبحث التأثير الكامل للتعبير التكويني لـ CD40L بواسطة خلايا CAR T على الوسط الدقيق للورم وتوظيف استجابات مناعية داخلية المنشأ مضادة للورم. وقد تم تطوير النموذج المماثل جينياً المنافس للمناعة لورم خبيث بخلية B CD19+ البشرية في سياق النظام المناعي المنافس.

تم توضيح أن التعبير التكويني لـ CD40L على نخاع العظم أو الغدة الدرقية يترتب عليه اضطرابات تكاثر لمفاوية لـ T بعد التسريب في فئران تفتقر إلى CD40L. ويمكن أن تؤدي المجموعات النسائية التي نشأت داخل الغدة الصعترية بعد تحفيز CD40L غير المنقطع للخلايا الصعترية إلى تحويل لورم خبيث (بدلاً من تكون الورم غرزي لخلايا معدلة بـ CD40L). في حين لاحظنا أدنى سمية للخلايا وغياب التحويل للورم الخبيث بعد تسريب خلايا CAR/CD40L T، مع وجود صور المخاوف فيما يتعلق بتحويل خلية T للورم الخبيث، وجين هالك فعال، مثل iCasp9، يمكن تضمينه على نحو مرغوب فيه داخل ناقل الفيروس الارتجاعي.

المراجع للمثال ٦

1. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med.* 2012;14(6):405-415. ١٥
2. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, et al. CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra138. ٢٠
3. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood.* 2011;118(18):4817-4828.

4. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(8):725–733.
5. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:235–271. ○
6. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor–modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(16):1509–1518.
7. Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, et al. Tumor–targeted T cells modified to secrete IL–12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood.* 2012;119(18):4133–4141. ١ ○
8. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature.* 1992;357(6373):80–82.
9. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(1):4–43. ١ ○
10. Uckun FM, Gajl–Peczalska K, Myers DE, Jaszcz W, Haissig S, Ledbetter JA. Temporal association of CD40 antigen expression with discrete stages of human B–cell ontogeny and the efficacy of anti–CD40 immunotoxins against clonogenic B–lineage acute lymphoblastic leukemia as well as B–lineage non–Hodgkin's lymphoma cells. *Blood.* 1990;76(12):2449–2456. ٢ ○

11. Gruss HJ, Ulrich D, Braddy S, Armitage RJ, Dower SK. Recombinant CD30 ligand and CD40 ligand share common biological activities on Hodgkin and Reed–Sternberg cells. *Eur J Immunol.* 1995;25(7):2083–2089.
12. Zong YS, Lin H, Choy DT, et al. Nasopharyngeal carcinoma and lymphoinfiltration. *Oncology.* 1991;48(4):290–296.
13. Lollini PL, Landuzzi L, Frabetti F, et al. Expression of functional CD40 on human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells. *Clin Cancer Res.* 1998;4(8):1843–1849.
14. van den Oord JJ, Maes A, Stas M, et al. CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol.* 1996;149(6):1953–1961.
15. Wingett DG, Vestal RE, Forcier K, Hadjokas N, Nielson CP. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas–mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;50(1):27–36.
16. Ciaravino G, Bhat M, Manbeian CA, Teng NN. Differential expression of CD40 and CD95 in ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2004;25(1):27–32.
17. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, Pfister H, Hess S. CD40 ligand–CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN–gamma. *J Immunol.* 1999;162(7):4140–4147.

18. Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-135.
19. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 1996;184(2):747-752.
20. Clarke SR. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol.* 2000;67(5):607-614.
21. Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1994;152(4):1523-1531.
22. Peng X, Kasran A, Warmerdam PA, de Boer M, Ceuppens JL. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol.* 1996;26(7):1621-1627.
23. Bhadra R, Gigley JP, Khan IA. Cutting edge: CD40-CD40 ligand pathway plays a critical CD8-intrinsic and -extrinsic role during rescue of exhausted CD8 T cells. *J Immunol.* 2011;187(9):4421-4425.
24. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science.* 2002;297(5589):2060-2063.
25. Khong A, Nelson DJ, Nowak AK, Lake RA, Robinson BW. The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer. *Int Rev Immunol.* 2012;31(4):246-266.

26. Vonderheide RH, Glennie MJ. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013;19(5):1035-1043.
27. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2000;96(9):2917-2924. 0
28. Wierda WG, Castro JE, Aguillon R, et al. A phase I study of immune gene therapy for patients with CLL using a membrane-stable, humanized CD154. *Leukemia.* 2010;24(11):1893-1900.
29. Ghani K, Wang X, de Campos-Lima PO, et al. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum Gene Ther.* 2009;20(9):966-974. 10
30. Brentjens RJ, Latouche JB, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.* 2003;9(3):279-286. 10
31. Ratzinger G, Reagan JL, Heller G, Busam KJ, Young JW. Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. *Blood.* 2003;101(4):1422-1429.
32. Riviere I, Brose K, Mulligan RC. Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(15):6733-6737. 20

33. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5426–5435.
34. Gong MC, Latouche JB, Krause A, Heston WD, Bander NH, Sadelain M. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. *Neoplasia.* 1999;1(2):123–127.
35. Santos EB, Yeh R, Lee J, et al. Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase. *Nat Med.* 2009;15(3):338–344.
36. Quintas-Cardama A, Yeh RK, Hollyman D, et al. Multifactorial optimization of gammaretroviral gene transfer into human T lymphocytes for clinical application. *Hum Gene Ther.* 2007;18(12):1253–1260.
37. Frentsch M, Stark R, Matzmohr N, et al. CD40L expression permits CD8⁺ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood.* 2013;122(3):405–412.
38. Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood.* 2013;121(5):734–744.
39. Geijtenbeek TB, van Kooyk Y, van Vliet SJ, Renes MH, Raymakers RA, Figdor CG. High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1999;94(2):754–764.

40. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995;268(5215):1347-1349.
41. Schultze JL, Cardoso AA, Freeman GJ, et al. Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(18):8200-8204.
42. Schattner EJ, Mascarenhas J, Bishop J, et al. CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. *Blood*. 1996;88(4):1375-1382.
43. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*. 2004;104(8):2235-2246.
44. Higham EM, Wittrup KD, Chen J. Activation of tolerogenic dendritic cells in the tumor draining lymph nodes by CD8+ T cells engineered to express CD40 ligand. *J Immunol*. 2010;184(7):3394-3400.
45. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-146.
46. Laurin D, Marin V, Biagi E, et al. Upregulation of Adhesion Molecules on Leukemia Targets Improves the Efficacy of Cytotoxic T Cells Transduced With Chimeric Anti-CD19 Receptor. *J Immunother*. 2013;36(3):181-189.

47. Brown MP, Topham DJ, Sangster MY, et al. Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice. Nat Med. 1998;4(11):1253-1260.

48. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. N Engl J Med. 2011;365(18):1673-1683.

نماذج من الاختراع : من الوصف السابق، سيتضح أنه يمكن إجراء التغييرات والتعديلات على الاختراع الموصوف في الطلب الحالي لتوافقه مع استخدامات وظروف متنوعة. وتعد مثل هذه النماذج في نطاق مجال عناصر الحماية.

يتضمن الاستشهاد بقائمة من العناصر في أي تعريف لمتغير في هذه الوثيقة، تعريفات لذلك المتغير كما أي عنصر مفرد أو توليفة (أو توليفة فرعية) من العناصر المدرجة. يتضمن الاستشهاد بنموذج ما في هذه الوثيقة ذلك النموذج كما أي نموذج مفرد أو في توليفة مع أي من النماذج الأخرى أو أجزاء منها.

يمكن أن يكون بعض من المادة الحالية من هذا الطلب مرتبطاً بطلب البراءة الأمريكي رقم ١٢/٥٩٣٧٥١ الذي يكون طلب أمريكي في المرحلة الوطنية، بموجب 35 U.S.C. §371، من طلب البراءة الدولي رقم: ٢٠٠٨/٠٠٤٢٥١ ، المودع في ٨ مارس، ٢٠١٠، والذي يستفيد من الطلب الأمريكي المؤقت برقم مسلسل ٦٦/٩٢١١٤٤ ، المودع في ٣٠ مارس، ٢٠٠٧، والذي يتم إدراج الكشف عنه في الطلب الحالي بمجله كمرجع.

تم إدراج جميع البراءات والمنشورات المذكورة في هذه المواصفة كمرجع بنفس المدى كما لو كانت كل براءة ومنشور مستقل قد تم بيانه على نحو محدد وبصورة فردية ليتم إدراجه كمرجع.

عناصر الحماية

١- خلية استجابة مناعية تشتمل على:
مستقبل مولد ضد خيمري (CAR) يرتبط ب ROR1 ويشتمل على نطاق إرسال إشارات بين الخلايا من بولي بيتيد CD3 ξ ونطاق إرسال إشارات بين الخلايا من مستقبل تحفيز مشترك؛ و حمض نووي يقوم بترميز CD40L لنتاج عودة الاتحاد الجيني.

٥

٢- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يكون الحمض النووي مشتمل في ناقل.

٣- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ٢، حيث يكون الناقل ناقل فيروسي.

٤- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ٣، حيث يكون الناقل الفيروسي هو ناقل فيروس نسخ عكسي.

١٠

٥- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يتم اختيار خلية الاستجابة المناعية من المجموعة التي تتكون من خلايا تائية، خلايا قاتلة طبيعية، خلايا تائية سامة للخلايا، خلايا تائية منظمة، وتوليفات منها.

١٥

٦- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ٥، حيث تكون خلية الاستجابة المناعية خلية تائية.

٧- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يحسن CD40L لنتاج عودة الاتحاد الجيني الاستجابة المناعية لخلية الاستجابة المناعية.

٢٠

٨- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يكون مستقبل التحفيز المشترك هو CD28، 4-1BB، أو OX40.

٩- خلية الاستجابة المناعية وفقاً لعنصر الحماية ١، حيث يكون مستقبل التحفيز المشترك هو CD28.

١٠- تركيبة صيدلانية تشتمل على كمية فعالة من خلية استجابة مناعية وفقاً لعنصر الحماية ١ وسواغ مقبول صيدلانياً. ٥

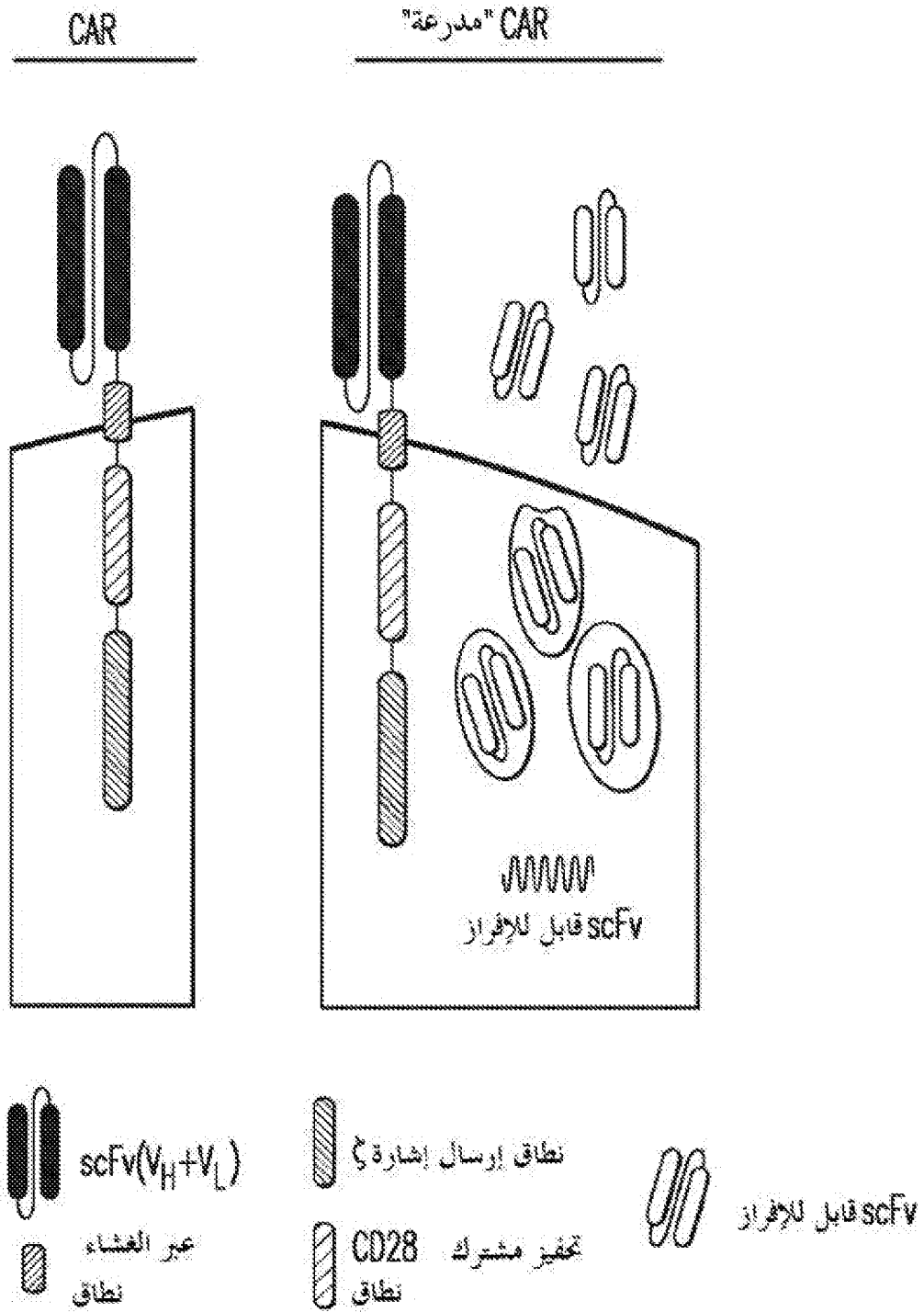
١١- التركيبة الصيدلانية وفقاً لعنصر الحماية ١٠، حيث تكون التركيبة المذكورة لعلاج ورم وتكون خلية الاستجابة المناعية هي خلية تائية.

١٠-١٢ مجموعة علاج لعلاج ورم، تشتمل مجموعة العلاج على خلية استجابة مناعية تشتمل على: (أ) مستقبل مولد ضد خيمري (CAR) يرتبط بـ ROR1 ويشتمل على نطاق إرسال إشارات بين الخلايا من بولي ببتيد CD3ξ ونطاق إرسال إشارات بين الخلايا من مستقبل تحفيز مشترك؛ وب) حمض نووي يقوم بترميز CD40L لنتاج عودة الاتحاد الجيني.

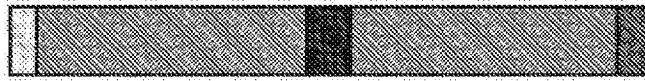
١٥-١٣ مجموعة العلاج وفقاً لعنصر الحماية ١٢، حيث تشتمل مجموعة العلاج كذلك على تعليمات مكتوبة لاستخدام الخلية المذكورة لعلاج خاضع يعاني من ورم.

١٤- مجموعة العلاج وفقاً لعنصر الحماية ١٢، حيث يكون مستقبل التحفيز المشترك هو CD28، 1BB-4، أو OX40.

١٥- مجموعة العلاج وفقاً لعنصر الحماية ١٢، حيث يكون مستقبل التحفيز المشترك هو CD28.



شكل ١



شکل ۱۲



شکل ۲ ب

ce cty gag aca gac aca ctc cty cta tgg gta cty cta tgg gtt aca ggt tcc act ggt gac gag cty gag cty gag cty gag tcc ggg gga gac tta gty
M E I D I L L L L M V L L L L W V P C S T G D E V Q L V E S C G D L Y

gag aca gga gac cta tcc tgt gaa gac tct gga ttc act ttc agt ggc tat ggc atg tct tgg gtt agc aag act cca gac aag agg cty
K P G C S L K L S C A A S C F T F S C Y C M S W V R Q T P D K R L

gag tgg gta gca acc att act agt agt ggt act tac acc tac cca gac agt gty aag ggg aca ttc acc aca tcc agg aca gac aat ggc aag aac aca cty
E W V A T I I T S C G T Y T Y Y P D S V K C R F T I S R D N A K N T L

tac cty aca aca gac agt cty aag tat gag ggt aca gac aca tat ttc tgt gaa aga tcc ctc gcy gga aat gct cty gac tac tag ggt aca gga acc
Y L Q I D S L K S E D T A I Y F C A R S L A C N A W D Y W C Q C T

tcn gtc acc gtc tcc tcn ggt gga gca ggt gga tct ggt gga ggt gga tct gac att gty atg act aag tct aca gcc acc cty tct
S V I V S S C C C C S C C C C C S C C C C S D I V W T Q S S P A T L S

gty act aca gga ggt ago gtc tet ctt tcc tgc agg ggc agc cag act att agc gac tac tta cac tag tat aca aca aca aca tag tct aca agg ctt
V T P G D R V S L S C R A S Q I I S D Y L H W Y Q Q K S H E S P R L

ctc aca ttt gct tcc aca tcc att tct ggg aca ccc tcc agg ttc agt ggc agt gga tca ggc tca gat ttc act ctc agt aca agt gty gga
L I K F A S Q S I S G I P S R F S G S G S C S D F T L S I W S Y E

act gaa gat gtt gga gty tat tac tgt aca aat ggt cac agc ttt act agg agt ttc agt gga ggc acc agg cty gaa aca aca ctc etc
P E D V G Y Y C Q M G H C F P R T F C G G T K L E I K E Q K L I

tcn gac gag gat cty TAActc gag
S E E D L * L E

Kappa leader sequence

B6H12.2 MH sequence

Serine Glycine linker sequence

B6H12.2 VL sequence

c-myc tag sequence

B6H12.2scfv with CD8 leader sequence

cc atg ggc tta cca gtg acc gcc ttg ctc ctg ccg ctg ggc tfg ctg ctc ccc gcc agg ccg ggg gtg cag ctg gtg gag tcc ggg agc gcc tta gtg w a l p v t a l l l l p l a l l l h a a a r p e l y q l v e s g c d l y	<i>CD8 leader sequence</i>	gag ccl ggc agg tcc ctg ctc ccc tcc tgg gco gcc tct gga ttc act ttc agt ggc tat ggc ctg tcl tgg gtt cgc cag act cca gcc aag agg ctg k p c c s l k l s c a a s c f t f s c y c w s w v r q t p d k r l gag tgg gtc gca acc att act agt ggt oct tcc acc tac tat cca gcc act gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gcc atc gcc aag acc acc ctg e w v a t i i t s c g t y t y p d s v k c r f t i s r d m a k n t l B6H12.2 VH sequence
tac ctg cca atc gac agt ctg aag tct gag gat cca gcc atc tat ttc tgt gca aga tcc ctg ggc aga act gct atg gac tac tgg agt cca gga acc y l q i d s l k s e d t a i y f c a r s l a c n a m d y w c q c t tca gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt gga ggt s v t v s s c g c g c s c g c s c g c s c g c s d i v w t q s s p a t l s	<i>Serine glycine linker sequence</i>	ctc atc cca ggt agc gtc tct ctt tcc tgc agc agc agc oct att agc gac tac ttc cac tgg tat cca cca ana tca cai gag tct cca agc ctt y t p c d h v s l s c r a s q t i s d y l h w y q q k s h e s p r l ctc atc ana ttt gat tcc cca tcc att tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc agt gga tcc ggc tca gat ttc act ctg act aac agt gtg gca l i k f a s q s i s c i p s r f s c s c s c s d f t l s i n s v e oct gaa gat gtt gga gtg tat tac tgt cca atg ggt ccc ggc ttt act cgg aag ttc agt gga gcc acc aag ctg gaa atc ana gaa cca aag ctg atc p e d v g v y y c q n c h c f p r t f c c c t k l e i k e q k l i c-myc tag sequence
tca gaa gag gat ctg TAA ctc gaa s e e d l * l e		

1928z-2A-B6H12.2 (kappa leader) sequence

```

atggtctcccagtgactgcccactgcttcccctagcgtcttccctgcattgagggggaagctgcagcagctcggg
gctgagctgggtgaggctgggtccctcagtgaagatttccctgcaaggctctggctatgcatcagtagctactggatgaa
ctgggtgaaagcagaggctcggacagggtcttgagtggttggacagattatccctggagatggtgactaactacaat
ggaaggttcagggttcagccacactgactgcagacaaatctccagcagagcctacatgcagctcagcggcctaacat
ctgaggactcagcgtctattctgtgcaagaagaccattagttcggtagtagatttctactctgactactggggccagg
gaccacggctaccgctctctcaggctggaggtagatcaggtgagggtagctctggtagggtagatctgacattgagc
tcaccacgctctccaaatctatgctccatcagtagggagcagggtcagcgtcaccctgcaaggccagtcagaatgtgggt
actaatgtagccctggtagcaacagaaaccaggacaaatctctcaaccactgatttactcggcaaccctaccggcaacgtgg
agctccctgactgctctcaccaggcagtagatctgggacagatttcaactcctccatcaactaaagctcagctcgaagactggc
agactattctgtccaaataaaacaggatacctgacacagctcggggggggaccacagctggagatcaaacggcggc
cgaacttgaagttatgtatctctctctctccctgacaaatgagcagagcgaatggaaccattatctaatgtgaagggaaca
ccttctgcaagctccctatttccggacctctcaagccctttgggtgctgggtgggtgggtgggtgggtctctgctctgctata
gctgtgtagtaacagtgccctttatattttctgggtgagggtagagggagcaggctcctgcaacagtagctacatgaac
atgactccccgcgcctcgggcccacctcgcaagcattaccagccctatgctccctcaccgcgactctcgcagcctatgctc
cagagtgaagttcagcagggagcagcagggcctccctcagctaacagcagggccagaaaccagctctataacagagctcaact
aggacgaagagagggagctcagagttttggacaaagagacgtggcgggacccctgagatgggggggaaagccggagaag
gaagaaccctcagggaaggctgtacaaagaaactgcagaaagataagatggcggggccctacagtaggatgggatga
aaagcggagcgcgggaagggaaggggcaagatggctttaccagggctcagtagagccaccagggacacctcaga
cgcctctcaactgcaggccctcgcctctcgggactcggagcaaacaaatctcactctcaaacagcaggtagcgtgg
agggaaaccggaccctaggagacagaccacctctctgctatgggtactctctctctgggttcagggtccactggtagc
gggtgcagctgggtgggtcggggggagacttagtgaagcctggagggctcccctgaaacctcctgtgcagcctctggga
ttcaactctcagtggtctatggcatgctctgggtctgcagactcagacaaagggctgggtgggtcgcacaccatctctgti
gggtgctcttaccctactatccagacagtgtagggggcgaatccactcctcagagacaatgccaaagaccctctga
cctgcacaaagacagctcgaagctcagggatcagccatataattctgtgcaagctcctcaggggaatgctatggactc
ctggggtcaaggaaacctcagctaccgctctcctcaggtggaggtagatcaggtggaggtagatctgggtggaggtagatc
tagactgtgtagctcagctcagccacctgctctgtagctcagggagatagagctctctctctcctgcaggccagccag
actatgagcactctacactggtagcaacaaatcaactgagctcgaaggctctcaatcaaatctgtctcccaatccattt
ctgggtccccctcagggtcagtaggagtagatcaggctcagaattcactcctcagtagcaacagtagggaaacctgaagatg
ttggagtgtatctctgcaaaatggctcaggtttcctcggagctcgggtggggcaccacagctggaaatcaaaagcaaa
aaactcactcagaagaggatctgtaa

```

1928z CAR

P2A

B6H12.2 scfv

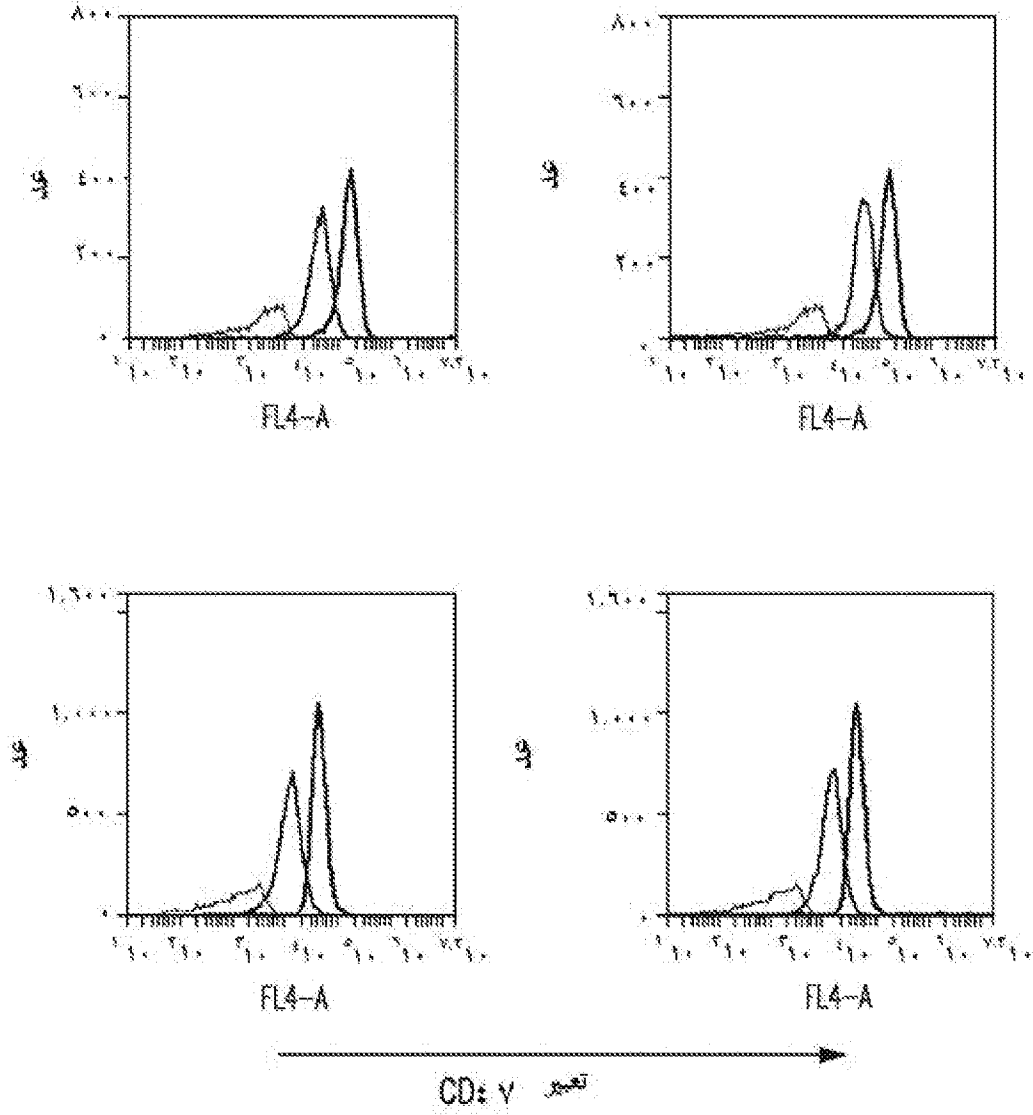
شكل ۵

4H1128z-2A-B6H12.2 (kappa leader) sequence

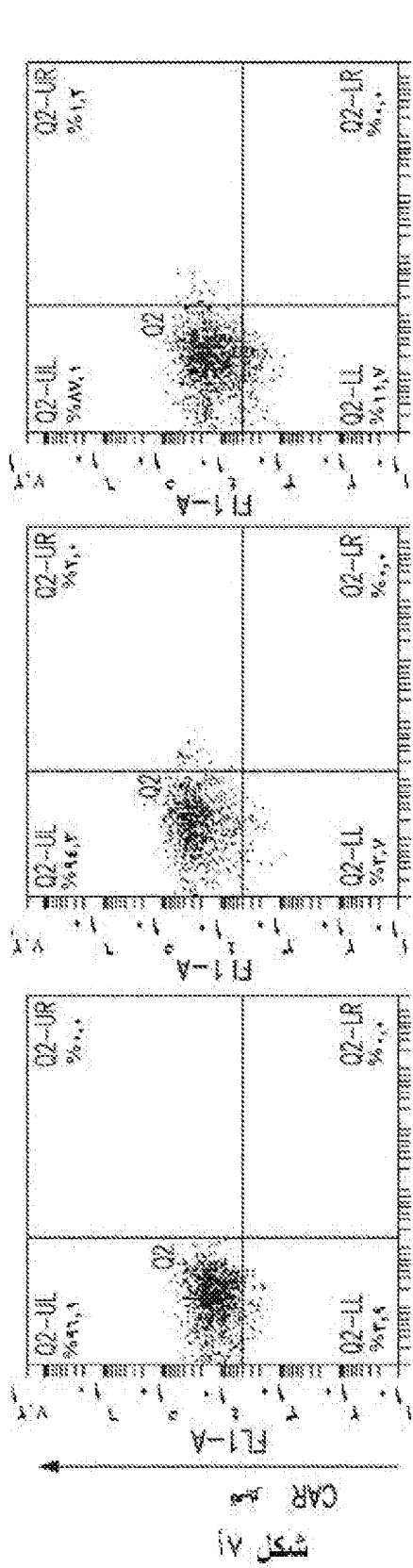
CATGGCTCTCCAGTCACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAG
 CTGCAGGAGTCAGGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGC
 CTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTCTGGGTTCCCTGAGTCCGGAGATGAGGCTG
 GAGTGGGTCCGAACCATAGCAGTGCCTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTGTCCAGGGA
 CGATTCACCATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGCACCTGCCAAATGGCCAGTCTGAGG
 TCTGGGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCAGGGATTTGGTAACTACGGTGATTAATAATG
 CTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGT
 GGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGGTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCT
 GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAG
 AACCCGAAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAACTGCTG
 ATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGCCAGTGGATCTGGG
 ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAG
 CAATCTTATAATCTACTgcaacaac tcttactactcaasacaagcagg tgcgtggggagaa tcccggaaccat
 ggagccagaccacc tcc tgc tctgggtact tct tgc tctgggt tccagg tccactgg tgcagggtgcagc tgg tggg
 tccggggggagct tagtgaagcctgggggg tccc tgaactctct tctg tgcagcc tctggat tcaact tccag tggc tctgg
 catgct tgggt tgc ccagac tccagacaagggc tgggtgggt tgc caaccat tct tagtgg tgg tact taccct tact
 atccagacag tgtgaagggggat tccacc tctccagagacaat tcccaagaccacc tgtacc tgc aatagacag tct
 gaag tctgaagataccaccatata t tctgtgcagataccc tgcgggaaatgc tatggactact tgggt tcaaggaacc
 tca tccagc tcc tccagg tggagg tggatccagg tggagg tggatc tgg tggagg tggatc tgc at tgtgat tga t
 cag tccagccacc t gct tgtgactccaggagatagag tctct t tcc tgcagggcagccagac taitageacta
 ct tcaactgg tatecaacaacaatcacatgag tcccaagg tctctcaatatt gct tcccaatccat tctgggatccct
 ccagg tca g tggc ag tggatcagg tca gatt tca c tctcog tatecaacag tgtggaa c tgaog atgt tgggtgtat
 tactgtcaaatgg tccggct t tcc tggagcgt tgg tggaggcaccsagc tggaa tcaaggaaccacaac tcat t
 cagaagggatc t g taa

4H1128z CAR
 P2A
 B6H12.2 scFv

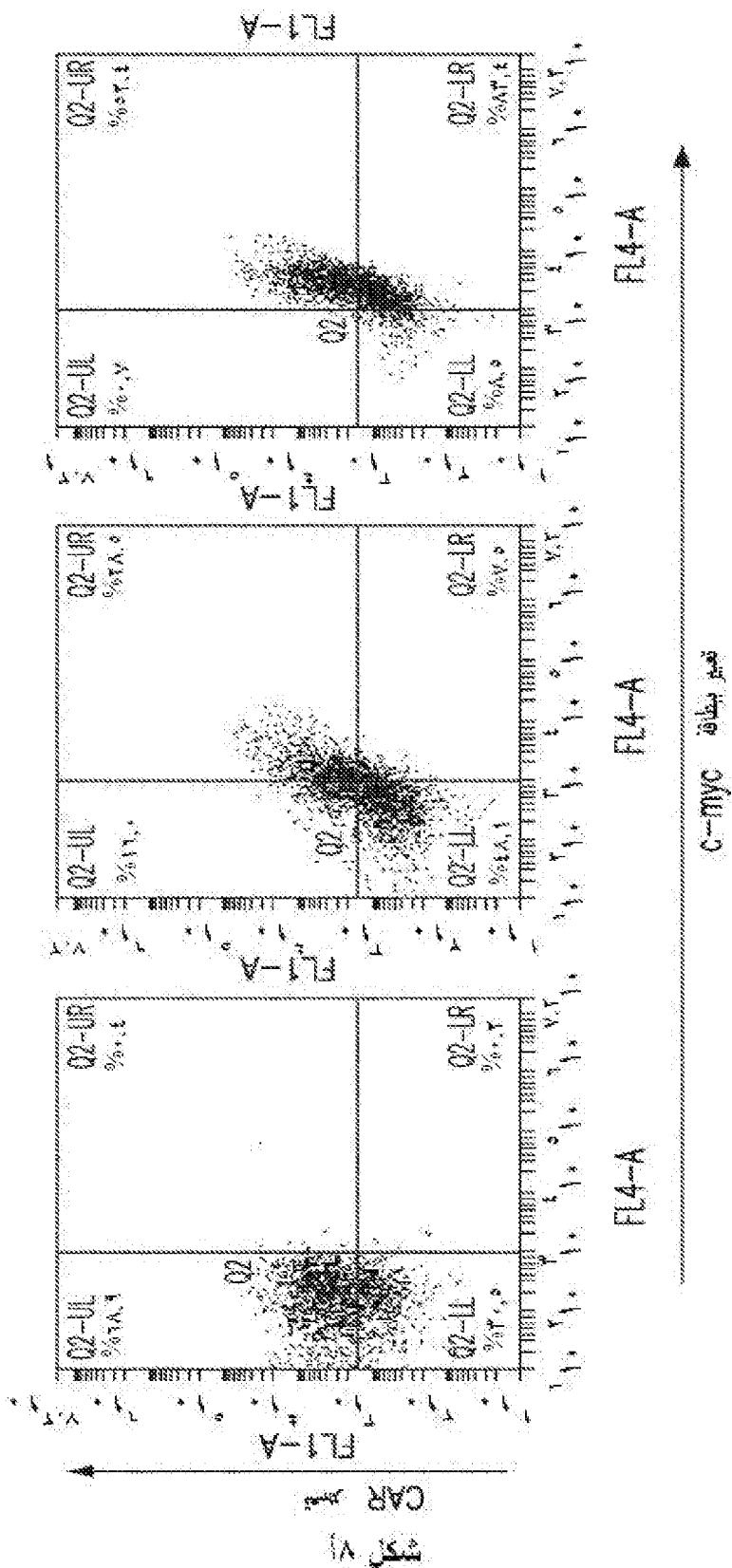
شكل ٦

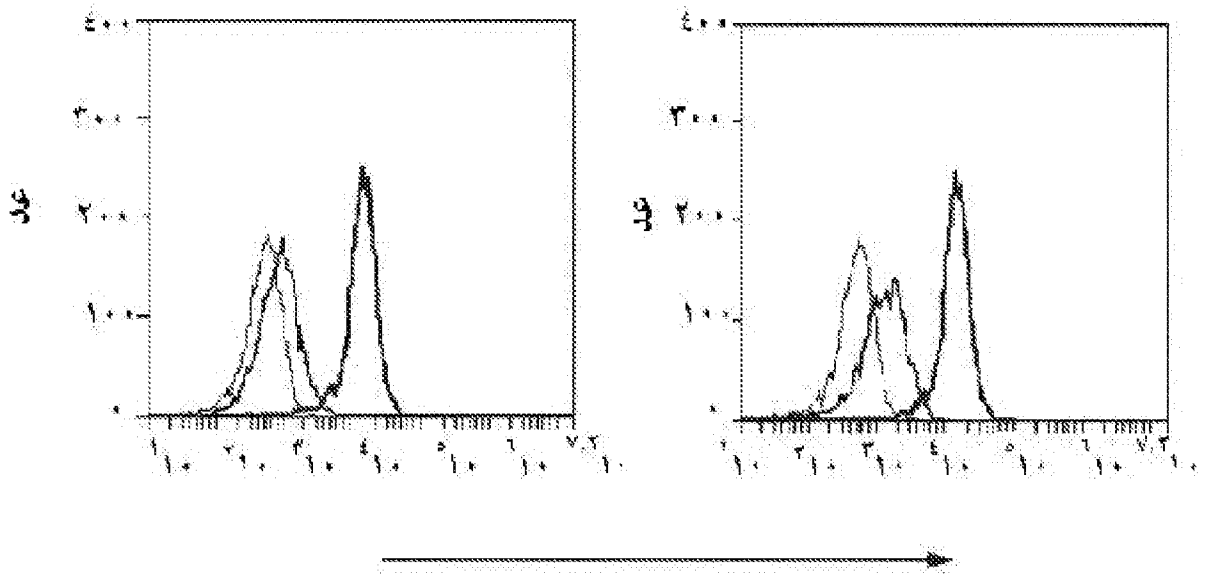


شکل ۷ ب

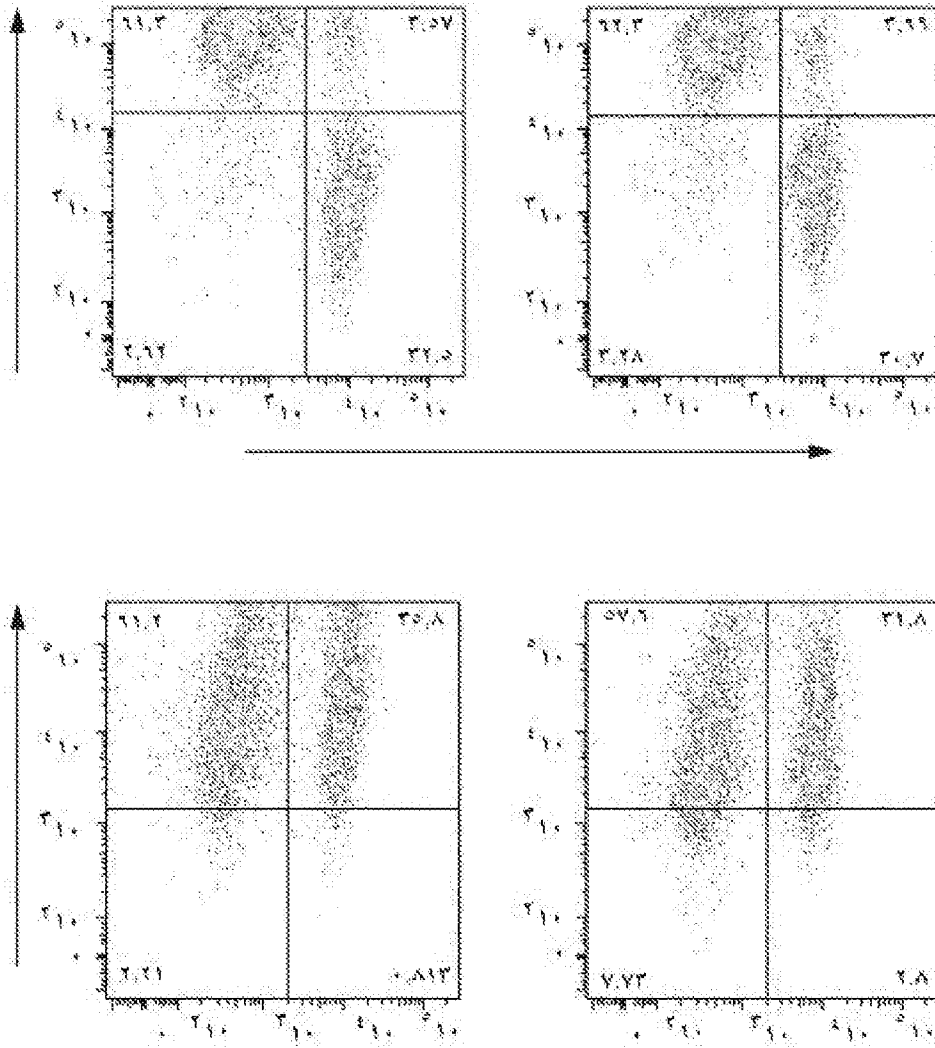


1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

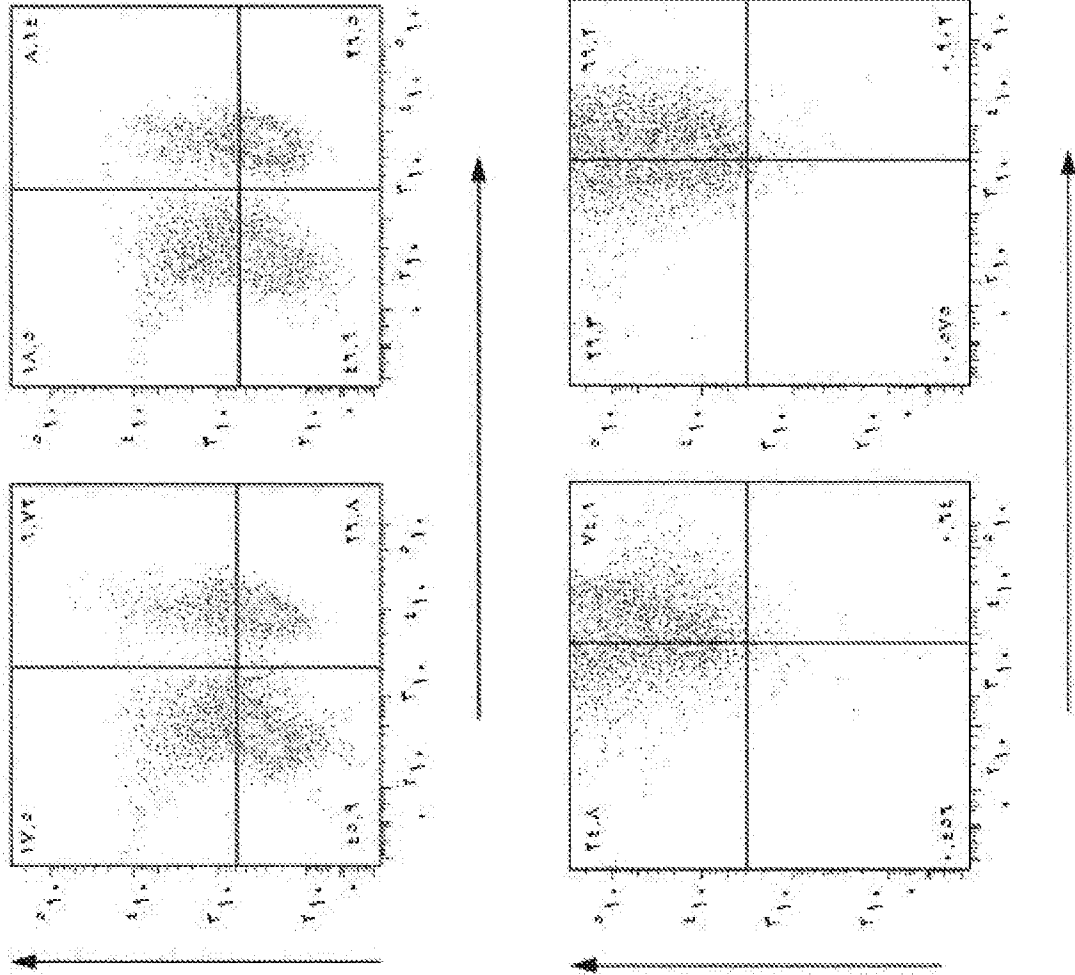




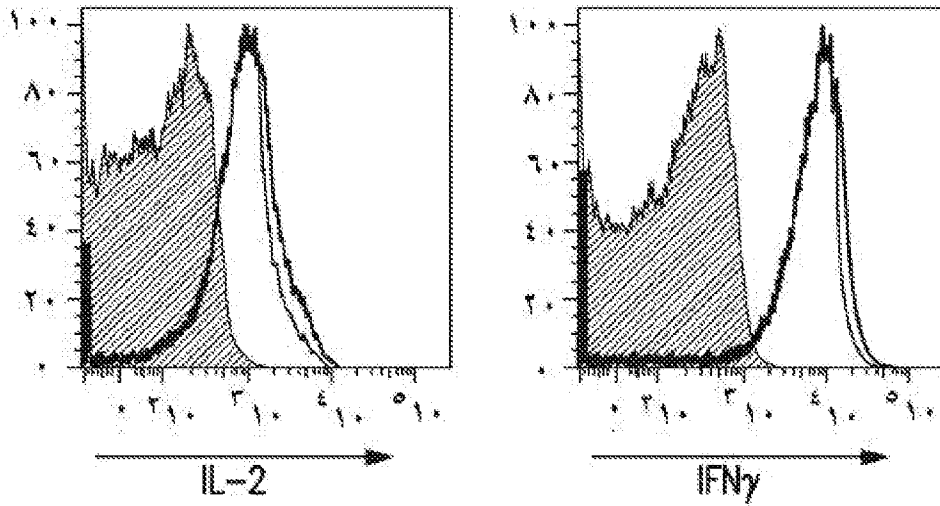
شکل ۸ ب



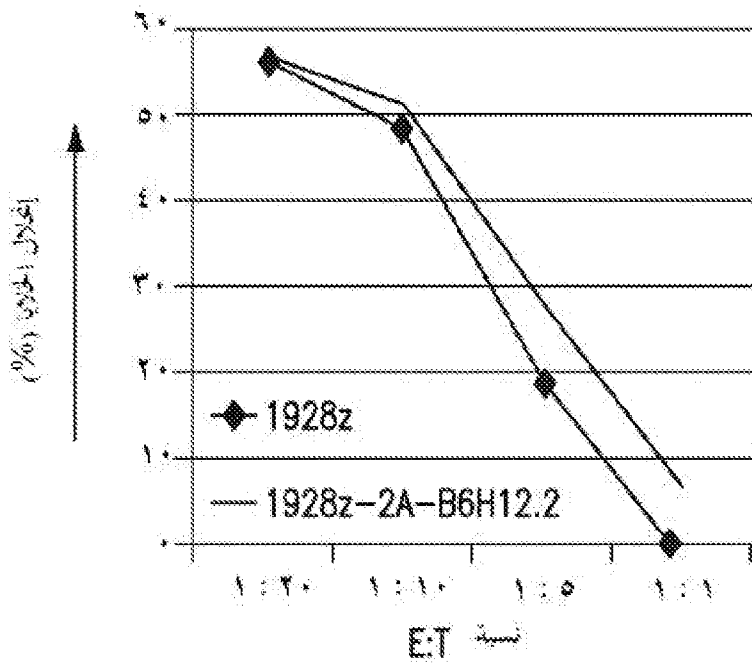
شکل ۹



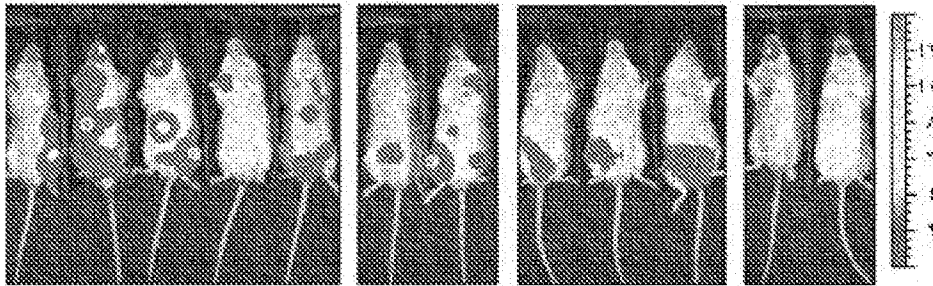
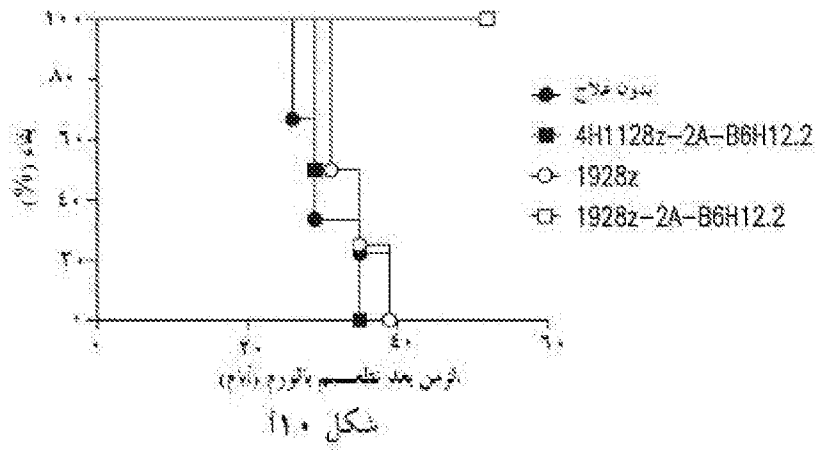
شکل ۱۹



شکل ٩ ب



شکل ٩ ج



شكل 10 ب

5C4-scFy with Kappa leader sequence

| | |
|--|--------------------------------|
| Kappa leader sequence | |
| ATG GAG ACA GCA CTC CTC GTA TGG GTA CTC CTC TCC GTT GAA GGT TTC AGT GAT GAC CAG CTG GAG CTC GTC GAG TCT GAG GCA GGC CTC CTC
M E T D T L L L L W V L L L W V P C S T G D Q V Q L Y E S G G G V V | |
| GAG GGT GGG AGG TCC CTC AGA CTC GAG TGT AAA GGC TGT GGA ATC AGC TTC AGT GGC ATG TGG GTC GAG GGT CCA GGC AAG GGG CTCG
Q P G R S L R L D C K A S G I F S N S P M H W V R Q A P G K G L | |
| GAG TGG GTG GCA GTT ATT TGG TAT GAT GGA AGT AAA ABA TAC TAT GAA GAC TDC GTG AAG GGC CCA TTC ACC ATC TDC AGA GAC AAT TCC AAG AAC AGS
E W V A Y I W Y D G S K R Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T | 5C4 VH sequence |
| CTG TTT CTC GAA ATG AAC AGC CTC GAG GAG GAG AGG GCT GTG TAT TAC TGT GGG ACA AAC GAC GAG TAC TGG GAG ACC GSA ACC GTS GTC AGC CTC
L F L Q H N S L R A E D A V Y Y A T H D D Y W B Q G T L V T Y | |
| TCC TCA AGT GGA GGT GGA TCA GGT GCA GGT GCA TCT GAT GGA GGT GGA TCT GAA ATT GTG TTG ACA GAG TCT CCA GGC ACC CTC TCT TTG TCT CCA GGG
S S C G C G S G G G C S C S G C G S E I V L T Q S P A T L S L S P G | Serine glycine linker sequence |
| GAA ACA GGC ACC CTC TCC AGG GCG AGT GAG AGT GTT AGT AGT TAC TTA GXC TGG TAC GAA CAG AAA GCT GGC CAG GGT CCG AAG CTC GTC ATC TAT GAT
E R A T L S C R A S C S V S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D | 5C4 VL sequence |
| GCA TCC AAC AGG GGC AGT GGC ATC CCA GGC GGT TTC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC AGT GGC
A S N R A T G I P A R F S G S G S E T D F T L I S S L E P E D F A | |
| GTT TAT TAC TGT CAG CAG AGT ACC AAC TGG GCT CCG AGG TTC GGC GAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG TAA
V Y Y C Q Q S S N W P R F G G G T K V E I K E Q K L I S E E D L * | C-myc tag sequence |

1928z-2A-5C4 (kappa leader) sequence

atggcctcccagtgactgcccctactgcttcccctagcgtcttccctgeatgcagaggtgaagc tgcagcagctcggg
gclgagc tgg tgaagcc tgggctcc tca g tga gatt tcc tgc aaggct tctggc latgc attc ag tgc t ac tggatgaa
ctgggtgaagcagagggc tggacagggct tggatggat tggacagatt tacc tggagatgg tga tacc taccat
ggaang tccaggg tcaagccacactgactgcagcacaatcc tccagcagcc taca tgcagc tca g cggc taccat
ctgaggactc tgggtctattctgtgcaggaagccat tgg t tgg tggat tctact t tgc t ac tgggcccagg
gacc aegg tacc gctcc tca ggtggagg tggatcagg tggagg tggatctgg tggagg tggatctgacat tggc
tacc cagctcc acaat tca t g tcc acatc ag tgg gac aggg tca g c tca c tgc aaggcc ag tca g a t g tgg t
acta at g tgc c tgg tca aca gaa cca gga caat tcc taa cca c tga t tacc tgg caacc tacc gga cag tgg
ag tcc tga tgc tca cag gca g tggatc tgggacagatt tca c tca cca tca c taa c tgc ag tca aag c tggc
ag c t a t t c t g tca cca a t a a c a g g t a c c g t a c a c g t c c g g g g g g a c c a a g e t g g a g a t c a a c g g g c g c
c g e a a t t g a a g t a l g t a t c c t c c t t a c t a g a c a a t g a g a g a g c a a t g g a c c a t t a t c a t g t g a a g g g a a c a
c c t t g t c a a g t c c c l a t t c c c g g a c c t t c a a g c c t t t g g g t g c t g g t g g t g g t g g a g t c c t g g t t g c l a t a
g c t g c l a g t a a c a g t g g c t t a t t a t t c t g g g t g a g g a t a a g a g g a g c a g g c t c t g c a c a g t g a c t a c a t g a a c
a t g a t c c c c g c c c c c g g c c a c c c g c a g a t l a c c a g c c l a t g c c c a c a c g c g a c t t c g c a g c t a t c g c t c
c a g a g t g a a g t t c a g c a g g a g c g c a g a g c c c c c g c t a c c a g c a g g g c c s g a a c c a g c t c t a a c g a g c t a a t c t
a g g c a a g a g a g g a g t a c g a t g t t t g g a c a a g a g a c g t g g c c g g g a c c t g a g a t g g g g g a a g c c a g a a g
g a a g a c c c t c a g g a a g g c t g t a c a a t g a a c t g c a g a a a g a t a a g a t g g c g g a g g c t a c a g t g a a t t g g a t g a
a a g g c g a g c g c c g g a g g g c a a g g g c a c g a t g g c t t t a c c a g g t c l e a g t a c a g c c a c c a a g g a c a c t a c g a
c g c c t t c a c a t g c a g g c c t g c c c c t c g c g g a t c t g g a g a a c a a t t c t a c t a c t a a a c a a g c a g g t g a c g t g g
a g g a g a t c c c g g a c c c **ATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGACTGCTGCTCTGGGTCCAGG**
TTCCACTGGTGACCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGT
CCCTGAGACTCGACTGTAAGCGTCTGGAATCACCTTCAGTA ACTCTGGCATGCACTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGCCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAAAAGATA
CTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTTT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGACAAACGACGAC
TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCCTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA
TCTGGTGGAGGTGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGTAGTTACTTAGCCTGGTACCAA
CAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCC
CAGCCAGGTT CAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGC
CTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT CAGCAGAGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGG
GACCAAGGTGGAATCAAAGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTA ACTCGAGGATCC

1928z CAR

P2A

5C4 scFv

شكل ١٢

4H1128Z-2A-5C4 (kappa leader) sequence

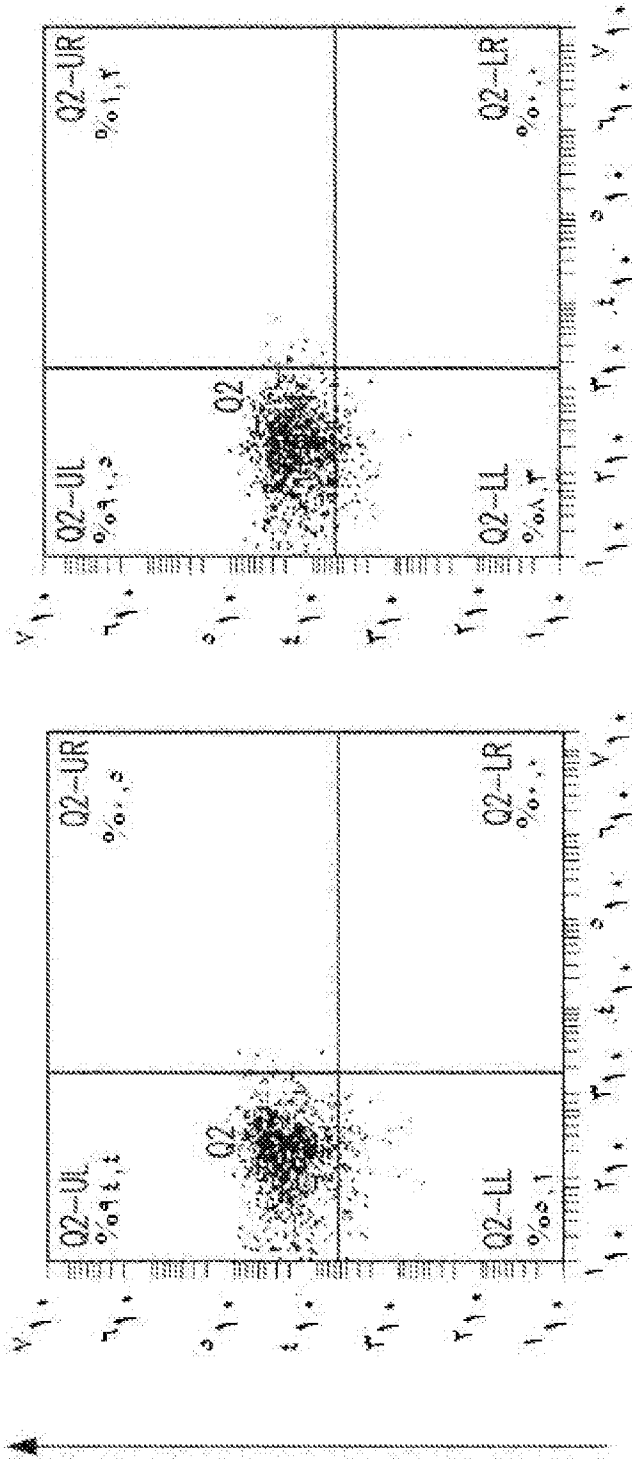
CATGGCTCTCCCAGTGA CTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAG
CTGCAGGAGTCAGGGGGAGGCTTCGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGC
CTCTGGATTCACITTCAGTAGCTATGCCATGTCTGGGTTCGCCTGAGTCCGGAGATGAGGCTG
GAGTGGGTGGCAACCATTAGCAGTCTGGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTGTGCAGGGA
CGATTACACATTTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGCACCTGCAAATGGGCAGTCTGAGG
TCTGGGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGCAGGGATTTGGTAACTACGGTGATTACTATG
CTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGT
GGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCT
GTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAG
AACCCGAAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAACTGCTG
ATCTACTGGGCATCCACTAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAG
CAATCTTATAATCTACTgcaacaacatctcactactcaaacccggcaggtagcgtggaggagaatccgggacc
ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTTCCACTGGTGA
CCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCSTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
CGACTGTAAAGCSTCTGGAATCACCTTCAGTAACTCTGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTC
CAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAGTTATTTGGTATGATGGAAGTAAAAGATACTATGC
AGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACAGCTGTTTCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGACAAACGACGACTA
CTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGA
TCTGGTGGAGGTGGATCTGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCA
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGTACTTAGCCTGGTA
CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG
GCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG
CCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGAGTAGCAACTGGCCTCGGACGT
TCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTA
ACTCGAGGATCC

4H1128z CAR

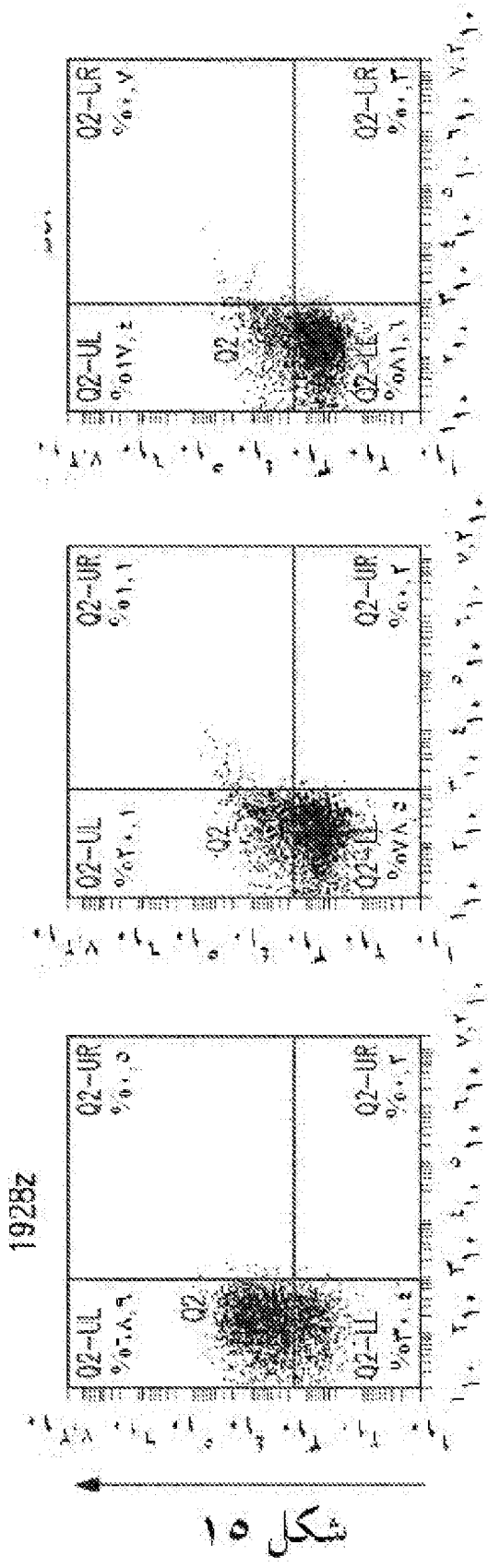
P2A

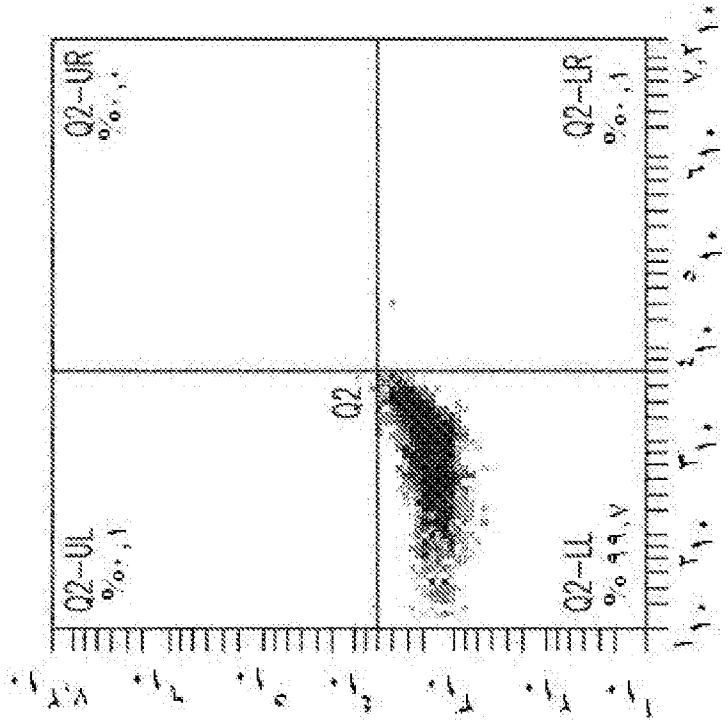
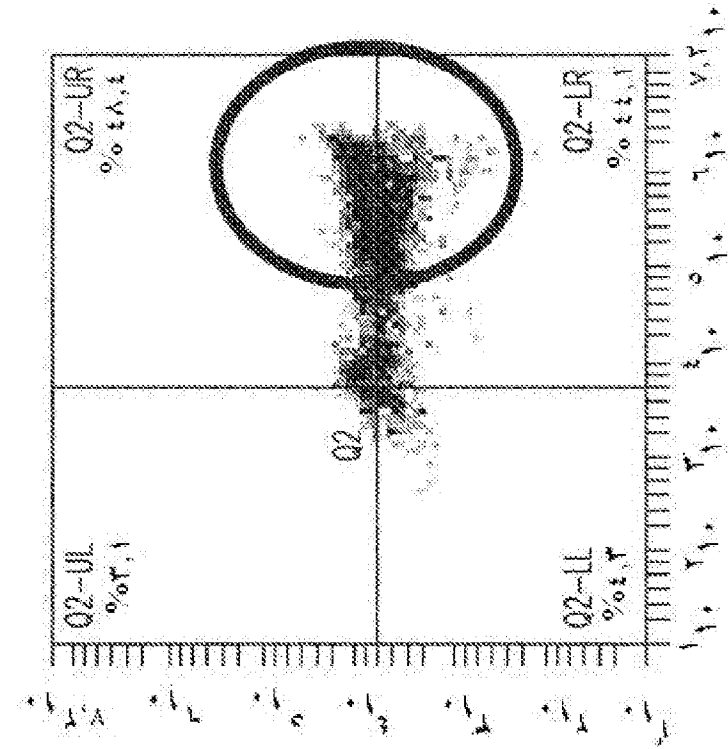
SC4 scFv

شكل ١٣

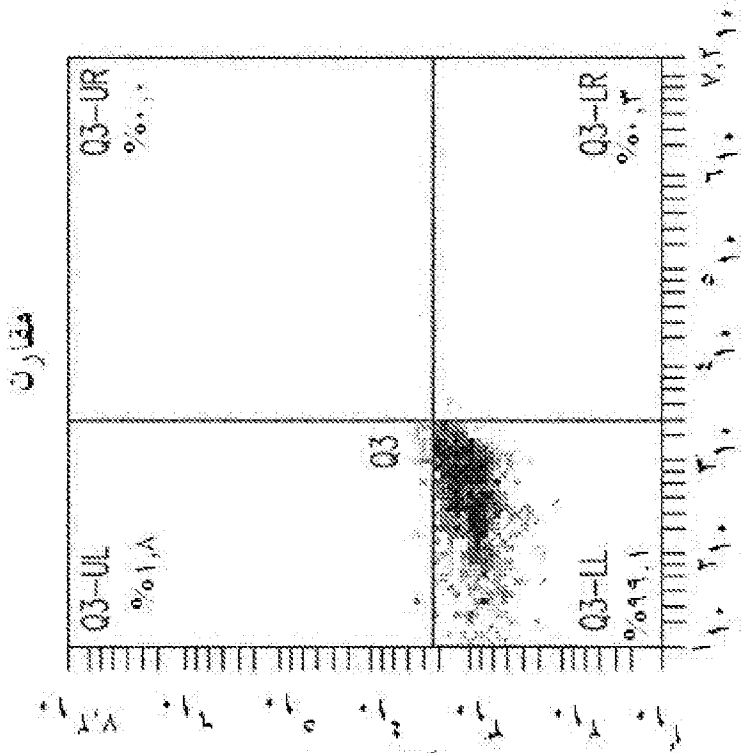
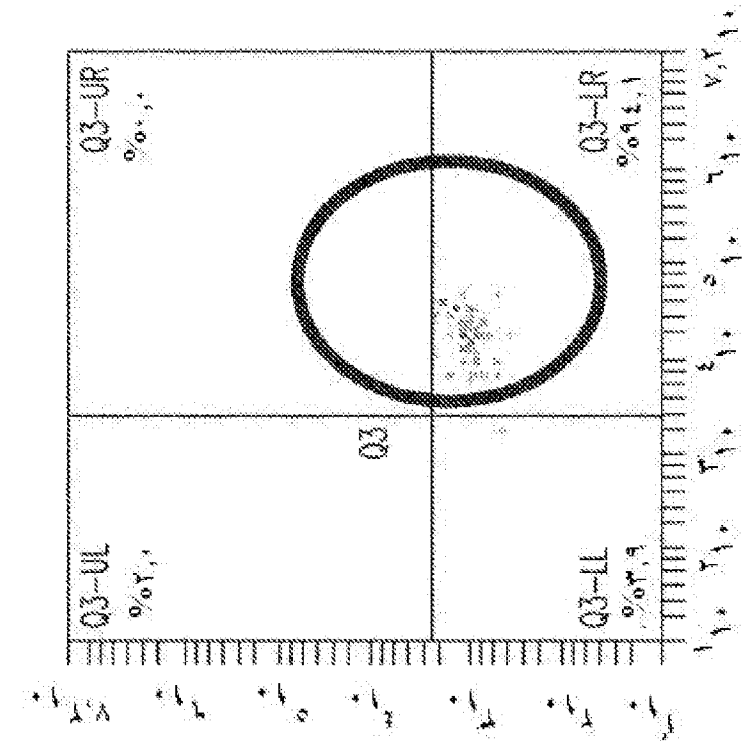


شکل ١٤

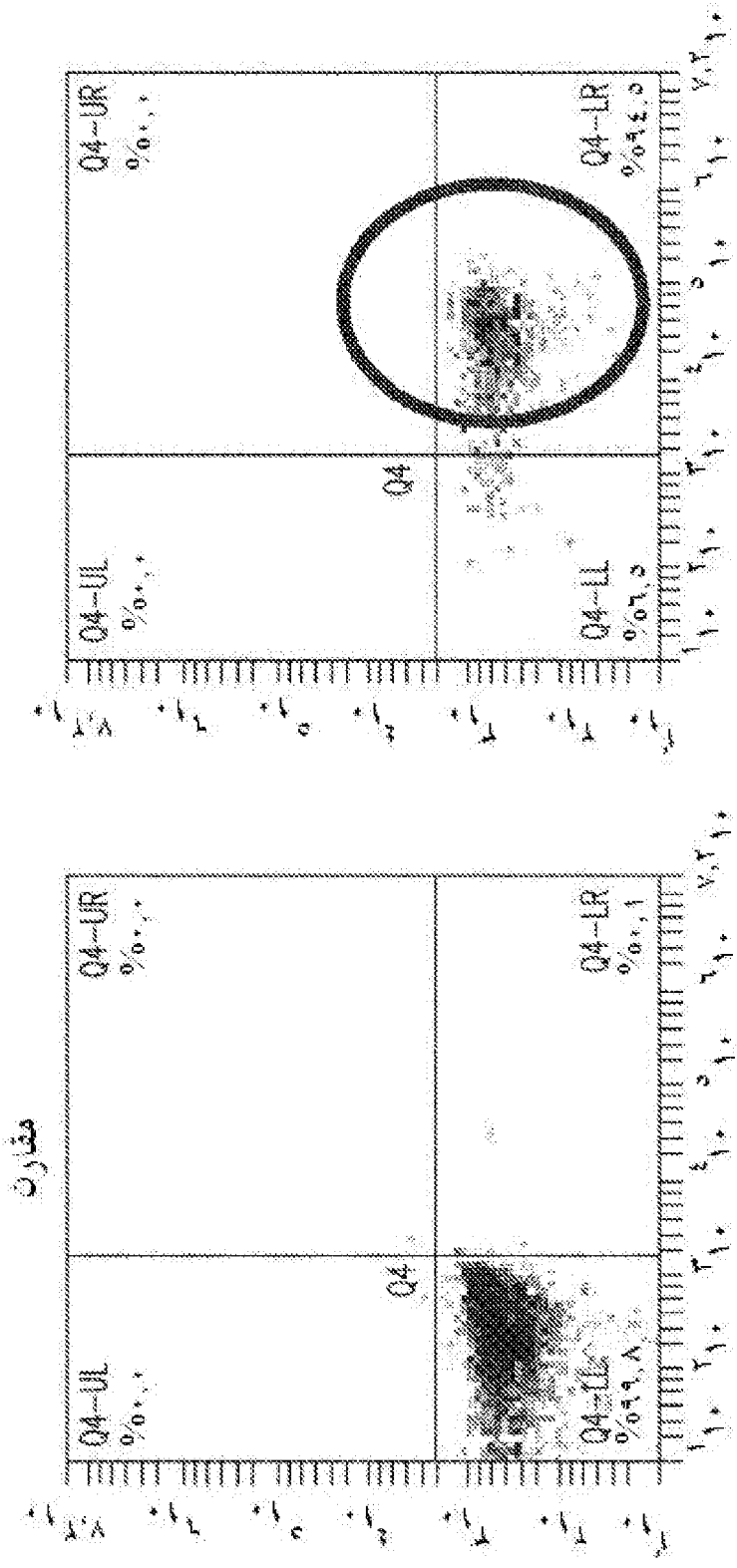




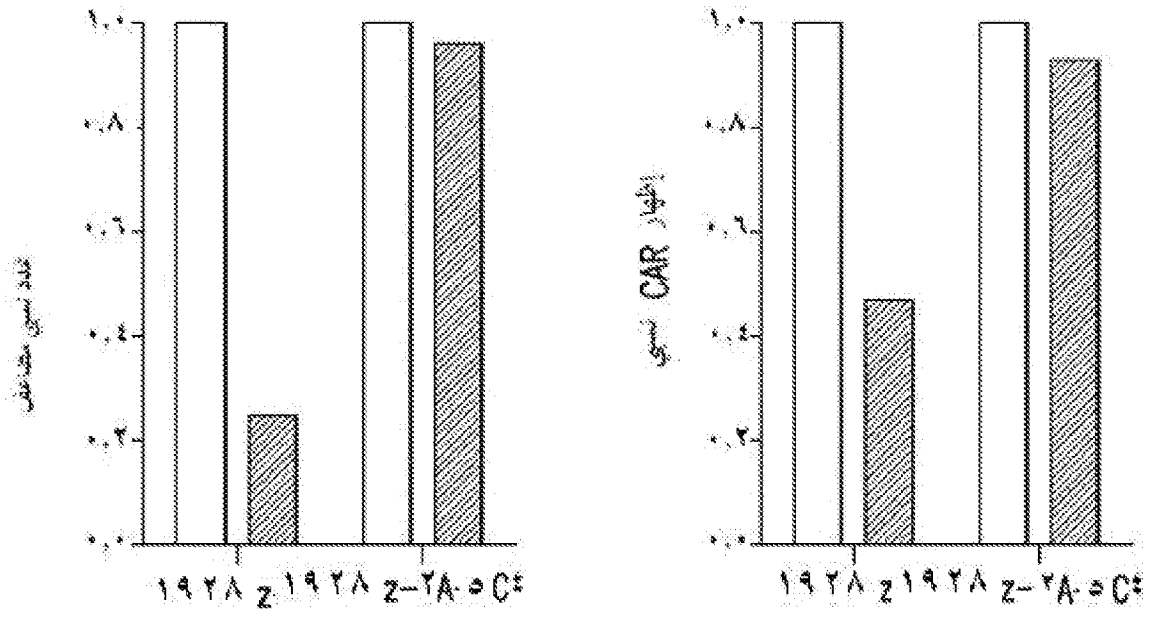
شکل ۱۱۶



شکل ۶ اب



شكل ١٦ ج



شکل ۱۷

J43 scFv with mouse Kappa leader sequence

| | | |
|---|--------------------------------|---|
| ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTC GTA TGG GTA CTC CTC TGG CTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC ATG GGA TTG GGA CTG CAG TGG GTT TTC TTT GTT | mouse Kappa leader sequence | M E E D T L L L W Y L L L W V P G S T G D M G L G L O W V F F V |
| GCT CTT TTA AAA GGT GTC CAC TGT GAG GGG CTT CTG GAG TGT GGT GGA TTA GTC AAC CCT GAG GGG TGA CTG AAA CTC TCC TGT GTG GGC | | A L L K G V H C E V R L L E S G G G L V K P E G S L K L S C V A |
| TCT CCA TTC ACC TTC AGT GAC TAT TTC ATG AGC TCG CTC CCG CAG CCT CCA CCG AAG GCG GTC GAG TCG GTT GGT GAC ATA TAC ACC AAA AGT TAT AAT | J43 VH sequence | S G F T F S D Y F W S W V R Q A P G K G L E W V A H I Y I K S Y W |
| TAT GGA ACT TAT TAC TCG GGT TCG GTC AAA GGC AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC GGA AGC ATG GTC TAC CTG GAA ATG AAC AGC CTG AGA ACT GAG | | Y A T Y Y S G S V K G P F T I S R D D S R S M V Y L Q W N N L R T E D |
| GAC AGC GGC ACT TAT TAC TGT AGA AGA GAT GGA AGC GGA TAT CCC TCT CTG GAT TTC TGG GGT CAA GGG ACC CAA GTC ACT GTC TCC TCA GGC ACA ACA ACA | | T A T Y Y C T R D G S G Y P S L D F W G Q C T Q V Y I V S S A I T Y T |
| GGC CCA TCT GTC TAT CCC TTG CCG GGT CCC TGT CAC ACC ACA ACC AAA TCG GGT CCA GGT GGA TCA GCT GCA GGT CCA TCT GGT GCA CGT GGA TGT TAT | Serine Glycine linker sequence | A P S V Y P L A P A C D S I T K S G C G C G S G G G G S G G G S Y |
| GAG CTG ACT CAG CCT TCA GCA TCA GTC AAT GTA GGA GAG ACT GTC AAA ATC ACC TCC TCT GGC GAC CAA TTG CCG AAA TAT TTT GCA GAT TGG TTT | | E L T Q P P S A S V N V G E T V K I T C S G D Q L P K Y F A D W F |
| CAT CAA AGG TCA GAC CAG ACC ATT TTG CAA GTC ATA TAT GAT AAT AAG CCG CCC TCG GGG ATC CCT GAA AGA ATC TCT GGG TCC AGC TCA GGG ACA | J43 VL sequence | H Q R S D Q T I L Q V I Y D D N K R P S G I P E R I S G S S G T |

ACA GCC ACC TTG ACC ATC AGA GAT GTC CCG CCT GAG GAT GAA GGT GAC TAT TAC TGT TTC TCA GGA TAT GTT GAT AGT GAT ACC AAA TTG TAT GTT TTT GGC
 T A T L T I R D V R A E D E G D Y Y C F S G Y Y D S D S K L Y V F G
 AGC GGA ACC CAG CTC AEC GTC CTA GGT GGA CCC AAG TCT TCT CCC AAA GTC ACA GTG TTT CCA CCT TCA CCT GAG GAG CTC CCG ACA AAC AAA GGC ACA
 S G T Q L T V L G G P K S S P K V T V F P S P E L R T N K A T
 CTC GTG TGT GTT AAT GAC TTG TAC CCG GGT TCT GCA ACA GTC ACC TGG AAG GCA AAT GGA GCA ACT ATC AAT GAT GGG CTC AAG ACT ACA AAG CCT
 L Y C L V N D F Y P G S A T V T W K A N G A T I N D G Y K T T K P
 TCC AAA CAG GGC CAA AAC TAC ATG ACC ACC TAC CTA AGT TTG ACA GCA GAC TGG AAA TCT CAC AAC AGG GTT TCC TCC CAA GTT ACC CAT GAA
 S K Q G Q N Y W T S S Y L S L T A D Q W K S H N R V S C Q V T H E
 GGC GAA ACT GTG CAG AAG AGT TTG TCC CCT GCA GAA TGT CTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG TAA
 G E T V E K S L S P A E C L E Q K L I S E E D L *

J43 VL sequence

c-myc tag sequence

1231

19m28mzIRESJ43(mouse Kappa leader)sequence

CATGGCTCTCCCACTGACTGCCCTACTGCTTCCCTAGCGCTTCTCCTGCATGCAGAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGG
 CTGAGCTGGTGAAGCCCTGGCTCCTCAGTGAACATTTCTGCAAGCCCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAC
 TGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGCTCTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTATACTAATACTACAATGG
 AAAGTTCAAGGCTCAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAGGCTAGATGCAGCTCAGCGGCTAACATCTG
 AGGACTCTGGCTCTATTTCTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTCGCGCCAAGGG
 ACCACGCTCACCCTCTCCTCAGGTGGAGTGGATCAGGTGGAGSTGGATCTGGTGGAGTGGATCTGACATTGAGCTCAC
 CCAGTCTCCAAAATTATGATGCACATCAGTAGGAGACAGGCTCAGCGTCACTGCAAGGCCAGTCAGAAATGTGGTACTA
 ATGTAGCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCTACCGGAACAGTGGATC
 CCTGATCGCTTACAGCCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCACTAACCTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGA
 CTATTTCTGTCAACAATAAACAGGTATCCGTACAGCTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCGGGGGCCCCAA
 TTGAGTTCATGTACCTCCGCTTACCTAGACAACCAGAGGAGCAATGGAACTATTATTACATAAAAGAGAAACATCTT
 TGTCACTACTCAGTCACTCTCCTAAGCTGTTTTCGGCACTGGTCTGGTTCCTGGAGTCTCTTTTGTATGGCTTCTACT
 GACAGTGGCTCTTTGTGTTATCTGGACAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTGAATACATGAACATGACTCCCC
 GGAGGCTTGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGCCCCCTGCCAGAGACTTTGCAGCGTACCGCCCCAGAGCAAAA
 TTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGCTCAATCTAGGGCGAAGAGA
 GGAATATGAGCTCTGGAGAAGAGGGGCTCCGGATCCAGAGATGGAGGCAAAACAGCAGAGGAGGAGAACCCCCAGG
 AAGGCGTATACAATCCACTGCAGAAAGACAAGATGCCAGAGCCTACAGTGAATCGCCCAAAAAGCGGAGAGACGGGAGA
 GGCAGGGGACAGATGGCTTTACGAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATCCCTTGCATATGCAGACCT
 GGGCCCTCCCTAACAGCCACTCGAGCATCCCGGCTCTCCCTCCCGCCGCTAADETTACTGGCCGAAGCCCTTCCAA
 TAAGCCGCGTGGCTTTGCTCFATATGTTATTTCCACCATATGGCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGAAACCTGG
 CCCTGTCTCTGACGAGCAITCCTAGGCGTCTTTCCCTCTCCCAAGCAATGCAGGCTCTGTGAAATGTCCTGAAGG
 AAGCAGTTCCTCTGCAAGCTTTCTGAAGACAACAAGCTCTGTAGCCAGCCTTTGCAGGGAGCGAAGCCCCACCTGGC
 GACAGGTGGCTCTCGGACCAAGGCCAGCTGTATAAGATACAGCTGCAAAAGCCGACAAACCCAGTGGCAGCTTGTGAG
 TTGGATAGTGTGGAAAGACTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCACAAAGGGGCTGAAGCATGCCAGAGGTACCCC
 ATTGTATGGGACTGTACTGGGGCCTCCGTCACATGCTTTACATGCTTTTACTCGAGCTTAAAAAACGCTTAGGCCCCC
 CGAAGCAGGGGAGCTGGTTTTCTTTGAAAACACAGATGATTAATATCGCCACAAAAGTCCATGGAGACAGACACTCC
 TGCTATGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGCATGGGATTGGACTGCAGTGGGTTTTCTTTTGTGCT
 CTTTTAAAGCTGTCCACTGTGAGGTCCGCTTCTGGAGTCTGGTGGAGGATTAGTGAAGCCTGAGGGCTCACTGAACT
 CTCTCTGTGGCTCTGATTACCTTCACTGACTATTTTCATGAGTGGGTCGCGCAGGCTCCAGGAAAGGGCTGGACT
 GGGTTGCTCACATATACAGAAAAGTTATAAATTATGCAACTTATTACTCGGGTCCGGTGAAGGACAGATTACCATTCTCC
 AGAGATGATCCCGAAGCATGGTCTACCTGCAAAATGAACAACCTGAGAACTGAGGACAGGCGCACTTATTACTGTACAAG
 AGATGGAAGCGGATATCCCTCTCTGGATTTCTGGGTCAGGGACCCAAGTCACTGTCTCTCAGCCACAACAAGAGCCC
 CATCTGCTATCCCTTGGCCCTGGCTGTGACAGCACAACCAANTCGGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGCTGGATCTGGT
 GGAGTGGATCTTATGAGCTGACTCAGCCACCTTCAAGTCAAGTCAATGTAGGAGAGACTGTCAAAATCACCTGCTCTGG
 GGACCAATTCGCGAAATATTTTGCAGATTGGTTTCATCAAAGGTCAGACCAGACCATTTTGAAGTGATATATGATGATA
 ATAAGCCGCCCCTGGGGATCCCTGAAAGAAATCTCTGGTCCAGCTCAGGGACAACAGCCACCTTGACCATCAGAGATGTC
 CGGCTGAGGATGAAGGTGACTATTACTGTTTCTCAGGATATGTTGATAGTGAAGCAAAATGATGTTTTTGGCAGCGG
 AACCCAGCTCACGCTCCTAGGTGGACCAAGTCTTCTCCAAAGTCAAGTGTTCACCCTCACCTGAGGAGCTCCGGA
 CAAAACAAGCCACACTGGTGTCTGGTTAATGACTTCTACCCGCTTCTGCAACAGTGAAGTGGAAAGCAAAATGGAGCA
 ACTATCAATGATGGGCTGAAGACTACAAGCCCTCCAAACAGGGCCAAAACACTACATGACCAGCAGCTACCTAAGTTTGAC
 AGCAGACCAGTGGAAATCTCAACAACAGGTTTTCTGCCAAGTTACCCATGAAGGGGAAACTGTGGAGAGAGTTTGTCCC
 CTGCAGAAATGTCTCAACAACAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAACCTGG

19m28mzCAR

IRES

J43 scFv

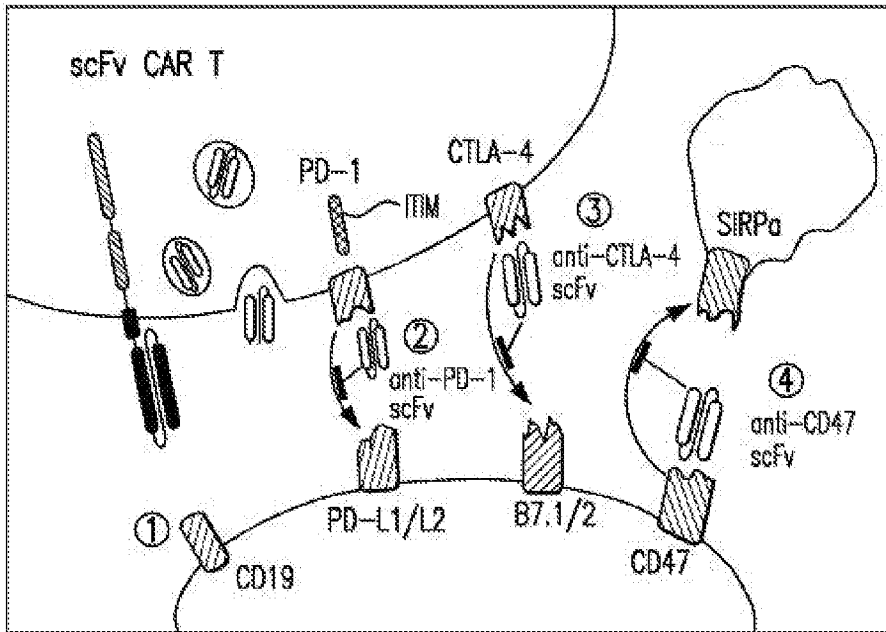
شکل ۱۹

4H11m28mziIRESJ43(mouse Kappa leader)sequence

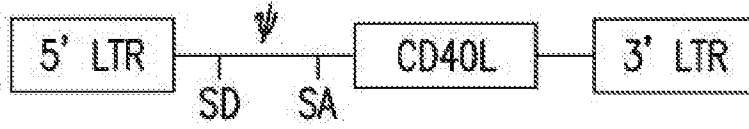
CTCTCCAGTACTGCCCTACTGCTTCCCCTAGCCCTTCTCCTGCATGCAGAGTGAAGCTGCAGGAGTCAAGGGGAGGC
TTGGTGAAGCCTGGAGGCTCCCTCAAAGTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATCACTTTCACTAGCTATGCCATGTCTGGGT
TCGCCCTGAGTCCGCAGATGAGGCTGCAGTGGTCCCAACCATAGCAGTCTGTGGTTACATCTTCTATTCTGACAGTG
TGCAGGACGATTACCATTTCAGAGACAATGCCAAGAACACCCGGCACCTGCAAAFGGGCAGTCTGAGGCTCTGGGGAC
ACGGCCATGTATTACTGTCCAACGCAGGGATTTGGTAACTAGGGTGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAAGGAC
CAGGCTCACGGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGGCTCACCC
AGTCTCCATCCTCCTGGCTGTGTCCAGCAGGAGAGAAGGTCATAAGCCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGT
AGAACCCGAAGAACCAGTTGGCTTGGTACCAGCAAAAACCAGGACAGTCTCCTGAAGTCTGATCTACTGGGCATCCAG
TAGGCAATCTGGAGTCCCTGATCCCTTACAGGCGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGG
CTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCCAGCAATCTTATAATCTACTGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGCGGGCGCCGAA
TTGAGTTCACTACCTCCGCTTACCTAGACAACCGAGCAGGAATGGAACTATTATTCACATAAAGAGAAAACATCTT
TGTCACTACTCAGTCACTCCTAAGCTGTTTTGGGCACTGGTGGTGGTCTGGAGTCTGTTTTGTATGGCTTGGTACT
GACAGTGGCTCTTGTGTATCTGGCAAAATAGTAGAAGGAACAGACTCCTTCAAAGTACTACATGAACATGACTCCCC
GGAGGCTGGGCTCACTCGAAAGCCTTACCAGCCCTACGGCCCTGCCAGAGACTTTGCAGGCTACCGCCCCAGAGCAAAA
TTCAGCAGGAGTGCAGAGACTGCTGCAACCTGCAGGACCCCAACCAGCTCTACAATGAGTCAATCTAGGGCGAAGAGA
GGAATATCAGCTCTGGAGAGAAGCGGGCTCGGGATCCAGAGATGGGAGCAAACAGCAGAGGAGGAGGAACCCCAAG
AAGCGGTATACAATGCAGTCCAGAAAGACAAGATGGCAGAAGCCTACAGTGAGATCGGCACAAAAGCGGAGCGGCGACA
GGCAAGGGGACAGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGCACTGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGTATATGCAGACCT
GGCCCTCGCTAACAGCCACTGAGAGATCGCCCTCTGGCTGCCCGCCCTAACCTTACTGCCCCGAAAGCCCTTGSAA
TAAGCCCGTGTGGCTTGTCTATATGTTATTTCCACCAATAGCCGCTCTTTGGCAATGTGAGGCCCCGGAAACCTGG
GCTGCTCTTCCAGGACATTCCTAGCGCTCTTCCGCTCTGCCAAGCAATGCAGGCTCTGTGATGTCTCTGAAG
AAGCAGTTCCTGTGGAGCTTCTTGAAGCAAAACCTCTGTAGCGAGCCTTGCAGGACCGGAAACCCCAACTGGC
GACAGTGGCTCTGCCAACAAGGCCAGCTGTATAAGATACACCTGCAAGGGCCACAAACCCAGTGGCAGCTGTGAG
TTGGATAGTTCTGAAAAGAGTCAAAAGCCTCTCCTCAAGCCTATTCAACAAGGGCCTGAAGSATGCCAGAAAGTACCCC
ATTGTATGGGATCTGATCTGGGCTCGGTCCACATGCTTTACATGTGTTTAGTGGAGTTAAAAAACGCTTAGGCCCCC
CGAAGCAGCGGGAGCTGGTTTTCTTTGAAAAACAGSATGATAATATGGCCACAAGTCCATGGAGACAGACACTCC
TGCTATCGGTACTGCTCCTCTGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACATGGSATGGGACTGCCACTGGCTTTCTTTGTTGCT
CTTTTAAAAAGGTGTCCACTGTGAGGTGGGCTTCTGGACTCTGGTGGAGGATTAGTGAAGCCTGAGGGCTCACTGAAACT
CTCCTGTGTGGCTCTGATTACCTTCACTGACTATTTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAST
GGGTTGCTCACATATACAGAAAAGTTATAATTAACAACTTATTACTGGGTCCGTTGAAAGGCAGATTACCATCTCC
AGAGATGATTCGGAAGCATGGTCTACTGCAAAATGAACAACCTGAGAAGTGAAGACAGGCCCATTATTACTGTACAAG
AGATGGAAGCGGATATCCCTCTCTGGATTTCTGGGGTCAAGGGACCAAGTCACTGTCTCCTCAGCCACAACAACAGCCC
CATCTGTCTATCCCTTGGCCCCTGCTGTGACAGCACAAACCAATCGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGT
GGAGGTGGATCTTATGAGCTGACTCAGCCACTTCAGCATCAGTCAATGTAGGAGAGACTGTCAAAAATCACCTGCTGTGG
GGACCAATTCGGAAATATTTTCAGATTGGTTTTCATCAAAGTCAAGCAGACCATTTTCCAAGTGATATATGATGATA
ATAAGCCGCCCTCGGGATCCCTGAAAGAACTCTCTGGGTCCAGCTCAGGGACAAACAGGCCACTTGACCATCAGAGATGTC
CGGGCTGAGGATGAAGGTGACTATTACTGTTCTCAGGATATGTTGATAGTATAGCAAAATTTGATGTTTTGGCAGCGG
AAGCCAGTCAAGCTCTAGGTGGACCAAGTCTTCTCCAAAGTCAAGTGTTCACCTTCACTGAGGAGTCCGGA
CAAACAAGCCACACTGTTGTCTGTTAATGACTTCTACCAGGTTCTGCAACAGTGAAGGCAAAATGGAGCA
ACTATCAATGATGGGGTGAAGACTACAAGCCTTCCAACAGGGCCAAAACATGACCAGCAGCTACCTAAGTTTGAC
AGCAGACAGTGGAAATCTCACAACAGGTTTCTGCCAAGTACCCTAGAGGGAAACTGTGGAGAAGAGTTTGTCCC
CTGCAGAAATCTCGAACA AAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGTAAGTCCAG

4H11m28mz CAR IRES J43 scFv

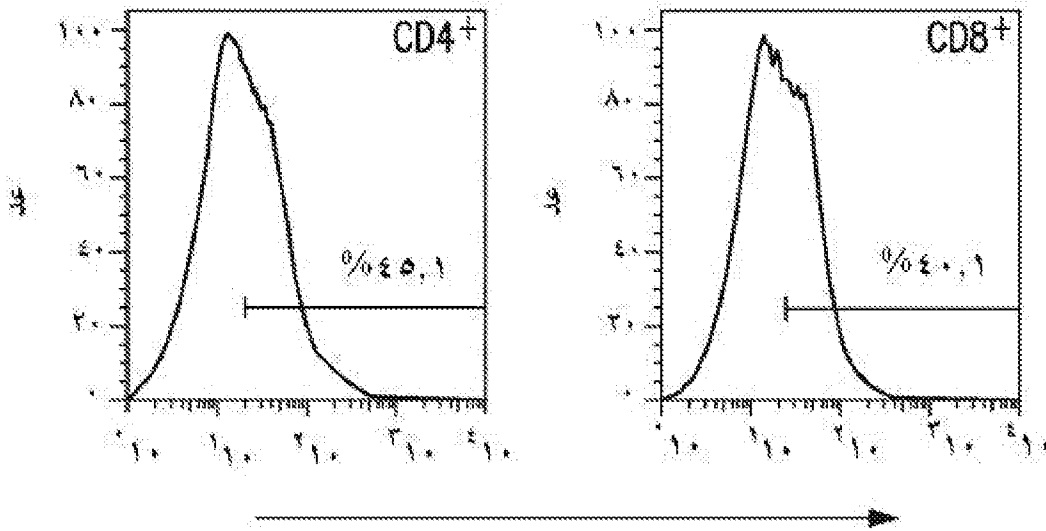
شکل ۲۰



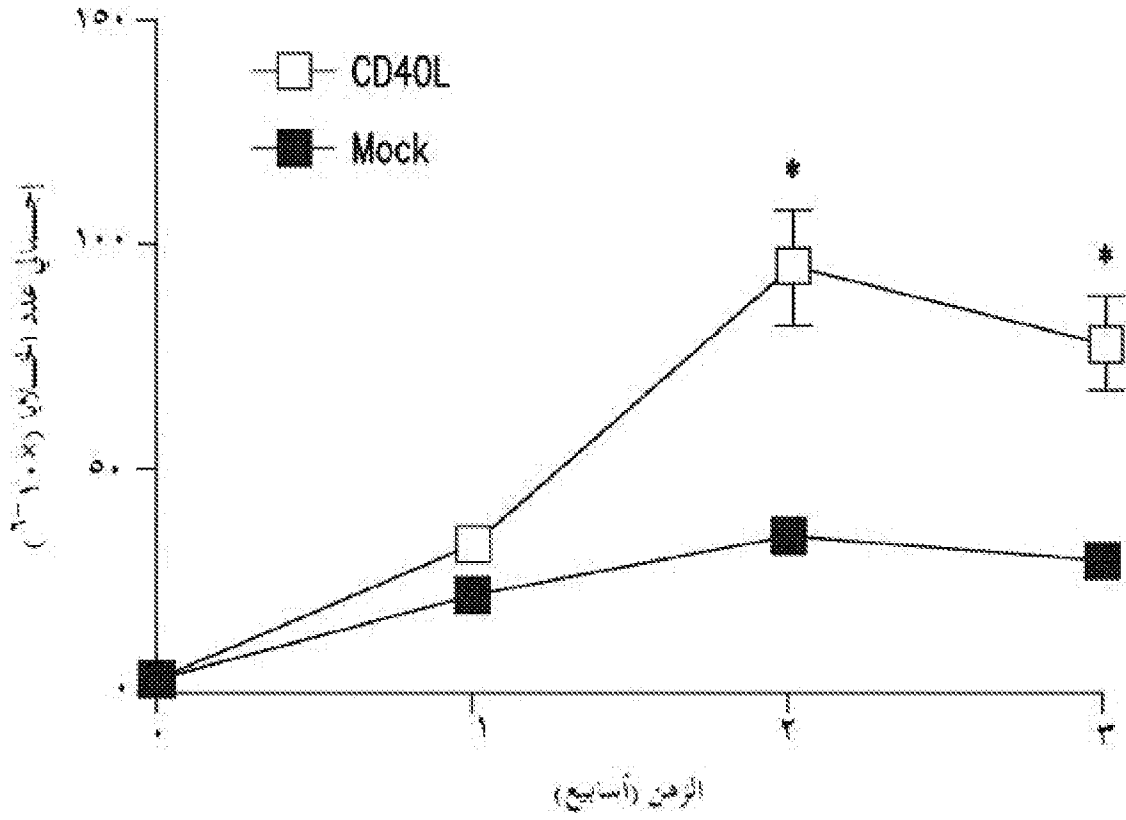
شکل ٢٩



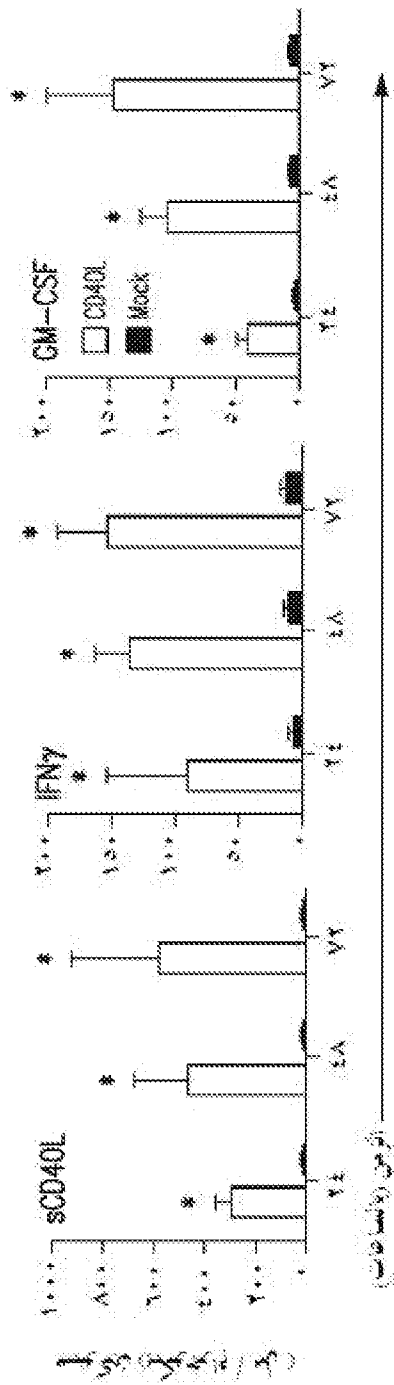
شکل ۱۲۲



شکل ۲۲ ب



شكل ٢٢ ج



شکل ۵۲۲

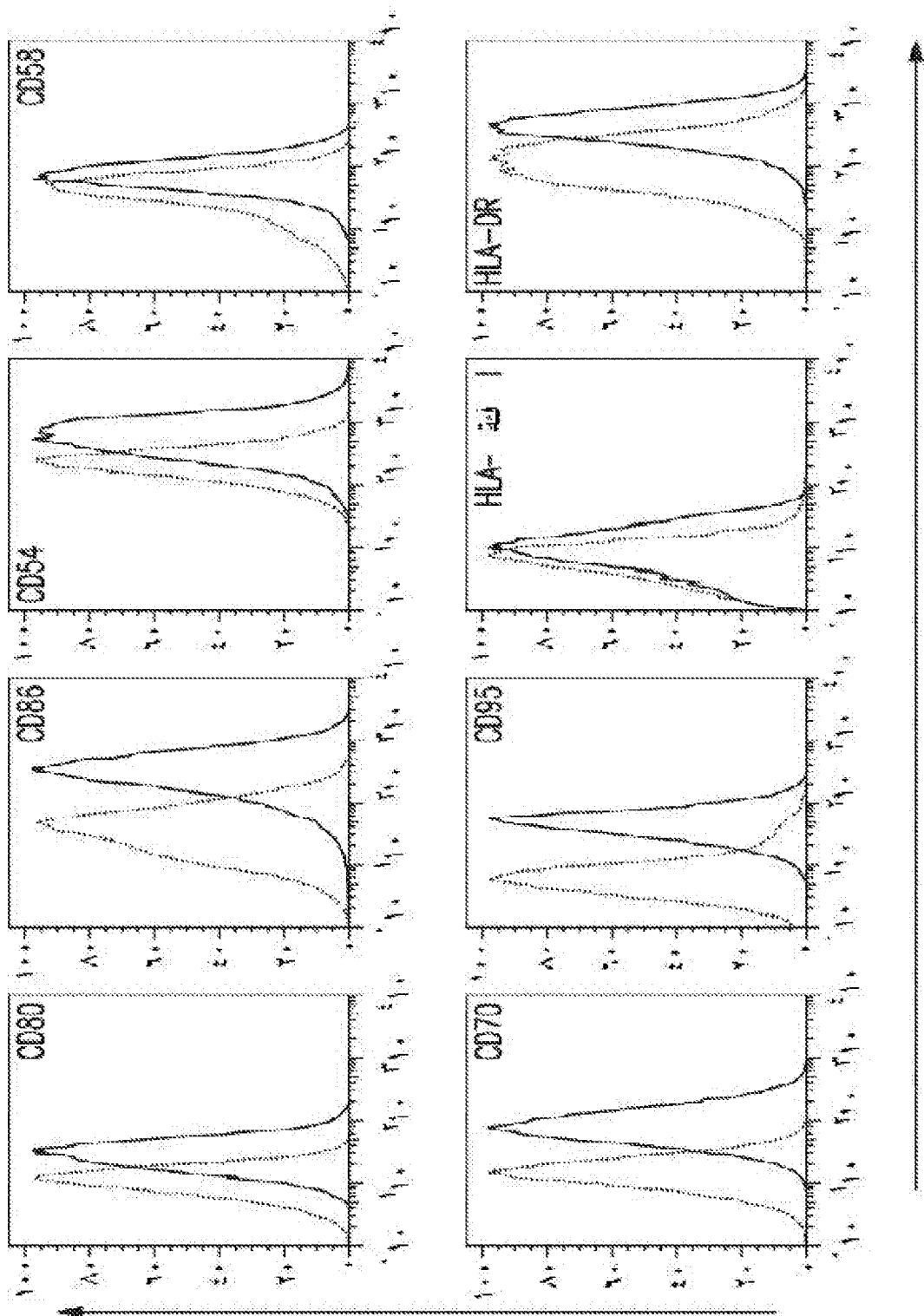
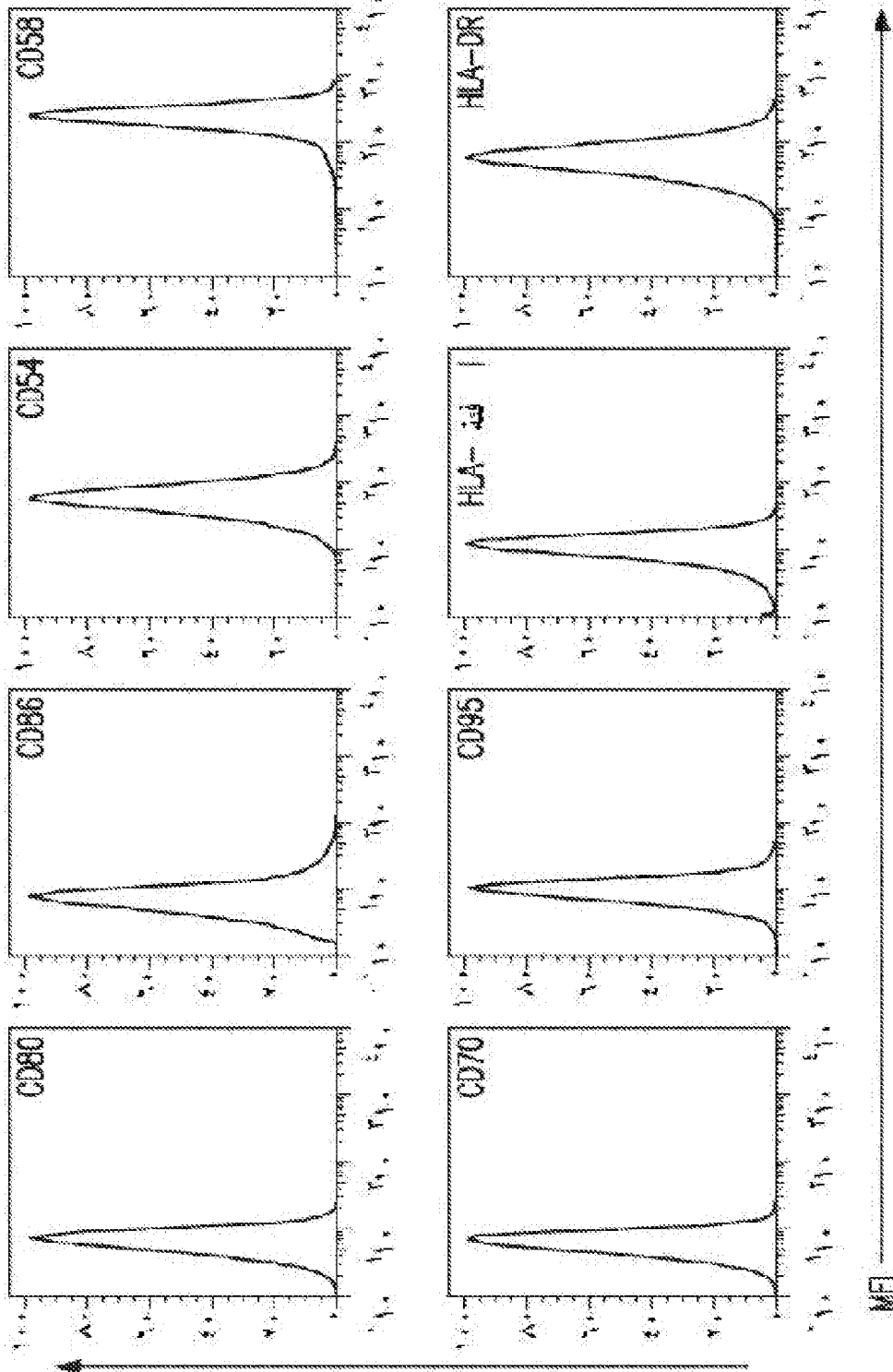
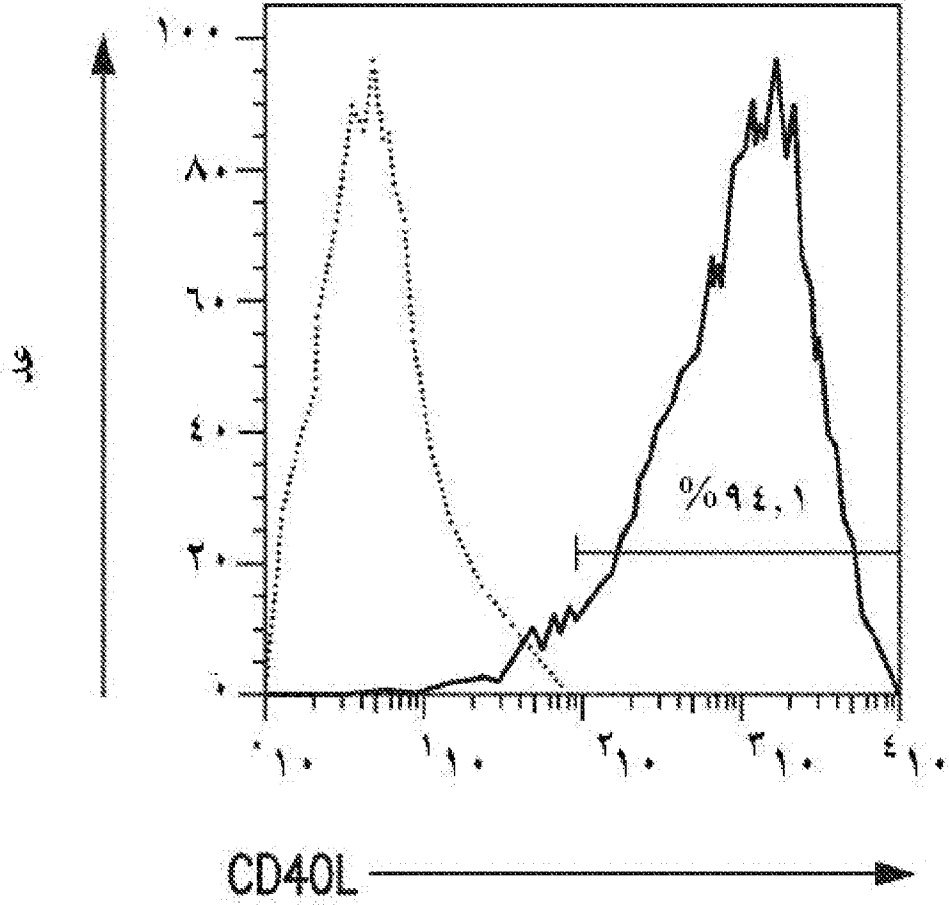


Figure 1

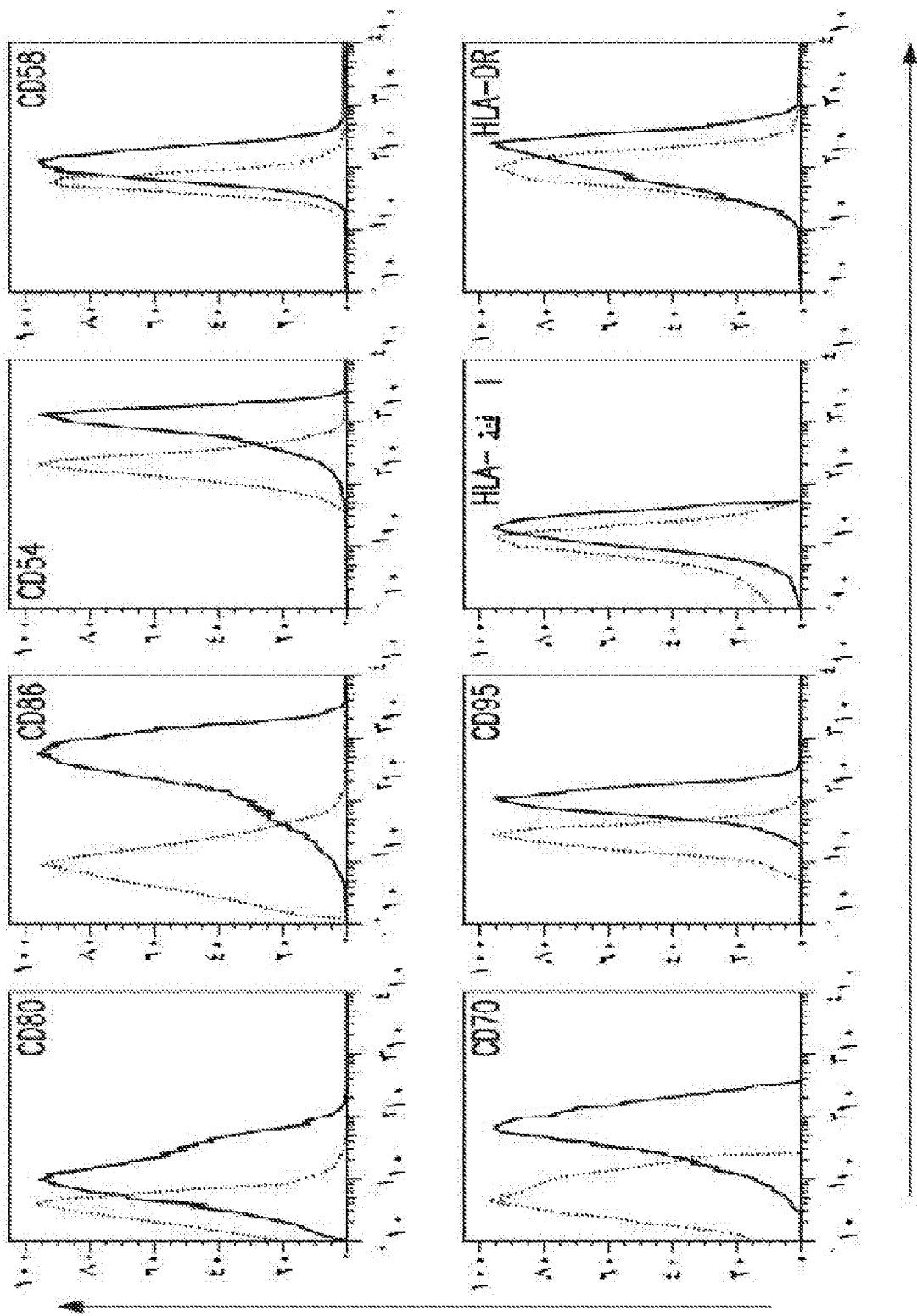
122

3

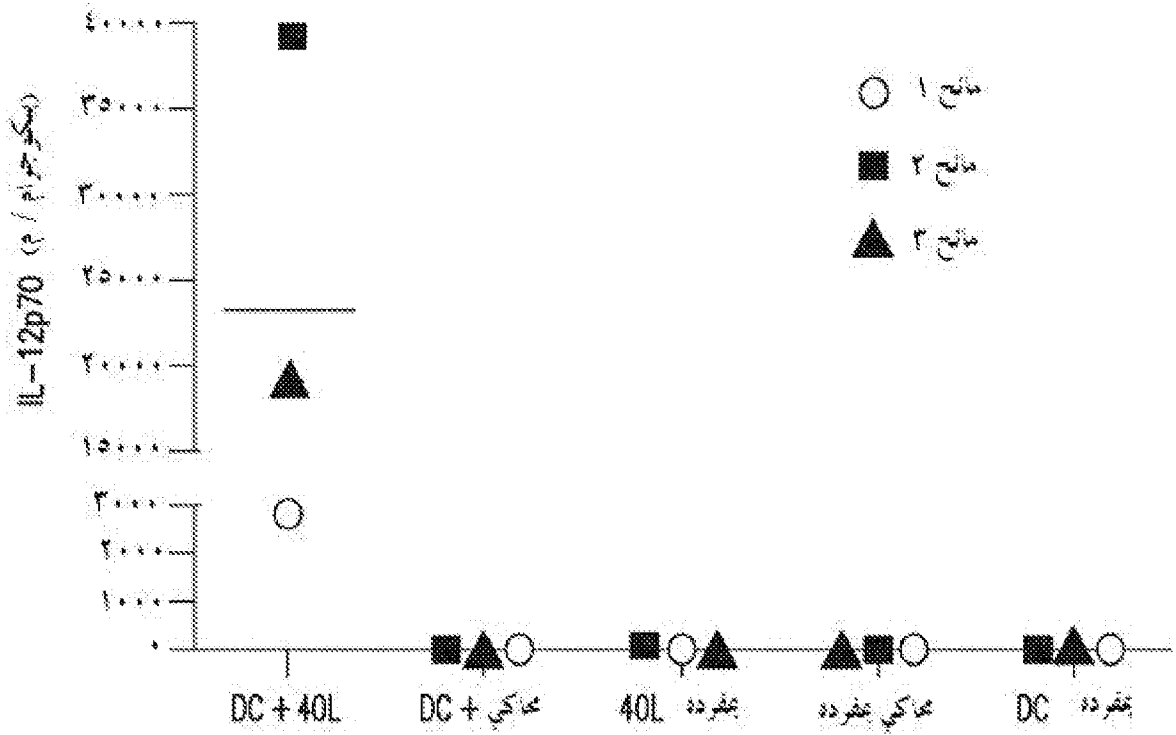




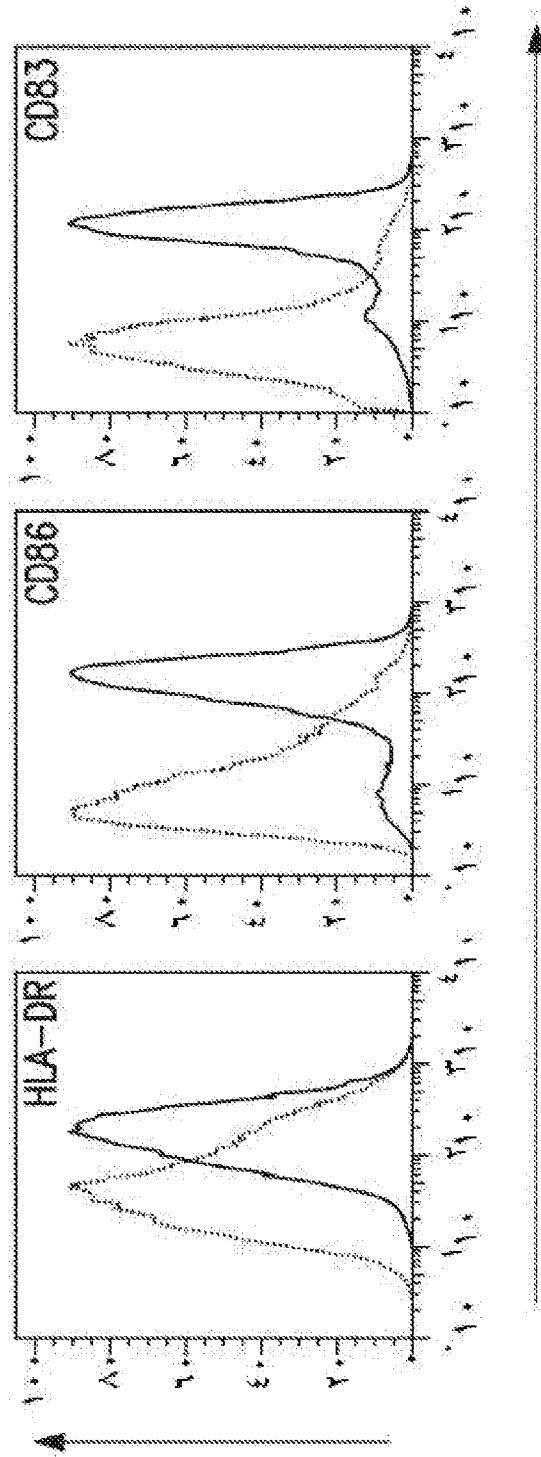
شکل ۲۴ أ



شکل ۲: ج

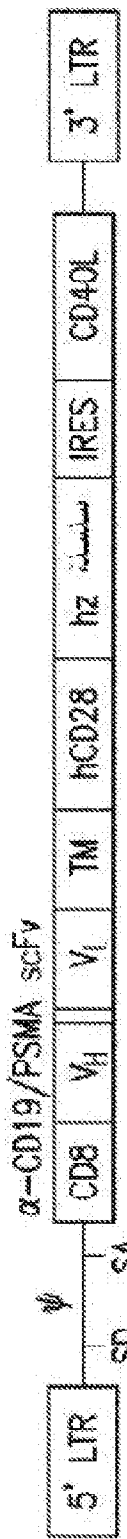


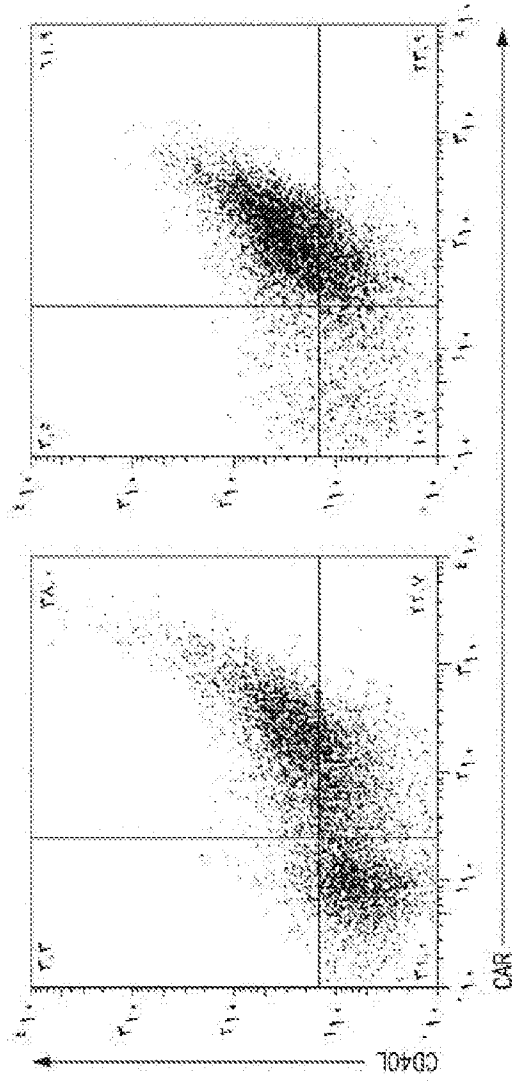
شکل ۲۵



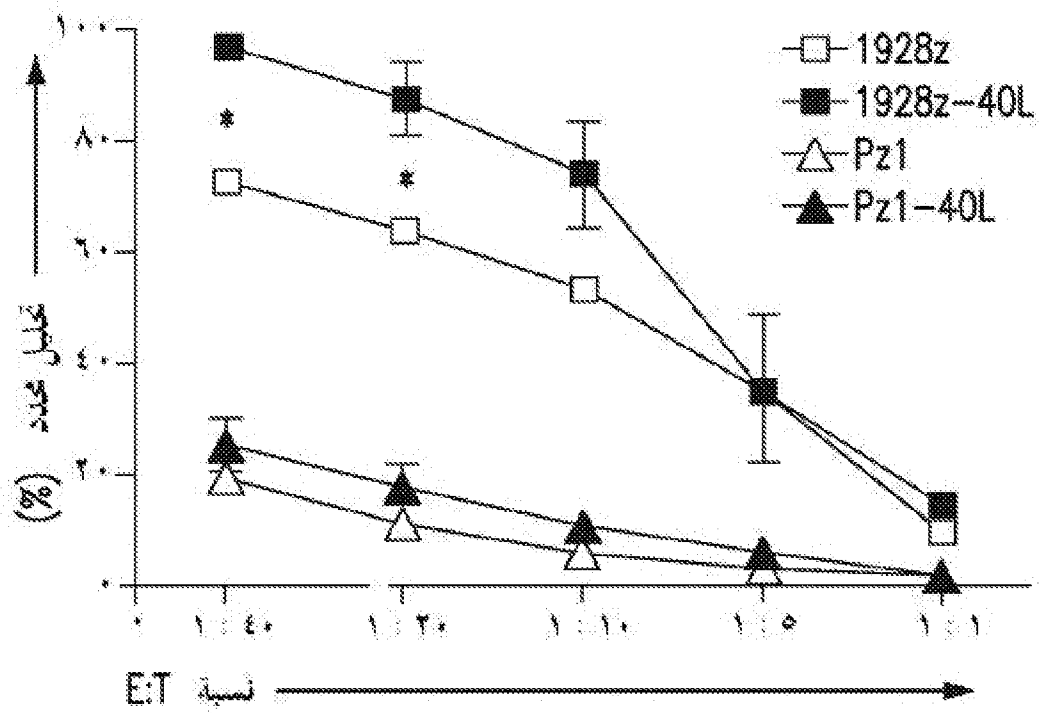
شکل ۲۵ ب

١٨٣٦

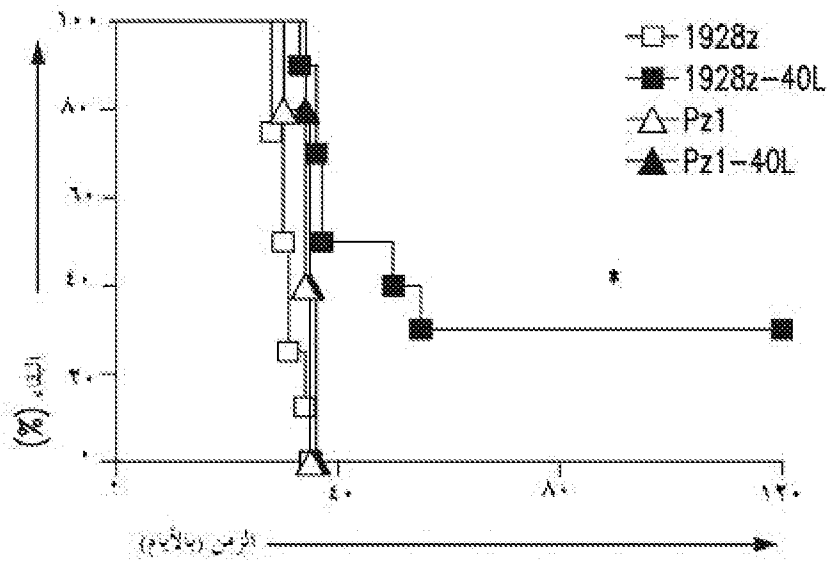




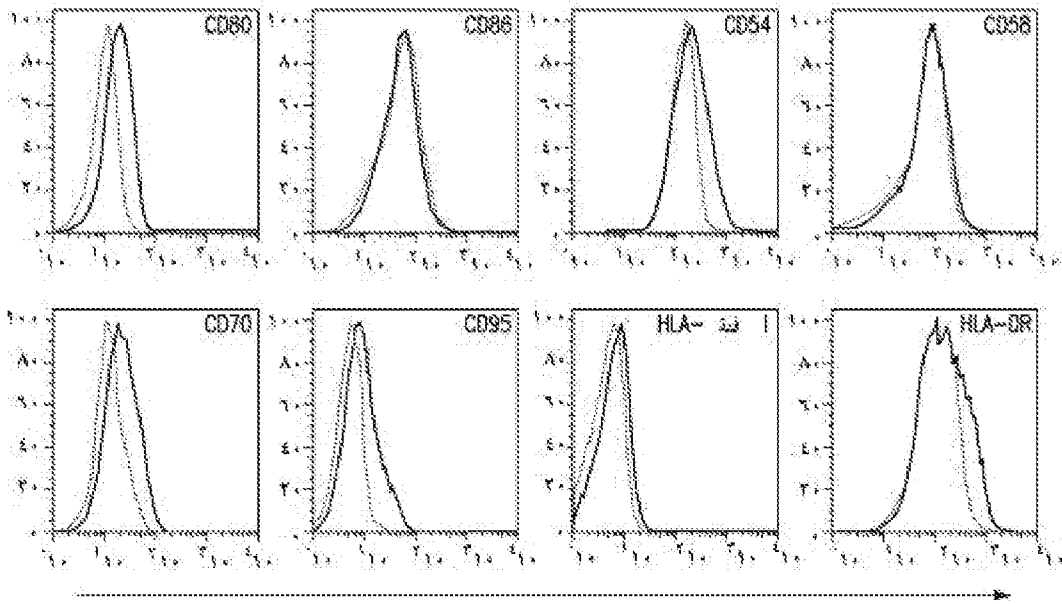
شکل ۲۶ ب



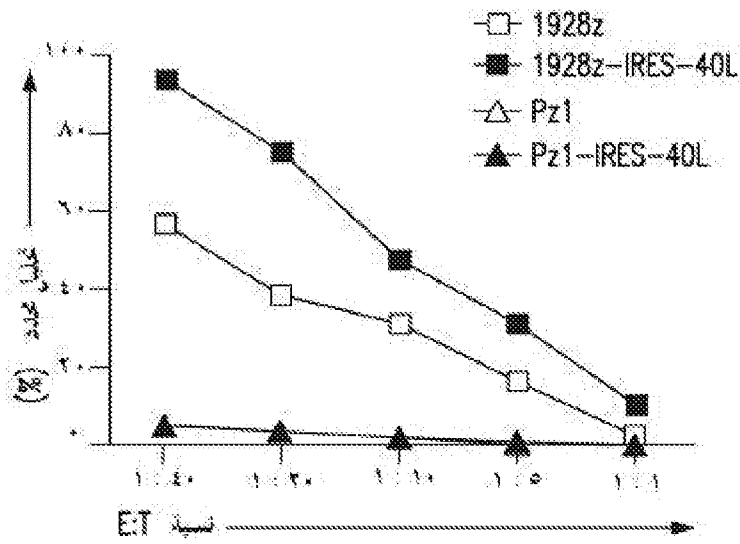
شکل ٢٦ ج



شكل ٢٧



شکل ٢٨



شکل ٢٩

مدة سرعان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

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

صادرة عن

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي

ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية

بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa