[19] المملكة العربية السعوديةSA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ٣٩٨
[45] تاريخ المنح: ١٤٢٦/٠٦/١٨هـ
الموافـــق: ٢٠٠٥/٠٧/٢٤م

[12] براءة اختراع

[72] اسم المخترع: مايكل جي . روسينبلوم، نيكولاس جيه . دوناتو

[73] مالك البراءة: ريسيرش ديفيلوبمنت فاونديشن

عنوانه: ٤٠٢ نورث ديفيجن ستريت ، كارسون سيتي نيفادا ، الولايات المتحدة الامريكية.

[74] الوكيل: أحمد نجدت بازار باشي

[21] رقم الطلب: ٩٥١٥٠٥١٩

[22] تاريخ الإيداع : ١٤١٥/١٠/١١هـ
الموافق : ١٩٩٥/٠٣/١٢م

[51] التصنيف الدولي[7] :
Int. Cl.[7]: A61k 39/395, C07k 16/28

[56] المراجع:

براءة أمريكية	٤٥٤٥٩٨٥	١٩٨٥/١٠/٨م
براءة أوروبية	٢٥١٤٩٤	١٩٩٢/٠٩/٣٠م

اسم الفاحص : عبدالمحسن بن صالح الجيد

[54] اسم الاختراع: التقارن المناعي immunoconjugates للأفيدين – بيوتين Avidin - Biotin

[57] الملخص: يتعلق هذا الاختراع بناقل vector غير فيروسي non-viral ، يتضمن مكوناً رابطاً للخلية cell binding component به عنصر بيوتين biotin رابط يرتبط مع عنصر بيوتيني biotinylated moiely . وأيضاً يقدم هذا الاختراع طريقة لإدخال مادة جينية gene (وراثية) داخل خلية معينة تتضمن تناول الإنسان ناقل vector غير فيروسي non-viral ، حيث يشتمل الناقل vector غير الفيروسي non-viral على مكون ربط خلية cell binding به عنصر بيوتين biotin يرتبط مع عنصر بيوتيني biotinylated . و بالإضافة إلى ذلك ، يقدم الاختراع طريقة لنقل جزء سام cytotoxic moiety للخلية إلى الخلية تتضمن تناول الإنسان ناقل vector غير فيروسي non-viral.

٨ عناصر حماية

التقارن المناعي immunoconjugates للأفيدين – بيوتين Avidin – Biotin

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق هذا الاختراع على وجه العموم بمجال البيولوجيا الجزيئية molecular biology والعلاج . وعلى وجه الخصوص ، يتعلق هذا الاختراع بناقل vector غير فيروسي non-viral جديد لنقل معلومات جينية وراثية genetic إلى الخلايا cells.

حالياً ، تستخدم غالبية الأساليب التي تنقل مادة جينية genetic قادرة على التأثير على الخواص الجزيئية في خلايا الثدييات mammalian cells ناقلات فيروسية viral vectors وفيروسية ارتجاعية retroviral أولية . ومن ناحية أخرى ، يتأثر المجال للعلاج أو النقل الجيني gene بالعديد من العيوب والحالات الخطيرة . فعلى الرغم من أن الناقلات الفيروسية الارتجاعية retroviral vectros هي الأكثر شيوعاً ، فقد تم الآن دراسة الناقلات الفيروسية viral vectors الغدية adenoviral vectors ويكون لكل منها بعض الإمكانات . ولسوء الحظ يكون للناقل الفيروسي viral vector العديد من العيوب . أولاً ، يجب أن تكون الخلايا المستهدفة target cells مثل خلايا الإنسان human cells قادرة على التفاعل مع الفيروسات viruses من خلال إفراز جزء سطح خلية معين والذي يمكن أن لا يفرز على الخلايا أو الأنسجة المقصودة لنقل المعلومات الجينية genetic . ثانياً ، يجب أن تكون المادة الجينية genetic متكاملة و تفرز في الهدف مثل خلايا الإنسان human cells مما يتطلب انقسام الخلايا المستهدفة target cells بفاعلية ، وهي حالة تعوق كفاءة وتجانس نظام النقل delivery system هذا . وحتى إذا كانت متكاملة بنجاح ، فإن الجين (المورث) gene ممكن أن يكون خامداً silent من حيث الاستنساخ transcriptionally بواسطة آليات الخلية المضيفة host cell . ثالثاً ، يكون حجم المعلومات الجينية gene المسموح في هذا النظام محدوداً و يجب إعداده بدقة كبيرة لضمان الفعالية البيولوجية biologic .

رابعاً ، يجب استخدام فيروسات viruses غير متضاعفة replication defective في تطبيقات العلاج الجيني gene لخفض مخاطر إعادة الاتحاد مع الفيروسات الذاتية endogenous viruses والتي يمكن أن تشكل عوامل إصابة جديدة . ويمكن أن تقلل الفيروسات viruses غير المتضاعفة هذه الخطورة ولكنها لا تزيلها نهائياً . خامساً ، تكون الفيروسات viruses غير المتضاعفة غير ذاتية الإزالة وتتطلب إصابة متكررة لكي تحقق انتقال ناجح للتَتَابُعات (لِلسَلْسَلة) الجينية gene sequences إلى كل الخلايا cells.

ويكون المجال السابق ناقصاً من حيث عدم وجود الناقلات vectors غير الفيروسية non-viral . ويفي الاختراع الحالي بهذه الحاجة الماسة والمطلوبة في هذا المجال.

<u>الوصف العام للاختراع</u>

يقدم هذا الاختراع من بين أشياء أخرى ، نظام غير فيروسي non-viral جديد لنقل مواد جينية gene قادرة على تعديل modification في الخواص النمطية الظاهرية phenotypic characteristics الفاسدة أو غير المرغوب فيها deleterious . وهكذا ، في أحد تجسيدات embodiment هذا الاختراع فإنه يقدم ناقل vector غير فيروسي non-viral يتضمن مكون رابط للخلية cell binding component به عنصر ربط بيوتين biotin-binding element يتقارن مع جزء بيوتيني biotinylated.

وفي تجسيد embodiment آخر للاختراع فإنه يقدم طريقة لإدخال مادة جينية gene داخل خلية معينة تتضمن تناول الإنسان ناقل vector غير فيروسي non-viral ، حيث يشتمل الناقل vector غير الفيروسي non-viral على مكون ربط خلية cell binding به جزء بيوتين biotin يرتبط مع جزء بيوتيني biotinylated.

وفي تجسيد embodiment آخر يقدم هذا الاختراع طريقة لنقل جزء سام للخلية إلى خلية ، تتضمن الطريقة تناول الإنسان لناقل vector غير فيروسي non-viral.

وسوف تتضح أوجه وسمات ومميزات أخرى إضافية من الوصف التالي للتجسيدات المفضلة embodiments للاختراع التي تقدم بغرض الإيضاح .

شرح مختصر للرسومات :

تقدم الأشكال التالية لتوضيح العديد من أوجه هذا الاختراع وإلى هذا الحد تقدم بعض الأشكال في صورة تخطيطية و ليس من الضروري أن ترسم بمقياس رسم.

شكل ١ : يوضح فصل SPDP الحر من A108/ SPDP على عمود G – ٢٥.

شكل ٢ : يوضح فصل ٢ – IT الحر من أفيدين avidin / ٢ – IT على عمود G – ٢٥.

شكل ٣ : يوضح فصل الأفيدين avidin الحر من أفيدين avidin – 108 A متقارن conjugate على عمود S – ٢٠٠ (FPLC).

شكل ٤ : يوضح فصل الجسم المضاد الحر free antibody عن متقارن أفيدين A 108 – avidin conjugate على عمود A – Con .

شكل ٥ : يوضح ٧,٥ ٪ جل PAGE – SDS mini-gel موضحاً خطوات تنقية purification متقارن أفيدين A 108 – conjugate.

شكل ٦ أ و ٦ ب : توضح فعالية الربط binding لعينة من الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin .

شكل ٧ : يوضح قطر (G-٧٥ (FPLC) لِتَقَارُن بيوتين / جيلونين أفيدين A 108 – avidin gelonin/biotin و فصل جيلونين أفيدين الحر free avidin gelonin وبعض الوحدات الفرعية للأفيدين avidin.

شكل ٨ : يوضح اختبار فعالية الربط Elisa binding للجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin ولتقارن جيلونين بيوتيني أفيدين avidin biotinylated gelonin – A 108.

شكل ٩ : يوضح السمية الخلوية cytotoxicity لِتَقَارُن جيلونين A 108 – gelonin بالمقارنة مع تَقَارُن جيلونين بيوتيني أفيدين A 108 – avidin biotinylated gelonin على الخلايا A 431 .

شكل ١٠ : يوضح تأثير حضانة incubation الخلايا مع تَتَابُعات (سَلْسَلَة) حمض

نووي nucleic acid موجهـــة ضد تتـــابع sequences المُحَضّــض الجينـــي gene promoter لمستقبل EGF (مرسوم labeled مضاد الإحساس EGFr antisense) .

الوصف التفصيلي

يقدم هذا الاختراع ناقل vector غير فيروسي non-viral ، يتضمن مكون رابط للخلية له عنصـــر ربط بيوتين biotin مع جزء بيوتيني biotinylated.

وعلـــى وجه العموم ، يكون عنصـــر ربط البيوتين biotin موضوع هذا الاختـــراع أي مـــادة كيميائية تربط البيوتين biotin ويمكن للشخص العادي في المجال تمييزها بسهولة . ويفضل أن يتم اختيار عنصـــر ربط البيوتين biotin من المجموعة التي تتكون مـــن أفيـــدين avidin ، ستربتافيدين streptavidin أو نظائـــر أفيدين avidin أو ستربتافيدين streptavidin . ويمكن أن يكون عنصر ربط الخلية cell-binding element موضوع هذا الاختراع واحد مـــن العديد من التجسيدات embodiments المختلفـــة . علـــى سبيل المثـــال ، يمكـــن أن يكـــون عنصـــر ربط الخلية cell-binding element جسم مضاد (الضد) وحيد النَسـيلة (الكلون) monoclonal antibody . وتكون الأجسام المضـــادة (الأضداد) antibody أحادية النســـيلة المفيدة في التركيبات والطرق موضوع هذا الاختـــراع هي تلك التي ترتبط مع المســـتضد antigen . ومن أمثلة المســـتضدات antigens التي ترتبط بهـــا تلـــك الأجســـام المضـــادة antibody هي مستقبل عامل نمو الجلـــد epidermal growth factor receptor ، المســـتضد C-erb B2 antigen ، المســـتضد Lewis Y antigen ، مستقبل الترانســـفرين transferrin MDR1 receptor ، MDR3 ، مستقبل الأنسولين ، CD45 , CD33 , GP240 , GD 2 , GD3 ، مستقبل عامل نمو الخلية الليفية fibroblast growth factor receptor ، مستقبل عامل نمو مشتق الصفائح الدموية platelet-derived growth factor receptor.

وكبديل ، يكون عنصر ربط الخلية cell-binding element عبارة عن ربيطـــة ligand بمُسَـــتقْبِل سطح الخلية ، ومن أمثلـــة الربائـــط ligands هذه عامل تحويـــل النمـــو – ألفـــا transforming growth factor alpha ، الهيرجيوليـــن heregulin ، عامل نمو الخلايا الليفية ، مستقبل عامل نمو مشتق الصفائح الدموية.

وعلى وجه العموم ، يمكن أن يكون الجزء البيوتيني biotinylated moiety أي مركب يمكن معالجته بالجزء البيوتيني biotinylated moiety ويكون مادة كيميائية chemical ، يراد إدخالها إلى الخلية لتحدث تأثير بيولوجي biological أو صيدلي معين . وهكذا ، يمكن أن يكون الجزء البيوتيني biotinylated moiety بروتين protein أو حمض نووي nucleic acid.

ومن أمثلة البروتينات proteins المفيدة في التركيبات والطرق موضوع هذا الاختراع الجيلونين gelonin ، الريسين ricin ، السابورين saporin ، الأبرين abrin ، توكسين الدثيريا diptheria toxin ، اكسوتوكسين بسيدوموناس psuedomonas exotoxin ، الرايالیز rayalase ، سوبر أكسيد ديسموتاز super oxide dismutase ، بروتين تيروسين فوسفاتاز protein tyrosine phosphatase ، بروتين فوسفاتاز protein phosphatase (2 – or PP 1 – PP) ، بروتين كيناز A protein kinase وبروتين كيناز C protein kinase . ومن أمثلة الأحماض النووية nucleic acids قليل النوويد oligonucleotides ثلاثي الحلزون مثل قليل النوويد oligonucleotides مستقبل ثلاثي EGF ، قليل النوويد oligonucleotides مضادة الإحساس antisense ، مثلاً لتتابعات الجين الجزيئي gene EGF أو myc ، على سبيل المثال ، تتابعات ترميز مجال فردي لبروتين protein مع العديد من المجالات مثل Src – C أو مستقبل EGF والجينات genes الكاملة أي التي تؤخذ من وحدة متكاملة من مجين فيروس تقهقري retroviral genome.

ويقدم هذا الاختراع أيضاً طريقة لإدخال مادة جينية (وراثية) gene داخل خلية معينة تتضمن تناول الإنسان ناقل vector غير فيروسي non-viral ، حيث يشتمل الناقل vector غير الفيروسي non-viral على مكون ربط خلية cell binding به عنصر بيوتين biotin يرتبط مع عنصر بيوتيني biotinylated.

ويقدم هذا الاختراع أيضاً طريقة لنقل جزء سام للخلية إلى خلية تتضمن تناول الإنسان ناقل vector غير فيروسي non-viral.

ويضم هذا الاختراع تركيبات وطرق تسمح بإدخال أحماض نووية nucleic acids إلى مجموعة فرعية معينة من الخلايا بدون استخدام إصابة فيروسية viral أو مكون إصابة تحويلية . ويتم تعديل modification واستخدام الأجسام المضادة أحادية النسيلة monoclonal الموجهة ضد مكون سطح الخلية واستخدامها في حمل أحماض نوويية قادرة على تعديل modification إفراز الجين gene إلى داخل الخلية على وجه الخصوص زيادة أو خفض معدل البروتين protein المفرز داخل الخلايا المستهدفة target cells . ويطبق هذا الاختراع على تقنية الحمض النووي المضاد للإحساس antisense ، في الإنسان anti-sense nucleic acid technology in humans.

ويتم تعديل modification الأجسام المضادة أحادية النسيلة monoclonal الموجهة ضد مكون سطح الخلية cell مع جزء ربط بيوتيني biotinylated وتتابعات حمض نووي nucleic acid تربط الدنا DNA المتعلق بالعوامل الوراثية أو تتابعات الرنا الرسول mRNA ، بحيث يتغير تعبير الجين genomic ويرتبط خلال تفاعل أفيدين : بيوتين biotin : avidin باستخدام مشتقات بيوتينية biotinylated لتتابعات الحمض النووي nucleic acid . ومن خلال إضفاء الصفة الذاتية internalization على متراكبات الجسم المضاد (الضد) antibody : المستضد antigen ، يتم توحيد ذاتية تتابعات الحمض النووي nucleic acid الفعال ، وزيادة محتوى داخل الخلية من تلك التتابعات . ويؤدي استخدام هذا الاختراع إلى : (١) زيادة محتوى داخل الخلية من تتابعات الحمض النووي nucleic acid المعدل للتعبير الجيني gene ، بآليات تختلف عن تلك التي تتعلق بالناقلات الفيروسية viral vectors أو خلال انتشار بسيط أو ميسر خلال غشاء البلازما plasma ، (٢) السماح بتخطي قيود الحجم الجزيئي الصغير لتتابعات الحمض النووي nucleic acid الصغيرة (– ٢٠ – mers) عن طريق التخلص من الحاجة إلى الانتشار البسيط خلال غشاء البلازما plasma كآلية لدخول تلك التتابعات إلى الخلية ، (٣) نقل التتابعات ذات الاهتمام إلى الخلايا نوعياً أو انتقائياً خلال تفاعل الجسم المضاد antibody : المستضد antigen بدلاً من خلال النقل الكلي أو الإصابة الفيروسية viral لزيادة المحتوى

الخلوي من تتابعات الحمض النووي nucleic acid الفعال.

ولأحد تجسيدات embodiments هذا الاختراع ، يتم تخليق DNA مضاد - الإحساس antisense DNA ضد البروتين protein المولد للأورام الذي يمد النوويدات nucleotides (١٠) أعلى وأسفل الرامزة لبداية ترجمة الرنا الرسول mRNA . وبعد ذلك يمكن تخليق DNA تكملة للنوويدات nucleotides الخمسة الأولى من DNA مضاد - الإحساس antisense التى سبق تخليقها . وبعد ذلك ، يتم إدخال جزء بيوتين - نوويد biotin-nucleotide إلى التتابع ، ثم يتم تهجين hybridized خيطي الرنا (الليفتين) ثم يتم نقل Streptavidin/ MAb Avidin خلال الورم المستهدف إلى الورم.

ويتم تقديم الأمثلة التالية فقط بغرض إيضاح العديد من تجسيدات embodiments هذا الاختراع ولكنه لا يقتصر عليها.

مثال ١

تعديل modification الجسم المضاد A 108 antibodies

يشير 108 A إلى المُستَقبِل البشري لعامل نمو الجلد . تم إضافة ١٠ مجم من 108 A فى ٢,٢ مللي لتر من محلول ملحي فوسفات منظم phosphate-buffered إلى أنبوبة زجاجية ١٢ × ٧٥ مم . وتم إضافة جزء من ٩,٣٥ µls لتر من الجسم المضاد antibody و ٢,٥ مرة مولار زيادة من N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate) SPDP) من مخزون من ٣ مجم / مللي لتر فى ثاني مثيل فورماميد DMF dimethyl formamide ببطء إلى الأنبوبة مع التقليب الدوامي . وتم تقليب المزيج كل خمس دقائق خلال ٣٠ دقيقة حضانة عند درجة حرارة الغرفة.

وتم إزالة SPDP الزائد غير المتفاعل من العينة بواسطة الترشيح على هلام بالتحليل الكروماتوجرافي chromatography على عمود (١,٥ × ٣٧ سم) من Sephadex G-25 سابق المعايرة في ١٠٠ مم محلول منظم فوسفات صوديوم sodium phosphate (أس هيدروجيني pH ٧,٠) يحتوي ٠,٥ مم EDTA . و تم جمع أجزاء ١ مللي لتر على

مجمع أجزاء Gilson أثناء الترويق المنظم . وتم تحليل الأجزاء من حيث محتـوى البروتيـن protein في وعاء به ٩٦ تجويف لمعيـار حجمي دقيق (Falcon) باستخدام اختبار صـيغة باردفـورد للربط Bradford dye assay binding . واحتوى كل تجويف ١٢٠ ميكـرو لتـر من PBS ، و ٤٠ ميكـرو لتر من مُرَكّـز الصبغة و ٤٠ ميكـرو لتر من العينة . وتم قراءة الامتصاص علـى جهاز قارئ أوتوماتيكي دقيق الوعاء (Bio Tek) Microplate Autoreader عند ٥٤٠ نانوميتـر (nm) . وتم جمع الأجزاء ٣٠ – ٣٨ و حفظت عند ٤°م.

ويوضح شكل ١ إضافة SPDP إلـى جسم مضـاد مضـاد – (EGFr (A 108)) خلال ارتباط تساهمي covalent coupling . وتم تعديل A 108 modification خلال الليسـين lysine وتعديـل modification الحمض الأمينـي ذو الطـرف – ن N-terminal باسـتخدام SPDP . وتم إزالة المواد غير المتفاعلة من A 108 عالي الوزن الجزيئي بواسطة الترشـيح علـى الجل gel . ويوضح شكل ١ شكل ترويق SPDP – معدل A 108 حيث تظهـر فـي شكل ١ أنه تم استرداد A 108 المُعَـدّل بعد تقارن SPDP.

مثـــال ٢

تعديل modification أفيـدين – بيض أبيض Avidin-Egg white

تم تخفيـف ١٠ مجم من أفيـدين avidin في ٢,٥ مللي لتـر ماء مكـرر التقطيـر (ddH_2O) لتحتوى ٦٠ ميلي مولار TEA / HCl (ثلاثي – إيثانول أمين triethanol amine ، أس هيدروجيني pH ٨,٠) و (١) ميلي مولار EDTA بإضافة ٣٠٠ ميكـــرو لتـر ٠,٥ ميلي مولار TEA / HCl و ٢٨ ميكـرو لتر ٠,١ ميلي مولار EDTA . وكان الحجم النهائي ٢,٨ مللي لتر . وتم بعد ذلك إضافة ١٧ µls من TEA/HCl (2-IT) 2-imino-thiolane (رقم هيدروجيني pH ٨,٠) للحصول علـى تركيز نهائي ٣ ميلي مـولار . وتمـت حضـانة العينة لمدة ٩٠ دقيقة عند ٤°م تحت تيار من غاز النيتروجيـن nitrogen . وتم إزالـة IT-2 الزائدة غير المتفاعـلة بالترشـيح الكروماتوجرافي chromatography علـى (جل) هـلام gel باستخدام عمود Sephadex G-25 (١,٥ × ٣٨ سم) (Pharmacia) سابق المعايرة مع ٥ ميكرو مـولار محلول منظم مكـرر ثلاثـي / خـلات bis-tris/acetate buffer (رقـم

هيدروجيني pH ٥,٨) يحتوى ٥٠ ميلي مـــولار NaCl و ١ ميلي مـــــولار EDTA . وتم تحديد محتوى البروتين protein في الأجـــزاء المروقة بواسطة اختبار ربط صـــبغة binding Bradford . وتم قراءة الامتصاص علـــى جهـــاز قارئ أوتوماتيكي دقيق الوعاء Microplate Bio Tek Autoreader عند ٥٤٠ نانو ميتـــر . وتم جمع الأجـــزاء (كل منها ١ مللي لتـــر) ٢٧ – ٣٨ . وتم استرداد أفيدين avidin معـــدل مـــع ٢ – أيمينوثيـــولان 2-iminothiolane بواسطة الترشـــيح علـــى الجل كما يظهر في شكل ٢.

مثـــــال ٣

تقارن الجسم المضاد A 108 antibody وأفيدين avidin

تمـــت حضـــانة أجزاء الجسم المضاد antibody المعدل و الأفيـــدين avidin المعدل معـــاً عند ٤°م تحت تيار من غاز النيتروجيـــن nitrogen لمدة ٢٠ ساعة (١٥,٥ مللي لتـــر حجم إجمـــالي) . وتـــم إضـــافة محلـــول من ٠,١ مولار أيـــوديد أسيتاميد iodoacetamide (٠,٣١٠ مللي لتر) للحصول علـــى تركيز نهائي ٢ ميلي مولار لمنـــع أيـــة مجموعـــات سلفهيدريل sulfhydryl حـــرة متبقية ، واستمرت الحضـــانة لمدة ساعة عند درجـــة حـــرارة الغرفة . وتمـــت حضـــانة A 108 معدل SPDP وأفيدين avidin معـــدل و ٢ – ايمينو ثيولان 2-iminothiolane معاً بحيث يصبح A 108 مرتبط تساهمياً مع أفيديـــن avidin خلال رابطـــة سلفهيدريل sulphydryl تـــزود بواسطة 2-iminothiolane chemistry .

وتم فصل المتقارن المناعي immunoconjugate المتكـــون من SPDP أفيدين avidin (يتميز كمتقارن conjugate في شكل ٣) عن الأفيدين avidin غيـــر المتفاعـــل بواســـــطة الترشـــيح علـــى الجـــل gel . و تمثل قمة البروتين protein المروق إلـــى أجـــزاء ٧ – ٩ SPDP وأفيدين avidin – SPDP غير مُعَـــدّل تم استرداده وتنقيته مرة أخـــــرى.

مثـــــال ٤

تنقية المتقارن conjugate purification

تم إزالة الأفيدين avidin غير المقارن conjugate من مخلوط التفاعل بواسطة الترشيح

على الجـل gel علـى عمـود [Pharmacia FPLC Superdex S-200] (٢,٦ × ٦٠ سـم) سـبق معايـرته مـع ٢٠ ميلـي مولار تريـس Tris و ١٥٠ ميلـي مـولار Nacl (رقم هيدروجيني pH ٧,٤) [شكل ٣].

وتم جمع متقارن conjugate الجسم المضاد antibody – الأفيـدين avidin وأجـزاء الجسـم المضـاد الحـر free antibody (٦ – ١٠) وتـم فرزها بالانتشـار الغشـائي (Spectra / Par أنابيب غشائية مسامية جزيئية # ٢ MWCO ١٢٠٠٠ – ١٤٠٠٠) طوال الليل ضد PBS عند ٤°م . وتم إزالة الجسم المضاد الحر free antibody من المزيـج بواسطة استخدام أفيلين avidin مركز – A (ناقل) جاذبية ربط الأجاروز agarose bound affinity . عمود (١,٥ سم × ٧ سم) سـابق المعـايرة (20 mM Na-K-phosphate, 150 mM Nacl ، رقم هيدروجيني pH ٧,٠) وبعد تحميل العينة ، تم غسل العمود مرة مع ٤٠ مللي لتر من ١ مولار كلـوريد الصوديوم (NaCl) (pH ٧,٠) وتم تـرويق المتقـارن بـ (PBS) يحتـوي ٢٠٠ ميلي مولار من مثيـل – د – مانوز methyl-D-mannose (رقم هيدروجيني pH ٧) (الأجزاء ٣٤ – ٣٨) كل منها ٢ مللي لتر) . و تم قياس محتوى البروتيـن protein فـي الأجزاء المروقة علـى فوتومتر طيفي Varian spectrophotometer عند ٢٨٠ مم.

وخلال عملية ربط binding جـزء الكربوهيدرات carbohydrate علـى الأفيـدين avidin ، تم فصـل أفيدين avidin – A 108 من A 108 باحتجازه علـى داعـم مُسّـكن immobilized support من كوكانافالين لكتين نباتي lectin concanavalin A (Con A) التـي تربط ألفا – مثيل مانوزيد alpha-methylmannoside (التي توجد علـى الأفيدين avidin) . ولا يكـون للجسم المضـاد أي ألفا – مثيل مانوزيد alpha-methylmannoside وتم غسـله خـلال عمود Con A (يظهر علـى شكل Ab الحـر في شكل ٤) . وتم إزالـة A 108 – أفيدين avidin (يعرف بالمتقارن conjugate) من عمـود Sepharose – Con A باسـتخدام ترويق مع ألفا – مثيـل مانوزيد alpha-methylmannoside في محلـول . وتـم اسـترداد المتقـارن conjugate بهذه الطريقة وكان خاليـاً من A 108 غير المعدل.

وتم مراقبة درجة نقاء متقارن أفيدين avidin conjugate A 108 باستخدام جهاز التفريد الكهربي (حلان كهربي) الكترونورسيز electrophoresis (جهاز كهربائي لدراسة هجرة الجزيئات المعلقة في سائل بفعل مجال كهربي) بواسطة جل صوديوم دوديسيل كبريتات بولي أكريلاميد (PAGE – SDS) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel الذي يقوم بفصل البروتينات proteins وفقاً لحجم جزيئاتها . و تم تشغيل ٧,٥ ٪ جل أكريلاميد PAGE – SDS acrylamide صغير لفحص خطوات تنقية المتقارن conjugate purification . وكما يظهر في شكل ٥ ، تم ذوبان بروتينات proteins تمثل A 108 ، أو أفيدين avidin أو متقارن أفيدين A 108 – avidin conjugates وتم رؤيتها عند تعرض البروتينات proteins للصباغة بصبغة أزرق Cooomasie في جل بولي أكريلاميد polyacrylamide gel وتم إزالة الصباغة لحذف الخلفية . وتمثل العينة المطبقة على Lane 7 (مروق من عمود Con A) المقارن المناعي النقي (أفيدين – A 108) conjugate الذي استخدم في الدراسات التالية.

ويمكن إظهار قابلية أفيدين avidin – 108 A لربط البيوتين biotin binding ودمجه بصوره تامة إلى خلايا تتبع حقيقيات النواه eukaryotic باستخدام بروتين بيوتينيلي piotinylated protein له فعالية سامة فقط عند تحوله إلى خلايا (مثل البروتين protein النباتي والجيلونين gelonin) . وتم تعديل modification بروتين الجيلونين protein gelonin النقي كيميائياً chemically مع البيوتين biotin (عن طريق الارتباط التساهمي خلال بقايا الليزين lysine على الجيلونين gelonin مع بيوتين NHS – biotin) وتم تنقيته من البيوتين biotin غير المرتبط بواسطة الترشيح على الجل gel.

<u>مثال ٥</u>

<u>معالجة الجيلونين gelonin مع البيوتين Biotinylation</u>

كان البيوتين biotin المستخدم على شكل ن – هيدروكسي سكسينيميد استر N-hydroxy succinimide ester طويل السلسلة (LC – NHS) بيوتين biotin

(Pierce Chemical Co.) . وتم استخدام بيوتين biotin بكمية مـولارية تزيد خمس مـرات علـى الجيلونين gelonin (= ٠,١ مجم بيوتين biotin إلـى ١ مجم جيلـونين gelonin) . وكان مخزون الجيلونين gelonin ٢ مجم في ٢ مللي لتر من ٥٠ ميلي مولار محلول مـنظم بيكربونات bicarbonate (رقم هيدروجيني ٨,٥) . وتم إذابة ٥ مجم بيوتيـن biotin فـي ٥٠٠ ميكـرو لتر ثاني مثيل فورماميد dimethylformamide الجاف (DMF) و تم فـوراً إضافة ٢٠ ميكـرو لتر (٠,٢ مجم) من محلول البيـوتين biotin هـذا إلـى الجيلـونين gelonin في أنبوبة زجاجية جافة نظيفة ١٣ × ١٠٠ مم . وتم تقليب العينـة دوامياً ثـم وضعت في حاضـنة لمدة ساعتين علـى الثلج . وبعد ساعتين ، تم فصل البيـوتين biotin الحر بالترشيح الكروماتوجرافي علـى الجل gel علـى عمود ١,٥ سم × ٣٧ سـم G – ٢٥ تم معايرته مع PBS (رقم هيدروجيني pH ٧,٠) . و تم جمع أجـزاء واحد مللي لتر فـي مجمع أجزاء Gilson واختبرت من حيث محتـوى البروتيـن protein مع اختبـار ارتبـاط الصبغة Badford . وتم جمع الأجزاء ٢١ – ٢٧ (شكل ٦ أ).

ولإيضاح أن البيوتين biotin قد تم إدخاله إلـى الجيلونين gelonin تم تثبيت الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin علـى داعـم مُسَكّن من البولي ستيرين polystyrene مـع جسـم مضـاد antibody يتـم توجيهـه قبالـة بروتيـن الجيلونين gelonin protein . وتم احتضان كميات معينة من الجيلونين gelonín غير المعدل أو الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin في تجاويف تحتوي جسم مضاد antibody ، بمضاد للجيلونين anti- gelonin . وتـم الكشف عن احتجاز البيوتين biotin مع الجيلونين gelonin عن طريـق شـطف التجـاويف وإضافة ستربتافيدين streptavidin ، تم تقارنه كيميائياً مع الإنزيم هورسـراديش بيروكيـداز enzyme horseradish peroxidase ، والذي يتحول عند حضـنة مـع المـادة المتفاعلـة لأنزيـم بيروكسيداز peroxidase عديم اللون (ABTS) إلى اللون الأخضر ويكون قابـل للقياس بواسطة فوتومتر الطيف عند طول موجـة ٤٠٥ نانومتر . ويكون مقدار الامتصاص عند ٤٠٥ نانوميتـر متناسب مباشرة مع كمية البيوتين biotin الداخل إلى جزيء الجيلـونين gelonin . وكما يظهر في شكل ٦ ب ، يحتجز الجيلونين gelonin المعرض للمعالجة بالبيوتين

biotin ، بيوتين biotin وفقــاً للزيادة في اللون الأخضر عن طريق زيادة كميات الجيلــونين البيوتيني biotinylated gelonin الموجود في الاختبار . وأوضحت النتائج أن البيوتين biotin يمكن أن يدخل إلــى جــزيء الجيلونين gelonin ويمكن تمييزه بواسطة البروتينات proteins الجاذبة للبيوتين biotin.

مثـــال ٦

فعالية الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin

تم تخفيف محلول من ٠,٥٨٣ مجم / مللي لتر جسم مضاد antibody فــأري أحادي النســيلة لمضاد الجيلونين monoclonal anti-gelonin (١٠ Ci) (١٠ ميكــرو لتر) فــي ١٢ مللي لتر محلول تغليف منظم (٥٠ مم $NHCO_3$) بيكربونات الصوديوم رقم هيدروجيني : ٩,٦ (sodium bicarbonate, pH: 9.6) (محلول / ميكروجرام / مللي لتــر) . وباســتخدام ماصة متعددة القنوات ، تم تغطية كل تجويف في وعاء Falcon دقيق المعايرة ٩٦ تجويف مع ٥٠ ميكروليتــر (٥٠ نــانو جم / تجويف) . وتم تغطية العينات وتبريدها طوال الليــل . وبعد ١٢ ساعة ، تم شطف العينات ثلاثة مرات مع Tween – ٢٠ ٪ ٠,٠٥ – PBS و بقــي لمدة ١,٥ ساعة عنــد درجــة حرارة الغــرفة مع ٥ ٪ زلال مصــــل جنيــــن بقــــري bovine serum albumin في PBS . وتم بعــد ذلك غســل العينــة ثــلاث مــرات مع PBS و ٠,٠٥ ٪ Tween 20.

وتم تحضير محلول من الجيلونيـــن gelonin في PBS بتركيز ٢ مجم / مللي لتر . و بعد ذلك تم تحضير محلول من الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin في PBS ، وأيضــاً عند تركيز ٢ مجم / مللي لتر . تم إضافة ١٠٠ ميكرو لتر من محلول ١ مجم / مللي لتر من BSA في PBS إلــى الوعاء مع ترك الصف الأول من التجــاويف فارغــاً . وإلى النصــف الأول من هذا الصف ، تم إضافة ٢٠٠ ميكرو لتر / تجويف من مخزون محلول الجيلــونين gelonin ، وإلــى النصف الثاني من الصف تم إضافة ٢٠٠ ميكرو لتر / تجويف من مخزون البيوتين biotin . وباستخدام الماصة متعددة القنوات ، تم سحب ١٠٠ ميكرو لتر مــن هــذا الصف الأول وتم خلطها مع ١٠٠ ميكرو لتر PBS – BSA في الصف الثاني . وتم تكــرار

هذه الخطوات من اليسار إلى اليمين عبر الوعاء مما ينتج عنه تخفيف متسلسل للبروتين protein . وتم تغطية الوعاء ووصفه في حاضنة لمدة ١,٥ ساعة عند درجة حرارة الغرفة . وتم غسل تجاويف الوعاء ثلاث مرات مع PBS – ٠,٠٥ ٪ Tween – ٢٠ . وتم بعد ذلك إضافة ١٠٠ ميكرو لتر من أنزيم أفيدين بيروكسيداز avidin peroxidase (Mannhein – Boehinger) مخفف ١ : ٦٠٠٠ في ١ مجم / مللي لتر BSA – PBS . وتم بعد ذلك وضع الوعاء في حاضنة لمدة ١,٥ ساعة – عند درجة حرارة الغرفة يتبعه الغسيل ثلاث مرات مع PBS – ٠,٠٥ ٪ . و أخيراً إضافة ١٠٠ ميكرو لتر ٢ ABTS (2, 2'-amino-bis (3-ethyl benz Thiazoline-6-sulfonic acid)) hydrogen peroxide . وتم قراءة الوعاء على قارئ معملي أوتوماتيكي Autoreader دقيق الوعاء Bio tek 405 نانوميتر [شكل ٦ب].

مثال ٧

تقارن الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin مع أفيدين A 108 – avidin

تم استخدام زيادة مولارية ٥ من الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin عن أفيدين A 108 – avidin . و تم اتحاد واحد مللي لتر (٢٥٠ ميكروجرام) من أفيدين A 108 – avidin مع ١٧٥ ميكرو لتر (١٧٥ ميكروجرام) من جيلونين بيوتيني biotinylated gelonin . وتم تقليب العينة دوامياً ومن ثم وضعت في حاضنة لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة.

ولإزالة الجيلونين gelonin غير المتقارن من المزيج ، تم وضع المخلوط على عمود ترشيح على الجل gel (١,٦ × ٦٠ سم) Pharmacia FPLCG-75 سابق المعايرة مع ٢٠ مم تريس Tris يحتوي ٠,٥ مولار NaCl (رقم هيدروجيني pH ٧,٤) . وتم جمع أجزاء واحد مللي لتر وتم قراءتها على فوتومتر طيفي Varian عند طول موجه ٢٨٠ نانو ميتر . ويوضح شكل ٧ الذرات التي تمثل المرسوم المتقارن للجيلونين بيوتيني أفيدين A 108 – avidin biotinylated gelonin وكان خالياً من الجيلونين gelonin غير المرتبط أو وحدات أفيدين الحرة free avidin الفرعية.

وتم فحـــص تقـــارن أفيـــدين A 108 – avidin مـــع الجيلونيـــن البيـــوتيني biotinylated gelonin باستخدام نفس اختبار Elisa كما سبق وصـــفه فـــى حالـــة الجيلـــونين البيوتينـــي biotinylated gelonin . وكما يظهـــر في شكل ٨ ، يمكن الكشف عن محتـــوى البيوتين biotin عن طريق تكوين اللون الأخضـــر عندما يتم اختبار إما الجيلونين البيـــوتيني biotinylated gelonin أو الجيلونين البيوتيني biotinylated gelonin : الأفيـــدين A 108 – . وهكذا ، فإن المتقارن يحتوي فعليـــاً علـــى جيلونين – بيوتيني biotinylated- gelonin.

<u>مثـــال ٨</u>

<u>السمة الخلـــوية لمتقـــارن جيلونين بيوتيني / أفيـــدين A 108 – avidin/biotinylated gelonin علـــى خلايا ٤٣١ a</u>

تم تخفيف الخلايا A4313 cells للوصول إلى عـــدد ٣ × $١٠^{٤}$ خلية / مللي لتر في وســـط نمو (MEM – minimum essential medium) مع حمض أمينـــي amino acid غيـــر أساســـي ، و ١٠٠ ميلي مولار حمـــض أمينـــي جلوتـــامين glutamine amino acid و ٥٠ ميكرو لتر جنتاميسين (Tri-BioLaboratories) gentamicin مع ٥ ٪ مصل جنيـــن بقـــري fetal bovine serum و ٥ ٪ مصل عجـــل بقري bovine calf . وتم إضافة ١٠٠ ميكرو لتر من هذا المحلـــول إلـــى كل تجويف في وعاء (Falcon) به ٩٦ تجـــويف وتم حضــــانتها طوال الليل عنـــد ٣٧°م في حاضـــنة incubation ٥ ٪ CO_2 . وفي اليوم التالي تم تحضير محلول ٢ ميكرو جرام / مللي لتـــر مـــن متقـــارن جيلـــونين A 108 – gelonin conjugate باستخدام SPDP معدل A 108 و IT-2 معدل جيلونيـــن gelonin يتصل تســـاهمياً مع بعضها البعض خلال نفـــس الكيميائيـــة المســـتخدمة في تحضـــير افيـــدين A 108 – avidin فـــي وســـط نمو ، وتم ترشـــيحه مع التعقيـــم باستخدام مرشـــح محقنة ٠,٢٢ ميكـــرون micron 0.22 Acrodisc (Gilman) ويتم تخفيفـــه في عشـــرة أنابيـــب طرد مركـــزي ١٥ مللي لتر (Corning) . وتم بالمثل تحضـــير جيلونيـــن بيـــوتيني biotinylated gelonin : أفيـــدين A 108 – avidin وتم إضافة ١٠٠ ميكرو لتـــر لكل تخفيف ثلاث مرات إلـــى الوعـــاء . وحيث أنه يوجـــد بالفعل وســـط ١٠٠ ميكـــرو لتر في الوعـــاء ، كان التركيـــز النهائي

١ ميكرو جم / مللي لتر لكل متقارن . و كقياس تم تحضيـــر متقارنات بنفس الطـــريقة ولكن كل منها مع إضافة ١٠٠ مرة زيادة مـــولارية (١٠٠ ميكروجم / مللـــي لتـــر) مضـــادات أجســـام A 108 antibody إلـــى كل منها . وتمت حضـــانة الخلايا ٣ أيام ثم صـــبغت مـــع ٠,٥ ٪ بلورات بنفسجية في ٢٠ ٪ مثانـــول methanol وشطفت في ماء مقطـــر وأضــــيف ١٥٠ ميكرولتر من محلول منظـــم Sarenson's لاستخلاص الصبغة من الخلايا . وتم بعـــد ذلك قراءة الـــوعاء علـــى قارئ أوتوماتيكي عند ٥٤٠ نانوميتـــر.

ويوضح شـــكل ٩ قابلية المتقـــارن لنقل الجيلونيـــن gelonin إلـــى داخل الخليـــة حيث يمكن أن يحدث سُمّية الخلية . وتمت حضـــانة المتقـــارن مع الخـــلايا التـــي تفـــرز مُسْتَقْبِل EGF عند سطحها الخلوي (A431) . وتســـمح المعالجة الذاتية للمتقـــارن بحـــدوث التأثيرات الخلوية الداخلية للجيلونيـــن gelonin أي سمية الخـــلايا cells . وكما يظهـــر فـــي شكل ٩ ، عندما تـــمت حضـــانة المتقارن مع تلك الخـــلايا cells ، قتلت التركيزات النـــانو مولاريـــة (نـــ م) (١ × $١٠^{-٦}$ مول) الخلايا A431 / حيث أوضحت أن افيدين – A 108 يسمح بدخول الجيلونين البيوتيني biotinylated- gelonin إلـــــى الخلايـــا A431 (– دوائـــر مفتوحة) . وعندما تتم حضـــانة الخلايا مع الجســـم المضـــاد الحـــر A108 free antibody بكميات إضافيـــة كبيـــرة (بالمقارنة مع تركيز المتقـــارن المناعي) فإن قابليـــة أفيـــدين avidin – A 108 : جيلونين بيوتيـــن biotinylated- gelonin الدخـــول إلـــى الخليـــة A431 قـــد أعتقت . ويقوم A108 الحر بربط binding كل مستقبل EGF متاح علـــى سطح الخلية ، ويعمل ذلك علـــى تثبيط المتقـــارن المناعي من ربـــــط binding مســـتقبل EGF وإدخـــال الجيلونين gelonin إلـــى داخـــل الخلية A431 . و كما يظهـــر في شـــكل ٩ فإنه عند وجود A108 في ١٠٠ ضعف زيادة بالمقارنة بتركيـــز المتقـــارن المناعي (– دوائـــر مغلقـــة) ، تكـــون الخلايا A431 لها قدرة علـــى البقاء ، مما يوضح أن الطريقة الوحيـــدة التي يمكن أن يدخل بها المتقـــارن المناعي وبسمم الخـــلايا cells تكون من خلال قابليتها لـــربط binding والمعالجـــة الذاتية مع مســـتقبل EGF . ويكـــون المتقارن التســـاهمي المباشـــر جيلـــونين A108 – gelonin فعال أيضـــاً في قتل A431 بإدخال الجيلونيـــن gelonin إلـــى داخل الخلية

في الخـــلايا cells، A431 (مثلثات مفتوحة) . و يحمي وجـــود ١٠٠ ضــعف مول إضافي من A108 مع ذلك المتقـــارن المباشر أيضــاً الخـــلايا cells من التسمم الداخلـــي بواســـطة الجيلونيـــن gelonin ، مما يوضح أن جيلونيـــن gelonin – A108 تم إدخالـــه إلـــى داخـــل الخلية cell عن طـــريق قابلية للتفاعل والمعالجة الذاتيـــة مع مستقبل EGF . وهكذا ، سوف يسمح اســـتخدام تفاعل أفيديـــن : بيوتين biotin:avidin بإدخال الجـــزيء إلـــى داخـــل الخليـــة cell إذا اتجه وتم حمله إلـــى داخل الخليـــة cell مع جسم مضاد antibody قـــادر علـــى تمييز المســـتضدات antigen علي الخليـــة cell الذي يدمج كليـــاً بعـــد تشـــابكه مـــع المستتضد antigen (يكون في هذه الحالة مُستَقبل EGF).

مثـــال ٩

<u>تأثير تتابعـــات الحمـــض النووي nucleic acid ثلاثية الحلـــزون triple helix علـــى إفـــراز بروتيـــن protein مستقبل EGF.</u>

تم إيضاح قابليـــة قليل النوويـــد oligonucleotide ثلاثي الحلـــــزون triple-helix أو تتابعـــات الحمض النووي nucleic acid لإخماد إفراز بروتيـــن protein مستقبل EGF فـــي الخلية السمية . وتمت حضـــانة الخـــلايا A431 لمدة ٧٢ ساعة مع ٤٠ ميكرو مولار متتابعة EGF مستقبل جيـــن حمـــض نووي nucleic acid (EGFr ٥ #) قادر علـــى ربط binding منطقة حث (محضض) جيـــن gene مُستقبل EGF أو متتابعـــة قياســـية (تحتـــوي نفـــس الأحماض النووية nucleic acid ولكن تتابع عشوائي).

وتم تحضـــير تتابعـــات EGFr ٥ # والحمض النووي nucleic acid القيـــاس فـــي وسط بالتســـخين إلـــى ٩٥٠°م لمدة ٢ – ٥ دقائق ثم الترشـــيح المعقـــم . وتم إزالـــة وسط النمو من أوعية مزرعة الخـــلايا cells محتـــوية علـــى ٢ × ١٠° خـــلايا A431 cells . وتم إضافة EGFr ٥ # مخفـــف في وسط ٢ مللي لتر إلـــى تركيز نهائي ٤٠ ميكرو مولار إلـــى وعاء واحد . وتم تخفيف تتابعـــات الحمض النووي nucleic acid القياســـي في وســـط ٢ مللي لتـــر إلـــى تركيـــز نهائي ٤٠ ، ميكرو مولار وأضيف ذلك المحلول إلـــى وعـــاء آخـــر من الخـــلايا A431 . وتم إضافـــة ٢ مللي لتر من الوســـط فقط إلـــى وعاء ثالث تم

الحضانة لمدة ٧٢ ساعة . وتم حصد الخلايا عن طريق غسل كل وعاء ثلاث مرات مع PBS مبرد على الثلج . ولإذابة الخلايا cells واستخلاص البروتين protein ، تم إضافة محلول منظم ١ مللي لتر RIPA وتحررت الخلايا مع كاشط للخلايا ونقلت إلى أنبوبة طرد مركزي وتم معالجة كل أنبوبة صوتياً باستخدام ممزق الخلايا Kontes وعولجت بالطرد المركزي في جهاز الطرد المركزي Sormall Vetra لمدة ساعة عند ٤°م عند ١٠٠,٠٠٠ (x g) . و بعد عملية الطرد المركزي تم إزالة السائل الطافي وتحديد محتوى البروتين protein بواسطة اختبار البروتين BCA (Pierce) protein).

وكان المستقبل EGF في تلك المستخلصات عبارة عن راسب مناعي مع الجسم المضاد A108 antibody وكاشف ارتباط الجسم المضاد antibody غير القابل للذوبان بانسوربين pansorbin . وتمت حضانة السائل الطافي المحتوى ٢٠٠ ميكرو جم من البروتين protein لمدة ساعتان عند ٤°م مع ٢,٥ ميكرو جم من الجسم المضاد A108 antibody . وتم إضافة ٥٠ ميكرو لتر من البانسوربين pansorbin إلى كل عينة ، وتم تقليبها واحتضانها لمدة ٣٠ دقيقة عند ٤°م . و تم غسل مستقبل EGF المرتبط مع A108 – بارنسوربين pansorbin لإزالة البروتينات proteins الأخرى . و بعد الطرد المركزي لمدة دقيقة (٤°م) على جهاز الطرد المركزي الصغير Sormall عند ١٢٠٠٠ دورة / دقيقة ، تم تصفيق السائل الطافي . وتم غسل الكريات عن طريق إعادة التعليق ثلاث مرات مع PBS يحتوي ٠,١ ٪ تريتون Triton تم الطرد المركزي ثم إعادة تكوين الكيات بالطرد المركزي بعد كل مرة من إعادة التعليق . وبعد الغسيل النهائي والطرد المركزي ، تم صب السائل الطافي.

وتم الكشف عن مستقبل EGF الموجود في كل راسب مناعي عن طريق حضنة مع ATP إشعاعي مميز (32 p) وتم إعادة تعليق الكرية في ٢٥ ميكرو لتر من ٠,٤ ميلي مولار فانادات Na vanadate في ٢٠ م م Hepes محلول منظم (رقم هيدروجيني pH ٧,٤) . وبعد ذلك تم إضافة ٢٥ ميكرو لتر من محلول منظم ٢٠ ميلي مولار Hepes يحتوي ATP مميز (^{32}P – 10 µCi) و ١٢ ميلي مولار $MnCl_2$. وتمت

حضانة العينات لمدة ٥ دقائق عند درجة حرارة الغرفة . وحيث أن مستقبل EGF يحتوي على أنزيم enzyme فعال قادر علي نقل ^{32}P التي تم نقلها إلى مستقبل EGF تصبح مقياس لكمية مستقبل EGF في الراسب المناعي من كل من الليزات lysates . ويمكن مقارنة كمية الإشعاع على مستقبل EGF عن طريق فصل مستقبل EGF عن ^{32}P ATP الحر بواسطة SDS PAGE وقياس مستقبل EGF المشع بواسطة مقياس الإشعاع على جل بولي اكريلاميد polyacrylamide gel باستخدام فيلم أشعة X– ray film تجاري.

وتم إضافة ١٥ ميكرو لتر من ٥ × – عينة محلول منظم Laemli إلى العينة ، وتم تسخين العينة إلى ٩٥°م لمدة ٥ دقائق ثم وضعت على ٧,٥ ٪ جل بولي أكريلاميد . وتم فصل البروتينات proteins بالرحلان الكهربي electrophoresis طوال الليل عند ١٤ mA . وتم إزالة الجل gel من جهاز الرحلان الكهربي electrophoresis وثبت في ٤٠ ٪ ميثانول methanol ، ١٠ ٪ حمض خليك acetic acid ، ٥٠ ٪ ماء مكرر التقطير لمدة ساعة . وجفف الجل gel على مجفف جل BioRad 583 gel لمدة ساعتين عند ٨٠°م.

و كما يظهر في شكل ١٠ ، تعمل حضانة الخلايا cells مع تتابعات الحمض النووي nucleic acid الموجهة ضد متتابعة مُحَضّض جين gene promoter مستقبل EGF (تسمي EGFr مضاد – الحس (labeled anti-sense EGFr)) على خفض معدل مستقبل EGF في خلايا A431 خمس مرات بالمقارنة بتتابعات الحمض النووي nucleic acid العشوائية (تسمي EGFr) أو المحلول المنظم منفرداً (labeled control) . وهكذا ، يعمل احتضان الخلايا مع التركيزات العالية من تتابعات الحمض النووي nucleic acid ثلاثية الحلزون triple-helix التي تتفاعل مع منطقة المحضض promoter في جين gene مستقبل EGF في الخلايا A431 cells السليمة.

مثــــال ١٠

تم إدخال تتابعــات الحمــض النووي nucleic acid : A 108 إلى الخـــلايا A431 خلال رابطة أفيــدين avidin : بيوتين biotin . ولإيضـــاح أن تتابعــات الحمـض النــووي nucleic acid التي تتجــه في مقابلة متتابعة محضض جيــــن gene promoter الحـث فــي المستقبل EGF تدخـل إلــى الخـلايا A431 باستخدام الجســـم المضــاد A 108 antibody ويتم تحضــير متقارن أفيــدين avidin – A 108 المرتبط كيميائيــاً chemically ويتم تنقيته . ويتم تخليق تتابعــات الحمــض النووي nucleic acid ولكن مع اســتبدال نوويــد – بيوتيــن biotinylated-nucleotide مع نوويــد طبيعي normal nucleotide عند أحد المواضـــع فــي التتابــع (ويفضــل عند نهــاية أو بداية السَــلْسَــلَةْ) . وتتم حضـــانة تلــك التتابعــات مع أفيــــدين avidin – A 108 للســماح بتكــوين المتراكبــات المحتويــة علـــى أفيــــدين A 108 avidin : بيوتيــن biotin – حمض نووي nucleic acid . ويتم تنقيـــة purification تلك الجــزيئات المهجنة لإزالة تتابعــات الحمض النووي nucleic acid الحــر ويم تحديــد كميــة الحمض النووي nucleic acid المصاحبــة مع أفيدين avidin – A 108 وحضــنها مع الخــلايا A431 cells . و إذا تم إدخـــال تتابعات الحمض النووي nucleic acid لإخمـــاد – تعبيــر الجيــن gene expression إلـــى المنطقــة الصحيحة داخــل الخليــة فــي الخلايــا A431 cells فلابد من قياسها بيو كيميــائياً . ويتم قياس خاصـــية تتابعـــات الحمـــض النووي nucleic acid لقطــع أو مقاطعة إفــراز مستقبل EGF بواســطة مقــارنات المناعــة المتكونة بين EGFr مضاد – الحس non-sense ، أو EGFr ، مع أفيــــدين avidin – A 108 وقياس فســفرة phosphorylation المستقبل EGF كما وصــف في مثــال ٩ . و بالإضـــافة إلــى ذلك ، يتم اختـــبار قابلية تتابعــات الحمض النووي nucleic acid للدخـــول إلـــى الخلية من خلال تكــوين متراكبــات مستقبل EGF : A 108 باســـتخدام كميـــة مولاريــة كبيـــرة زائــدة من A 108 الحر في مخلــوط الحضـــانة مع الخـــلايا A431 cells . و يـــتم تثبيط التأثيــرات الخامدة للجزيئات المهجنة المتكــونة من جســم مضاد: تتابعــات الحمض النووي antibody: nucleic acid ، في وجــود A 108 الحر وتأكيــد أن الأحمـــاض النووية

nucleic acids قد دخلت إلى الخلايا cells بواسطة الاندماج الكلي مع الأجسام المضادة antibodies خلال التشابك مع سطح الخلية في المستضد antigen مثل مستقبل EGF.

مثال ١١

يتم استخدام أحماض نووية – بيوتينة biotinylated-nucleic acids كبيرة لتحديد ما إذا كان دخولها إلى الخلية cell يحدث خلال آلية أفيدين avidin : 108 A أم لا . وسوف يتم مقارنة تركيز تتابعات الحمض النووي nucleic acid المقدمة إلى الخلايا cells خلال أسلوب أفيدين avidin – 108 A والتي تكون ضرورية لتعديل modification معدلات مستقبل EGF مع تتابعات الحمض النووي الحرة free nucleic acid في المحلول . وتم أختبار قابلية أفيدين avidin – 108 A لتوجيه تتابعات الحمض النووي nucleic acid إلى خلايا إفراز المستضد antigen الفعالة (مثل مستقبل EGF) باستخدام خلايا معينة من خلايا حيوانية تفرز هذا المستضد antigen . وتم قياس إخماد المستقبل EGF . وتم استخدام كل من التتابعات المضادة للحس antisense للحمض النووي nucleic acid المتراكبة مع أفيدين – 108 A (بالإضافة إلى خلايا لا تفرز المستضد antigen) كمقياس لخاصية نظام النقل delivery system والنوعية البيوكيميائية الخلوية biochemical specificity.

مثال ١٢

ويتقارن الجسم المضاد أحادي النسيلة ضد المستضد antibody monoclonal antigen المفرز الخاص بسرطان الثدي HER2/Neu (مثل TAb 250) كيميائياً chemically مع الأفيدين avidin كما وصف في الأمثلة ١ – ٤ للجسم المضاد antibody 108 A . ويتم تخليق تتابعات الحمض النووي nucleic acid ضد المستضد antigen (SEQ DNO. 1) (5 ' AACGTTGAGGGGCAT – 3') c–myc مع بيوتين أدنين نوويد biotinylated adenine nucleotide ليحل محل الأدينوسين adenosine عند الوضع الطرفي terminal'5 . وتتم حضانة تتابعات الحمض النووي أدنين بيوتين

biotinylated adenine nucleic acid مع أفيدين avidin – TAb – ٢٥٠ وتم تنقية purification متراكبات حمض نووي nucleic acid – جسم مضاد antibody تتكون من TAb – ٢٥٠ – antisense – c-myc . وتتم حضانة تلك المتراكبات مع خلايا cells ورم صدري تفرز HER2/Neu على سبيل المثال خلايا BT – ٤٧٤ أو خلايا سالبة negative cells للمستضد antigen هذا ، مثل الخلايا BT – ٢٠ . ويتم قياس إخماد c-myc بواسطة الأحماض النووية المضادة للإحساس antisense mucleic acids عن طريق التمثيل البياني للبروتين c-myc protein من ميزات الخلية غير النقي . ويتم تغيير إفراز c-myc في الخلايا cells – الموجبة HER2/Neu ولكن ليس في خلايا المستضد antigen السالبة . وبالإضافة إلى ذلك ، تكون النوعية مفهومة ضمناً إذا كان هناك إضافة كبيرة (١٠٠ ضعف) من TAb – ٢٥٠ غير المعدل قابلة لتثبيط التأثيرات الخامدة لمتراكبات الجسم المضاد antibody – الحمض النووي على c-myc في خلية المستضد antigen cell الموجبة . ويتم تغيير تتابع الحمض النووي البيوتيني biotinylated عن طريق تغيير وضع النوويد – البيوتين biotihylated-nucleotide داخل المتتابعة أو بزيادة حجم المتتابعة متكاملة مع وبعيدة عن موضع بدء الترجمة أو الوصلة الأولي على c-myc mRNA ويتم اختيار التعديلات modifications للحصول على أكثر متتابعة محددة حساسة مضادة للإحساس التي تنتقل لخلايا سرطان الثدي التي تفرز المستضد HER2/Neu antigen الذي يخمد إفراز c-myc.

مثال ١٣

يتقارن الجسم المضاد أحادي النسيلة A 108 monoclonal antibody كيميائياً chemically مع الأفيدين avidin كما سبق وصفه في الأمثلة ١ – ٤ . ويتم تخليق قليل النوويد oligonucleotides التي تمثل التتابع المتكامل مع موضع بداية ترجمة عامل نمو الخلية الليفية الأساسية (bFGF) mRNA (5' – GGCTGCCATGGTCCC – 3') (SEQ ID No 2) مع جوانوسين بيوتين biotihylated guanosine بدلاً من النوويد nucleotide غير المعدل عند الموضع

الطرفي – ٥ 5'-terminal . وتتـم حضـانة تلك التتابعـات مع أفيـدين avidin – 108 A لتكـوين متراكبات حمـض نووي nucleic acid : جسم مضاد antibody وتم تنقيتها بعيـداً عن الحمض النووي nucleic acid غير المتراكب . وتتـم حضـانة تلك المتراكبـات مـع خـلايا cells ورم (دبقـي (glioma) بشري (SNB – ١٩) التـي تفـرز مسـتقبل EGF وتعتمـد علـى خلايا تخليق bFGF لحث نموها . وبعد الحضـانة مع هذا المتقـارن ، يـتم قيـاس نمو الخليـة SNB لتحديد مدي إخماد النمو عن طريق منـع إفراز bFGF في تلـك الخـلايا المستهدفة target cells . وكما سـبق وصفه ، تتم الحضـانة المشـتركة للزائـد من 108 A مع متراكبات حمض نووي nucleic acid / 108 A لتقييـم النوعيـة ولتأكيـد آليـة دخول التتابعـات المضـادة للحس antisense خـلال للمسـتضد antigen.

مثـال ١٤

يتقارن الجسـم المضـاد أحـادي النسـيلة monoclonal antibody ، BR96 ، الذي يرتبط المستضد Lewis Y antigen على العـديد من الأورام البشـرية كيميائيـاً مـع الأفيـدين avidin كما سـبق وصـفه . ويتـم تخليـق قليـل النوويـد المضـاد للحـس المتكـامل مع تتـابع C-Ha-ras 5' antisense oligonucleotides كيميائيـاً . 5'- CAGCTGCAACCCAGC-3' ((SEQ ID No. 3) مع نـوويد سيتوسـين بيـوتين biotinylated cytosine nucleotide بـدلاً من السيتوسين cytosine غير المعدل في الموضع ٥ 5' position . و تتكـون قليـل النـوويدات BR 96 oligonucleotides – المضـادة للحـس antisense بواسطة الحضـانة مع شـرائح T 24 لخلايا cells سـرطانية تفرز المسـتضد Lewis Y antigen وتحتوي أيضـاً مولـد الـورم C-Ha-ras oncogene . وبعد حضـانة متراكبات المناعة – الحمض النووي مع خـلايا T 24 ، ويتـم مراقبة ناتـج مـولد الـورم Ras oncogene , P 21 ، بواسطة التمثيل البيـاني . ويتم أيضـاً مراقبة نمـو الخلية . ويتم إيضاح معادلة تأثيرات مـولد الـورم Ras oncogene عـن طريـق نقـل الجزيـئات المضـادة للحس antisense إلـى داخـل الخليـة خلال الاندمـاج الكلـي للمسـتضد Lewis Y antigen .

مثال ١٥

تم تخليق المتقارن الكيميائي أفيدين A 108 – avidin chemical كما سبق وصفه واستخدم في الاندماج الكلي لجزيئات RNA مزدوجة الجديلة تكون سامة للخلية لبعض الخلايا السرطانية المعينة . ويتم تخليق بوليمر أينوسين polymer inosine (PI) كيميائياً chemically (٤٠ mer) وتم تهجينة مع بولي سيتوسين polycytosine 39 mer مع سيتوسين cytosine طرفي يشتق مع البيوتين biotin . وتتم حضانة ذلك الجزيء RNA مزدوج الجديلة مع متراكبات أفيدين A 108 – avidin وأفيدين A 108 – avidin : بيوتين PI biotin : PC ويتم تنقيته ووضعه في وسط النمو من ME – ١٨٠ من خلايا سرطانية تفرز مستقبل EGF ويكون حساس لـ PI : PC) ويتم قياس انتقال ds RNA إلى داخل الخلية cell برغم الاندماج الكلي لمستقبل EGF عن طريق مراقبة بقاء الخلايا cells بعد الحضانة مع ذلك التركيب . وسوف يوضح تسمم الخلايا الذي يحدث بواسطة الحضانة مع ذلك المتقارن أن الأحماض النووية يمكن أن تنتقل إلى مجموعة معينة من الخلايا مع ناقل vector غير فيروسي non-viral.

و تكون جميع البراءات والنشرات المذكورة في هذا الوصف مؤشر لمستوى المشتغلين في المجال الذي يتعلق به الاختراع وتعتبر جميعها مراجع في هذا الوصف.

وسوف يدرك المشتغلون في المجال أن هذا الاختراع يمكن إعداده لتحقيق الأهداف والحصول على المميزات السابق الإشارة إليها ، بالإضافة إلى تلك الموجودة به . وتمثل الأمثلة والطرق والخطوات والمعالجات والجزيئات والمركبات التي تم وصفها ، التجسديات المفضلة ولكن لا يقتصر عليها الاختراع . وتكون التغييرات واضحة للمشتغلين في المجال وتقع في إطار وروح هذا الاختراع.

عناصر الحماية

١- متقـــارن مناعي immunoconjugate يحدث ويرتبـــط coupled خـــلال تفاعـــل أفيـــدين – بيوتين avidin-biotin ، يتضـــمن مكون ربط خلية cell binding ذاتي به عنصـــر ربـــط بيوتين biotin binding يتقـــارن conjugated مع جـــزء بيوتيـــني biotinylated ، حيث يـــتم اختيار جزء البيوتين biotin من المجموعة التي تتكون من بروتينات سامة cytotoxic proteins للخلايا وأحمـــاض نووية nucleic acids ، حيث يتم اختيـــار ذلك البـــروتين protein مـــن المجمـــوعة التـــي تتكـــون مـــن gelonin ، ricin ، saporin ، abrin ، diptheria toxin، psuedomonas exotoxin، rayalase، superoxide، dismutase، protein tyrosine phosphatase ، protein phosphatase (PP-1 or PP-2)، protein kinase A و protein kinase C.

٢- ناقل متقارن المناعة immunoconjugate vector وفقـــاً لعنصر الحماية رقم ١ ، حيـــث يتـــم اختيار عنصر ربط البيوتين biotin-binding element من المجموعـــة التي تتكـــون من أفيديـــن avidin ،-ستربتافيـــدين streptavidin أو أشـــباه الأفيـــدين avidin والســـتربتافيدين streptavidin.

٣- متقارن المناعة immunoconjugate وفقـــاً لعنصـــر الحماية رقـــم ١ ، حيـــث يكـــون مكـــون الارتباط بالخـــلايا cells هو جسم مضاد أحادي النســـيلة monoclonal antibody.

٤- الناقـــل متقارن المناعـــة immunoconjugate vector وفقـــاً لعنصر الحمايـــة رقـــم ٣ ، حيث يرتبط الجســـم المضـــاد أحـــادي النســـيلة monoclonal antibody علـــى وجـــه الخصـــوص مســـتضد antigen يتـــم اختياره من المجمـــوعة التي تتكـــون من مســـتقبل عامل نمـــو الجلـــد والبشـــرة epidermal growth factor receptor ، c-erbB2 antigen ، Lewis Y antigen ، transferrin receptor ، MDR1 ، MDR3 ، و insulin receptor ، GD2 ، GP 240 , CD33 , CD45 , GD 3 ، و fibroblast growth factor receptor ، و مســـتقبل عامـــل نمو مشتق من الصفائح platelet derived growth factor receptor.

٥- طريقة لنقل delivering جزء سام cytotoxic moity إلى خلية تتضمن الطريقة تناول الإنسان متقارنْ مناعي immunoconjugates يرتبط خلال تفاعل أفيدين – بيوتين avidin-biotin حيث يشتمل المتقارن المناعي على مكون ربط خلية cell binding ذاتي به جزء ربط بيوتين biotin binding يتقارن مع جزء بيوتين biotin ، حيث يتم اختيار جزء البيوتين biotin من المجموعة التي تتكون من بروتينات proteins سامة للخلايا cells وأحماض نووية nucleic acids ، حيث يتم اختيار ذلك البروتين proteins من المجموعة التي تتكون من gelonin ، ricin ، saporin ، abrin ، diptheria toxin ، psuedomonas exotoxin ، rayalase ، superoxide ، dismutase ، protein tyrosine phosphatase ، protein phosphatase (PP-1 or PP-2)، protein kinase A ، protein kinase C.

٦- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم ٥ ، حيث يتم اختيار عنصر ربط البيوتين biotin-binding element من المجموعة التي تتكون من أفيدين avidin ، ستربتافيدين streptavidin أو أشباه الأفيدين avidin والستربتافيدين streptavidin.

٧- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم ٥ حيث يكون مكون الارتباط بالخلايا cells هو جسم مضاد أحادي النسيلة monoclonal antibody.

٨- الطريقة وفقاً لعنصر الحماية رقم ٧ ، حيث يرتبط الجسم المضاد أحادي النسيلة monoclonal antibody على وجه الخصوص antigen يتم اختياره من المجموعة التي تتكون من مستقبل عامل نمو الجلد والبشرة epidermal growth factor receptor ، c-erbB2 antigen ، Lewis Y antigen ، transferrin receptor ، MDR1 ، MDR3 ، insulin receptor ، GD2, GD 3 , CD45 , CD33 , GP 240 ، fibroblast growth factor receptor ، مستقبل عامل نمو مشتق من الصفائح platellet derived growth factor receptor.