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

[11] رقم البراءة:١١٣
[45] تاريخ المنح: ١٤٢٤/١٢/١٩هـ
الموافـــق: ٢٠٠٤/٠٢/١٠م

[12] براءة اختراع

[72] **اسم المخترع:** فو – كوين لين
[73] **مالك البراءة:** كيرين ــ امجين انك
عنوانه: ١٨٤٠دينهافيلاند درايف ، ثاوساند اوكس ، كاليفورنيا ،١٧٨٩ –٩١٣٢٠ ، الولايات المتحدة الامريكية
[74] **الوكيل:** أحمد نجدت بازارباشي

[21] **رقم الطلب:** ٩٢١٣٠٢١٤
[22] **تاريخ الإيداع:** ١٤١٣/٠٥/٠٦ هـ
الموافق: ١٩٩٢/١٠/٣١ م

[24] **بداية سريان حقوق الملكية الفكرية:**
١٤٢٤/١٢/١٩ هـ الموافق: ٢٠٠٤/٠٢/١٠ م
[30] **بيانات الأسبقية:**
١٩٨٣/١٢/١٣ م امريكا [US] ٨٣٥٦١٠٢٤
[51] **التصنيف الدولي[7] :**
Int. Cl.[7]: C12N 15/00, C12P 21/02
[56] **المراجع:**
براءة أمريكية ٤٢٥٤٠٩٥ ١٩٨١/٠٣/٠٣ م
طلب بريطاني ٢٠٨٥٨٨٧ ١٩٨٢/٠٥/٠٦ م

[54] **اسم الاختراع:** إنتاج اريثروبويتين Erythropoietin

[57] **الملخص:** يتم وصف عديد ببتيدات polypeptides جديدة بها جزء من او كل التكوين التركيبي الأولى وواحدة او اكثر من الخصائص البيولوجية لهرمون اريثروبويتين Erythropoietin (EPO) في الثديات والتي تتميز فى الصور المفضلة بكونها ناتج لانتاج عائل اولى النواة procaryotic او حقيقي النواة eucaryotic لتتابع DNA الخارجى exogenous DNA. وعلى سبيل التوضيح، يتم ادخال DNA الجينومى genomic DNA ، cDNA، وتتابعات DNA المُصنع التى تحمل كود (شفرة) جزء من او كل تتابع شقوق الحمض الامينى الخاص بهرمون EPO او لمماثلاته، فى بلازميد Plasmid او ناقلات فيروسية viral victors تتكاثر بمفردها والمستخدمة لتحويل او تثبيت خلايا العائل اولى النواة procaryotic او حقيقي النواة eucaryotic مثل البكتريا bacteria، الخميرة yeast او خلايا الفقاريات vertebrate cells فى مزرعة. وعند الفصل من وسط المزرعة او قطع او نواتج التحلل الخلوية cellular lysates ، تظهر نواتج انتاج تتابعات DNA مثلا، الخصائص المناعية والأنشطة البيولوجية المعملية خارج الجسم in vitro وداخل الجسم in vivo لهرمون EPO فى الانسان والقرود. ويتم كذلك وصف عديد ببتيدات polypeptides مركب كيميائياً ويشارك EPO في خصائصه الكيميائية الحيوية والمناعية. ويتم ايضا وصف الطرق المحسنة لاكتشاف عديد النيوكليوتيدات المجددة فردية الشرائط specific single stranded polynucleotides فى عينة غير متجانسة خلوية heterologous او فيروسية viral والمحضرة مثلا من: DNA الموجود فى بلازميد plasmid او cDNA فيروسي المنشأ viralborne، او "مكتبة" DNA الجينومية.

٣١ عنصر حماية ، ٤ أشكال

انتاج اريثروبويتين Erythropoietin

خلفية الاختراع

يتعلق هذا الاختراع بوجه عام بتعديل المادة الجينية وبالتحديد بطرق الاستنساخ recombinant procedures التى تسمح بانتاج عديد ببتيدات polypeptides ذات جزء من او كل التكوين التركيبي الاولى.

(أ) تعديل المادة الجينية

يمكن بشكل عام تعريف المادة الجينية بانها المواد الكيميائية التى ترشد وتحمل برنامج تصنيع مكونات الخلايا والفيروسات وتوجه استجابات الخلايا والفيروسات. وتشتمل مادة بوليميرية طويلة السلسلة تعرف باسم حمض نووي ريبوزي منقوص الاكسجين (DNA) على المادة الجينية لكل الخلايا الحية والفيروسات باستثناء الفيروسات التى تحمل برنامج احماض نووية ريبوزية (RNA). والوحدات المتكررة فى بوليميرات DNA هى اربعة نيوكليوتيدات nucleotides مختلفة، كل منها يتكون اما من بيورين purine (ادنين adenine او جوانين guanine) او بيريميدين pyrimidine (ثايمين thymine او سيتوزين cytosine) مرتبطة مع سكر ريبوزمنزوع الاكسجين والمرتبطة معه مجموعة فوسفات. ويتم ارتباط النيوكليوتيدات فى صورة بوليميرية خطية عن طريق اتحاد الفوسفات ٥` لاحدى النيوكليوتيدات مع مجموعة الهيدروكسيل ٣` للأخرى. ويظهر DNA الوظيفي في صورة اتحادات ثابتة ثنائية الشرائط من شرائط فردية من النيوكليوتيدات (والمعروفة باسم ليجونيوكليوتيدات منزوعة الاكسجين deoxyoligonucleotides)، وتحدث هذه اتحادات عن طريق روابط هيدروجينية بين قواعد البيورين والبيريميدين [أي: اتحادات "مكملة" توجد إما بين أدنين A وثايمين T أو جوانين G وسيتوزين C]. وبشكل تقليدي يشار إلى النيوكليوتيدات بأسماء قواعدها المكونة من بيورين أو بيريميدين ، ويشار إلى الاتحادات المكملة من النيوكليوتيدات في DNA ثنائي الشرائط (أي A-T وG-C) باسم "أزواج القاعدة". وحمض نووي ريبوزي هو عديد نيوكليوتيد (نيوكليوتيد متعدد)

يشتمل على أدنين، جوانين، سيتوزين ويوراسيل Uracil (U) ،بدلا من ثايمين، مرتبطة مع ريبوز ومجموعة فوسفات.

وباختصار شديد، يتم إجراء وظيفة البرمجة الخاصة بحمض DNA بوجه عام من خلال عملية فيها يتم "وصف" تتابعات (جينات) نيوكليوتيد DNA محددة في بوليمرات RNA مراسل (mRNA) غير ثابتة نسبياً. ويعمل mRNA بدوره كقالب لتكوين بروتينات تركيبية تنظيمية أو حفازة من الاحماض الأمينية. وترتبط عملية "ترجمة " mRNA هذه عمليات شرائط RNA ناقلة(tRNA) التي تنقل وتنظم صفوف الاحماض الأمينية الفردية بطول شريط mRNA لتسمح بتكوين ببتيدات متعددة في تتابعات الحمض الأميني المناسبة. و"رسالة" mRNA المشتقة من DNA والتي توفر أساس لأعطاء وتوجيه tRNA لأياً من الأحماض الامينية العشرين "لانتاج" الببتيد المتعدد، تكون في صورة "كودونات" ثلاثية "codons" triplet– وهى مجموعات تتابعية من ثلاثة قواعد نيكليوتيدية. وبمعنى أخر، تكوين بروتين هو الصورة النهائية "لإنتاج" الرسالة المبرمجة الجينية التي يعطيها التتابع النيكليوتيدي للجين.

وعادة ما "تسبق" تتابعات DNA "المحفز" "promoter" جين في بوليمر DNA وتوفر موقع لبدء النسخ transcription في mRNA . وعادة ما تقوم تتابعات DNA "المنظم" "Regulator" التي تسبق جين في البوليمر DNA محدد، بربط البروتينات التي تحدد معدل بدء النسخ. وهذه التتابعات التي تسمي بشكل شامل باسم تتابع DNA "المحفز/ المنظم" أو "المتحكم"، والتي تسبق جين مختار (أو سلسلة من الجينات) في بوليمر DNA وظيفي تتعاون لتحديد ما إذا كان نسخ (وبالتالى إنتاج) الجين سيحدث أم لا. ويشار الى تتابعات DNA التي "تتبع" جين في بوليمر DNA وتعطي إشارة لإنهاء النسخ في mRNA بأنها تتابعات "المنهية" "terminator" للنسخ.

وتم التركيز في العمليات الميكروبيولوجية في العقد الأخير على محاولة تصنيع مواد هامة صناعياً ودوائياً باستخدام كائنات حية إما أن لا يكون لها أساساً معلومات مشفرة جينياً تتعلق بالناتج المطلوب في DNA الخاص بها، أو (في حالة

خلايا الثدييات في المزرعة) لا تقوم عادة بانتاج جين كروموسومي بمستويات واضحة. وببساطة، إما أن يتم فصل جين خاص بتركيب ناتج ببتيدي متعدد مطلوب، من كائن حي "مانح" أو يتم تخليقه كيميائيا ثم إدخاله بشكل ثابت في كائن حي آخر والذي يفضل أن يكون كائن حي أحادي الخلية unicellular يتكاثر ذاتياً مثل البكتريا، الخميرة أو الخلايا الثديية في المزرعة. وبمجرد حدوث ذلك، تعمل الالية الموجودة لإنتاج الجين في خلايا العائل الميكروبي "المتحولة" أو "المثبتة" لبناء الناتج المطلوب، باستخدام DNA الخارجي كقالب لنسخ mRNA والذي تم ترجمته بعد ذلك الى تتابع شقوق الحمض الأميني.

والمجال غني بالبراءات والنشرات المتعلقة بطرق "DNA المستنسخ" لفصل، تخليق، تنقية وتعزيز المواد الجينية للاستخدام في تحويل الكائنات الحية العائلة المختارة. على سبيل المثال، تتعلق البراءة الامريكية رقم ٤٢٣٧٢٢٤ باسم Cohen وزملاؤه، بتحويل الكائنات الحية العائلة وحيدة الخلية unicellular مع "هجين hybrid" DNA فيروسي أو بلازميد دائري والتي تشمل تتابعات DNA خارجي مختارة. وتتعلق طرق براءة Cohen وزملاؤه أولا بتصنيع ناقل التحويل عن طريق الانشطار الانزيمي لحمض DNA الفيروسي أو البلازميد الدائري لتكوين شرائط DNA خطية. ويتم تحضير شرائط DNA الغريبة المختارة ("الخارجي exogenous" أو "المختلف heterologous") والذي يتضمن عادة تتابعات تحمل شفرة الناتج المطلوب، في صورة خطية من خلال استخدام انزيمات مماثلة. ويتم تحضين DNA الفيروسي أو البلازميد الخطي مع DNA غريب في وجود إنزيمات رابطة قادرة على تحقيق عملية استعادة ويتم تكوين نواقل "هجينة hybrid" والتي تشمل قطعة DNA الخارجية المختارة "متصلة" مع DNA الفيروسي او البلازميدي الدائري.

وينتج عن تحويل الكائنات الحية العائلة وحيدة الخلية المتوافقة بواسطة الناقل الهجين، تكوين نسخ متعددة من DNA الخارجي في مجموعات الخلية العائلة. وفي بعض الحالات، تكون النتيجة المطلوبة ببساطة هي تعزيز DNA الغريب و"الناتج" هو DNA. وغالباً، يكون هدف التحويل هو إنتاج الخلايا العائلة لحمض DNA

الخارجي في صورة تخليق واسع النطاق لكميات يمكن فصلها من بروتين أو قطع عديد ببتيد هامة يحمل شفرتها DNA الغريب. يمكن كذلك الرجوع للبراءات الأمريكية أرقام ٧٣١، ٢٦٤، ٤ (باسم Shine)، ٨٧٥، ٢٧٣، ٤ (باسم Manis)، ٦٥٢، ٢٩٣، ٤ (باسم Cohen)، وطلب البراءة الأوربية ٦١٩، ٠٩٣ المنشورة في ٩ نوفمبر ١٩٨٣.

ويتم تطوير تتابعات DNA محددة التوصيل مع نواقل DNA، بعدة طرق مختلفة، تعتمد بشكل كبير على درجة "غرابة" "المانح" للعائل المقصود وحجم الببتيد المتعدد الذي يتم إنتاجه في العائل. ولخطورة التبسيط الزائد، يمكن ذكر أنه يمكن استخدام ثلاثة طرق رئيسية:

(١) "فصل" تتابع DNA مزدوج الشرائط من DNA الجينومي للمانح؛

(٢) تصنيع تتابع DNA كيميائياً لإعطاء شفرة لعديد الببتيد المطلوب؛ و

(٣) التخليق المعملي لتتابع DNA مزدوج الشرائط بواسطة "النسخ العكسي" "reversetranscription" الإنزيمي لحمض mRNA المفصول من الخلايا المانحة.

ويشار الى الطرق سابقة الذكر والتي تتضمن تكوين "مكمل" DNA لحمض mRNA، بشكل عام باسم طرق "cDNA ".

وغالباً ما يكون تصنيع تتابعات DNA هي الطريقة المفضلة عندما يكون التتابع الكلي لشقوق الحمض الأميني لناتج عديد الببتيد المطلوب معروفاً. على سبيل المثال، تقوم طرق تصنيع DNA لطلب البراءة الأمريكية المعلقة المتضمنة برقم مسلسل ٤٥١، ٤٨٣ باسم Alton وزملاؤه (المودع في ١٥ إبريل ١٩٨٣ وطلب PCT المناظر للبراءة الأمريكية ٨٣/٠٠٦٠٥، المنشور في ٢٤ نوفمبر ١٩٨٣ برقم WO ٨٣/٠٤٠٥٣)، بتوفير وسيلة أفضل للحصول على هذه النتائج المرغوبة بشدة مثل: توفير وجود كودونات codons بديلة موجودة عادة في الجينات التي يتم إنتاجها بشكل كبير في الكائن الحي العائل المختار للإنتاج (مثلاً، توفير كودونات "التفضيل" للخميرة أو. E. coli)؛ تفادي وجود تتابعات "إنترون intron" غير مترجمة (والموجودة عادة في تتابعات DNA الجينومية الثديية ونواتج نسخ mRNA لها) والتي لا يتم تشغيلها بسهولة بواسطة خلايا العائل أولية النواة؛ تفادي إنتاج تتابعات

عديد ببتيد "قائد" غير مرغوبة والتي يحمل شفرتها عادة تتابعات DNA جينـومي و cDNA ولكنها لا تنشطر غالباً بسهولة من الببتيد المتعدد المطلوب بواسـطة خلايـا العائل البكتيري أو الخميرة؛ توفير إدخال سهل لحمض DNA في نواقل إنتاج مناسبة مصحوبة بتتابعات محفزة / منظمة ومنهية مطلوبة؛ وتوفير تكوين سهل لجينات تحمل شفرة قطع ببتيد متعدد ومماثلات للببتيدات المتعددة المطلوبة.

وعندما لا يكون التتابع الكلي لشقوق الحمض الأميني للببتيد المتعدد المطلوب غير معروفاً، فإن التصنيع المباشر لتتابعات DNA لا يكون ممكناً ويصـبح فصـل تتابعات DNA التي تحمل شفرة الببتيد المتعدد بطريقة cDNA هو الطريقة الأفضل برغم احتمالية حدوث عيوب في سهولة تجميع نواقل الإنتاج القـادرة علـى إعطـاء مستويات عالية من الإنتاج الميكروبي المشار الىها سابقاً. ومن ضمن الطرق القياسية لفصل تتابعات cDNA المرغوبة هو تحضير "مكتبات" cDNA ناتج من البلازميـد والمشتقة من النسخ العكسي لحمض mRNA بغزارة في الخلايا المانحـة المختـارة كخلايا مسئولة عن الإنتاج عالى المستوي للجينات (مثلاً: مكتبات cDNA المشـتقة من خلايا الغدة النخامية والتي تنتج أجزاء كبيرة نسبياً من نواتج هرمـون النمـو). وعندما تكون أجزاء أساسية من تتابعات الحمض الأميني للببتيد المتعدد معروفة، فإنه يمكن استخدام تتابعات مجس probe DNA فردي الشرائط مميـز بعلامـة، يقـوم بالنسخ المزدوج لتتابع يزعم أنه موجود في cDNA "المستهدف"، في طرق تهجـين DNA / DNA يتم إجراؤها على نسخ من cDNA والتي تم تحويلها الـى صـور فردية الشرائط. [يمكن بوجه عام الرجوع الى الوصف في المجـال والـذي تـوفره البراءة الأمريكية رقم ٤٤٣، ٣٩٤، ٤ باسم Weissman وزملاؤه، والوصف الحالى لاستخدام مجسات تهجين الأوليجونيوكليوتيد الطويلة التي يشـير الىهـا Wallace وزمـلاؤه فـي Nuc. Acids Res.، ٦، صـفحات ٣٥٤٣ – ٣٥٥٧ (١٩٧٩)، و Reyes وزملاؤه فـي P. N. A. S. (U. S. A)، ٧٩، صـفحات ٣٢٧٠ – ٣٢٧٤ (١٩٨٢)، و Jaye وزمـلاؤه فـي Nuc. Acids Res.، ١١، صـفحات ٢٣٢٥ – ٢٣٣٥ (١٩٨٣). أنظر أيضاً البراءة الأمريكية رقم ٥٣٥، ٣٥٨، ٤ باسم Falkow وزملاؤه، المتعلقة بطرق تهجين DNA / DNA لأغـراض التشـخيص؛ طلبـات

البراءة الأوربية المنشورة أرقام ٠٠٧٠٦٨٥ و ٠٠٧٠٦٨٧ المتعلقة بالعلامات المضيئة على مجسات النيوكليوتيد المتعدد فردي الشريط؛ Daves وزملاؤه في "A Manual for Genetic Engineering, Advanced Bacterial Genetics" Cold Spring Harbor Lab.، Cold Spring Harbor، نيويورك، (١٩٨٠)، في صفحات ٥٥ – ٥٨، و ١٧٤ – ١٧٦، المتعلقة بطرق تهجين المستعمرة والطبقة؛ ونشرات New England Nuclear (بوسطن، ماستشوستس) الخاصة بـ "Gene Screen" Hybridization Transfer Membrane Materials ، والذي يعطي تعليمات لنقل وتهجين DNA و RNA، رقم الكاتالوج 972 – NEF].

ومن ضمن التطورات الحديثة الأكثر أهمية في طرق التهجين لتحديد أدوات الإستنساخ، هو استخدام مجسات أوليجونيوكليوتيد تخليقية مختلطة مميزة، كل منها هو المكمل التام لتتابع DNA محدد في عينة التهجين التي تشتمل على خليط غير متماثل من DNAs و RNAs فردية الشريط. وهذه الطرق معروفة بأنها تفيد تحديداً في اكتشاف نسخ cDNA المشتقة من مصادر تعطي كميات ضئيلة للغاية من تتابعات mRNA الخاصة بالببتيد المتعدد المطلوب. وباختصار، يسمح استخدام ظروف تهجين قاسية موجهة لتفادي الارتباط الغير محدد، مثلاً بالرؤية الإشعاعية autoradiographic visualization لنسخة cDNA محددة عند تهجين DNA المستهدف مع هذا المجس الفردي داخل الخليط وهو المكمل المتمم له. انظر بوجه عام. Wallace وزملاؤه في Nuc. Acids Res.، ٩، صفحات ٨٧٩ – ٨٩٧ (١٩٨١)، Saggs وزملاؤه P. N. A. S (V. S. A) ، ٧٨، صفحات ٦٦١٣ – ٦٦١٧ (١٩٨١)؛ Choo وزملاؤه، Nature، ٢٩٩، صفحات ١٧٨ – ١٨٠ (١٩٨٢)، Kurachi، وزملاؤه (VSA). P. N. A. S، ٧٩، صفحات ٦٤٦١ – ٦٤٦٤ (١٩٨٢)، OhKubo وزملاؤه P. N. A. S (VSA)، ٨٠، صفحات ٢١٩٦ – ٢٢٠٠ (١٩٨٣)؛ Kornblihtt وزملاؤه P. N. A. S (USA)، ٨٠، صفحات ٣٢١٨ – ٣٢٢٢ (١٩٨٣). وبوجه عام، تم توسيع طرق المجس المختلط باسم Wallace وزملاؤه (١٩٨١) المشار اليها سابقاً، بواسطة أشخاص مختلفون لدرجة أنه تم الحصول على نتائج إيجابية في فصل نسخة cDNA باستخدام "حوض" ذو ٣٢

فرداً مختلطاً من مجسات أوليجونيوكليوتيد طوله ١٦ – قاعدة (١٦ مير mer) من تتابعات DNA متنوعة موحدة مع ١١ – مير فردي للحصول على تكوين "إيجابي" ثنائي الموقع من وجود c DNA المطلوب. ويمكن الرجوع الى Singer – Sam وزملاؤه في P. N. A. S (USA)، ٨٠، صفحات ٨٠٢ – ٨٠٦ (١٩٨٣).

ويعد استخدام نواتج فصل DNA الجينومية هو أقل الطرق الثلاثة السابقة شيوعاً لتطوير تتابعات DNA محددة للاستخدام في طرق الاستنساخ. وهذا حقيقي وبخاصة في مجال طرق الاستنساخ الموجهة لتأمين الإنتاج الميكروبي للببتيدات المتعددة في الثدييات وهو نتيجة أساساً لتعقيد DNA الجينومي الثديي. ولذلك وبينما توجد طرق يعتمد علىها في التطوير مكتبات فيروسية من DNA الجينومي الآدمي وذو الأصول الثديية الأخري [يمكن الرجوع مثلاً الى: Lawn وزملاؤه في Cell، ١٥، صفحات ١١٥٧ – ١١٧٤ (١٩٨) المتعلقة بطرق للحصول على مكتبة جينومية بشرية يشار الىها عادة باسم" مكتبة Maniatis"؛ Karn وزملاؤه في (USA) P. N. A. S، ٧٧، صفحات ٥١٧٢ – ٥١٧٦ (١٩٨٠) المتعلقة بمكتبة جينومية بشرية معتمدة على طريقة تجزئة إندونيوكلييز القاصرة البديلة؛ و Blattner وزملاؤه في Science، ١٩٦، صفحات ١٦١ – ١٦٩ (١٩٧٧) التي تصف تكوين مكتبة جينومية بقرية]، وجدت محاولات ناجحة قليلة نسبياً لاستخدام طرق التهجين في فصل DNA الجينومي في غياب المعرفة الكافية لتتابعات DNA أو الحمض الأميني. وكمثال يوضح Fiddes وزملاؤه في J. Mol. and App. Genetics، ١، صفحات ٣ – ١٨ (١٩٨١)، الفصل الناجح لجين يحمل شفرة الوحدة الفرعية ألفا من هرمونات الجلايكوبروتين glycoprotein للغدة النخامية في الإنسان، من مكتبة Maniatis Library من خلال استخدام مجس "كامل الطول" يشتمل على قطعة زوجية من ٦٢١ قاعدة كاملة من تتابع cDNA مفصول مسبقاً خاص بالوحدة الفرعية ألفا. وكمثال أخر، يشير Das وزملاؤه في P. N. A. S (USA)، ٨٠، صفحات ١٥٣١ – ١٥٣٥ (١٩٨٣) الى فصل نسخ جينومية بشرية من HLA – DR البشري باستخدام أوليجونيوكليوتيد تخليقي ذو ١٧٥ زوج قاعدة. وأخيراً يشير Anderson وزملاؤه في P. N. A. S (USA)، ٨٠، صفحات ٦٨٣٨ – ٦٨٤٢ (١٩٨٣) الى فصل نسخة

جينومية لمثبط تربسين البنكرياسي في الأبقار (BPTI) باستخدام مجس فردي ذو طول ٨٦ زوج قاعدة وتم تكوينه طبقاً لتتابع الحمض الأميني المعروف للمثبط BPTI. ولاحظ المؤلفون تحديداً احتمالات ضعيفة لفصل mRNA مناسب لتخليق مكتبة cDNA نتيجة لمستويات منخفضة واضحة من mRNA في مصادر الغدة النكافية ونسيج الرئة المستهدفة مبدئياً، ثم يخاطبون آمال النجاح في صنع مجسات لمكتبة جينومية باستخدام خليط من المجسات المميزة بعلامة، مشيرون الى أنه "بوجه عام، تم استخدام مجسات أوليجو نيوكليوتيد منقوص الاكسجين مختلطة التتابع لفصل جينات بروتين لتتابع غير معروف من مكتبات cDNA. وهذه المجسات هي خليط نموذجي من ٨ – ٣٢ أوليجونيوكليوتيد، ١٤ – ١٧ نيوكليوتيد في الطول، ممثلة كل اتحاد كودون محتمل لامتداد صغير (٥ – ٦ شقوق) من تتابع الحمض الأميني. وتحت ظروف تهجين قاسية والتي تمنع وجود مجسات مزدوجة القاعدة غير صحيحة، تكون هذه الأنواع من الخليط قادرة على إيجاد موقع تتابعات جين محدد في مكتبات النسخ ذات تعقيد ضعيف الى متوسط ومع ذلك، ونتيجة لطولها القصير وعدم تجانسها، فإن المجسات المختلطة غالباً ما تفتقد الخصوصية المطلوبة لتتابعات المجسات المعقدة مثل الجينوم في الثدييات. وهذا من شأنه أن يجعل هذه الطريقة غير عملية لفصل جينات البروتين الثديية عندما لا تتوافر mRNAs المناظرة" (المراجع محذوفة).

ولذلك مازالت هناك حاجة في المجال لطرق محسنة للحصول على فصل سريع وفعال لنسخcDNA في حالات المعروف فيها قليل عن تتابع الحمض الاميني للببتيد المتعدد الذي تم فك شفرته وفيها لا تتوفر مصادر نسيجية "غنية" من mRNA بسهولة للاستخدام في تكوين مكتبات DNA. وتفيد هذه الطرق المحسنة بشكل خاص إذا أمكن تطبيقها لفصل النسخ الجينومية الثديية حيث تتوفر معلومات متفرقة تتعلق بتتابع حمض أميني للببتيد المتعدد الذي يحمل شفرته الجين المقصود.

(ب) الاريثروبويتين، الببتيد المتعدد المطلوب

يتم انتاج خلايا الدم الحمراء بشكل مستمر طوال مدة حياة الانسان وحتى تدمير الخلايا. وعملية انتاج خلايا الدم الحمراء هي الية فسيولوجية محكمة بمنتهى الدقة مما يساعد على توفر عدد كافي من خلايا الدم الحمراء في الدم لأكسدة الأنسجة

بشكل مناسب، ولكن ليس كثيرا أن تقوم الخلايا بإعاقة الدورة الدموية. ويتم تكـوين خلايا الدم الحمراء في نخاع العظام وتحت تحكم هرمون اريثروبويتين.

والاريثروبيوتين، وهو جلايكوبروتين حامضي acidic glycoprotein وزنه الجزيئي حوالي ٣٤,٠٠٠ دالتون، قد يظهر في ثلاثة صور: α، β وأسيالو asialo . وتختلف الصورة α وβ بشكل طفيف في مكونات الكربوهيدرات، ولكن لهـا نفـس القوة، النشاط البيولوجي والوزن الجزيئي. والصورة الاسيالو هـي صـورة α أو β ذات كربوهيدرات نهائية (حمض سياليك sialic acid) منزوعـة. والاريثربـويتين موجود بتركيزات منخفضة للغاية في البلازما عندما يكون الجسم في حالـة صـحية حيث تتلقى الأنسجة أكسدة كافية من العدد الموجود من خلايا الدم الحمـراء. وهـذا التركيز المنخفض الطبيعي يكون كافياً لتحفيز استبدال خلايا الدم الحمراء التي تفقـد بشكل طبيعي على مدار العمر.

وتزداد كمية الاريثروبويتين في الدورة الدموية في ظروف نقص الاوكسجين عندما يقل الاوكسجين المنقول بواسطة الخلايا الحمراء في الدم. وقد ينتج نقص الأكسدة عن فقدان كميات كبيرة من الدم عن طريق النزيف، تدمير الخلايا الحمراء بالتعرض الزائد للاشعاع، نقص أخذ الأوكسجين نتيجة الارتفاعات العالية أو فقدان الوعي لفترات طويلة، أو مختلف صور الانيميا. واستجابة للأنسجة المتعرضة لنقص الاكسجين، يقوم الاريثروبويتين بزيادة انتاج خلايا الدم الحمراء بتحفيز تحويل الخلايا البدائية الأولية في نخاع العظام في الخلايا الحمراء الأولية والتي تنمو، وتقوم بتخليق الهيموجلوبين ويتم إطلاقها في الدورة الدموية على هيئة خلايا دموية حمراء ناضجة. وعندما يكون عدد الخلايا الحمراء في الدم أكبر من المتطلبات الطبيعية للأنسجة من الاوكسجين، يقل الاريثروبويتين في الدم.

أنظر بوجه عام في: Testa وزملاؤه، Exp. Hematol.، ٨ (الملحـق ٨)، ١٤٤- ١٥٢ (١٩٨٠)؛ Tong وزملاؤه؛ J. Biol. Chem.، ٢٥٦ (٢٤) ١٢٦٦٦ – ١٢٦٧٢ (١٩٨١)؛ Goldwasser، J. Cell. Physiol، ١١٠ (الملحق ١)، ١٣٣- ١٣٥ (١٩٨٢)؛ Finch، Blood، ٦٠ (٦)، ١٢٤١-١٢٤٦ (١٩٨٢)؛ Sytowski وزمـلاؤه، Exp. Hematol.، ٨ (الملحـق ٨)، ٥٢-٦٤ (١٩٨٠)؛ Naughton،

Ann. Clin. Lab. Sci.، ١٣ (٥)، ٤٣٢-٤٣٨ (١٩٨٣)؛ Weiss وزمـــلاؤه، Am. J. Vet. Res.، ٤٤ (١٠)، ١٨٣٢ – ١٨٣٥ (١٩٨٣)؛ Lappin وزمـــلاؤه Exp.Hematol.، (٧)، ٦٦١-٦٦٦ (١٩٨٣)؛ Baciu وزملاؤه، Ann.NY.Acad. Sci.، ٤١٤، ٦٦-٧٢ (١٩٨٣)؛ Murphy وزمـــــــلاؤه، Acta.Hematologica Japonica.، ٤٦ (٧)، ١٣٨٠- ١٣٩٦ (١٩٨٣)؛ Dessypris وزمـــــــــلاؤه، Brit.J.Hemotol.، ٥٦، ٢٩٥-٣٠٦ (١٩٨٤)؛ وEmmanouel وزمـــــــلاؤه، Am.J.Physiol، ٢٤٧ (١ pt ٢)، ١٦٨ - ٧٦ (١٩٨٤).

ونتيجة لأن الإريثروبويتين اساس في عملية تكوين الخلايا الدموية الحمـــراء، فإن للهرمون تطبيق مفيد في كلا من تشخيص وعلاج اضطرابات الدم التـــي تتميـــز بانتاج مـــنخفض او معيـــب لخلايـــا الـــدم الحمـــراء انظـــر مـــثلا، بوجـــه عـــام؛ Pennathar-Das وزملاؤه في Blood، ٦٣ (٥)، ١١٦٨- ٧١ (١٩٨٤) وHoddy في Am. Jour. Ped. Hematol / Oncol، ٤، ١٩١ – ١٩٦ (١٩٨٢)، المتعلقة بالاريثرويويتين في العلاجات المحتملة لمـــرض الخلايـــا المنجليـــة، وEschbach وزملاؤه في J. Clin. Invest.، ٧٤ (٢)، صـــفحات ٤٣٤-٤٤١، (١٩٨٤)، التـــي تصف نظام علاجي للماشية المصابة بداء الكلى اعتمادا على استجابة الجســـم لحقـــن بلازما غنية بالاريثروبويتين مقترحة جرعة ١٠ وحدة من EPO / كجم في اليوم لمدة ١٥-٤٠ يوم لتصحيح الانيميا من النوع المصاحب للفشل الكلـــوي المـــزمن. انظـــر أيضا، Krane في Henry Ford Hosp. Med. J. ٣١ (٣)، ١٧٧-١٨١ (١٩٨٣).

ولقد تم حديثا تقدير أن وجود الإريثروبويتين بكمية تسمح بعلاج كل سنة من الأنيميا لعدد ١,٦٠٠,٠٠٠ شخص في الولايـــات المتحـــدة وحـــدها. انظـــر مـــثلا؛ Morrison في "Bioprocessing in Space –an Overview" صفحات ٥٥٧-٥٧١ في The World Biotech Report ١٩٨٤، العـــدد ٢؛ USA، (Online Publications، نيويورك، ١٩٨٤). وبينت الدراسات الحديثة قاعدة لامتداد فعاليـــة علاج الإريثروبويتين في عـــدة أمـــراض؛ واضـــطرابات دمويـــة hematologic irregulrity ; Vedovato وزمـــــــــلاؤه، ActaHaematol، ٧١، ٢١١-٢١٣ (١٩٨٤) (بيتا -ثلاسيميا beta-thalassemia)؛ Vichinsky وزملاؤه، J. Pediatr

١٠٥ (١)، ١٥-٢١ (١٩٨٤) (التليف المتحوصل)؛ Cotes وزملاؤه، Brit. J. Obstet. Gynea-col، ٩٠ (٤)، ٣٠٤ - ٣١١ (١٩٨٣) (الحمل، اضطرابات الطمث)؛ Haga وزملاؤه؛ Acta. Pediatr. Scand.، ٧٢، ٨٢٧ - ٨٣١ (١٩٨٣) (الانيميا المبكرة للمبتسرين prematurity)؛ Claus-Walker وزملاؤه، Arch. Phys. Med. Rehabil، ٦٥، ٣٧٠-٣٧٤ (١٩٨٤) (إصابات الحبل الشوكي)؛ Dunn وزملاؤه، Eur. J. Appl. Physiol.، ٥٢، ١٧٨-١٨٢ (١٩٨٤) (الطيران في الفضاء)؛ Miller وزملاؤه؛ Brit. J. Haematol، ٥٢، ٥٤٥ - ٥٩٠ (١٩٨٢) (فقدان الدم الحاد)؛ Udupe وزملاؤه، J. Lab. Clin. Med. ١٠٣ (٤)، ٥٧٤-٥٨٠ و ٥٨١ - ٥٨٨ (١٩٨٤)؛ وlipschitz وزملاؤه، Blood ٦٣ (٣)، ٥٠٢-٥٠٩ (١٩٨٣) (الشيخوخة)؛ وDainiak وزملاؤه، Cancer، ٥١ (٦)، ١١٠١-١١٠٦ (١٩٨٣) و Shwartz وزملاؤه، Otolaryngol، ١٠٩، ٢٦٩ - ٢٧٢ (١٩٨٣) (مختلف الأورام neoplastic المصحوبة بتخليق غير طبيعي للخلايا الدموية الحمراء abnormal erythropoiesis).

والمحاولات السابقة للحصول على ناتج جيد للإرثيروبويتين من البلازما أو البول أثبتت أنه غير ناجحة نسبياً. ومن الضروري استخدام طرق معملية معقدة وذات مشاكل وعادة ما ينتج عنها تجميع كميات صغيرة جدا من مستخلصات غير نقية غير ثابتة المحتوى على الاريثروبويتين.

وتصف البراءة الأمريكية رقم ٣٠٣٣٧٥٣ طريقة التنقية الجزئية للإرثيروبويتين من بلازما دم الماشية التي تعطي مستويات منخفضة من مستخلص صلب يحتوي على الاريثروبويتين.

ونتج عن المحاولات المبدئية لفصل الاريثروبويتين من البول، مستحضرات غير ثابتة غير نشيطة بيولوجياً من الهرمون. وتصف البراءة الأمريكية رقم ٣٨٦٥٨٠١ طريقة لتثبيت النشاط البيولوجي لمادة خام محتوية على الاريثروبويتين الناتج من البول. والمستحضر الخام الناتج المحتوي على الاريثروبويتين له ٩٠ في المائة من نشاط الاريثروبويتين، ويكون ثابتاً.

ويتم وصف طريقة أخري لتنقية إرثيروبويتين بشري من بول مرضى الأنيميا الغير تخليقية في Miyake وزملاؤه، J. Bid. Chem.، العدد ٢٥٢، رقم ١٥ (١٠ أغسطس ١٩٧٧)، صفحات ٥٥٥٨ – ٥٥٦٤. وتشتمل هذه الطريقة ذات الخطوات السبعة، على كروماتوجرافيا تبادل أيوني ion exchange chromatography، ترسيب إيثانول ethanol precipitation، ترشيح جل gel filteration، وكروماتوجرافيا الإمتزاز adsorption chromatography، وينتج عنها مستحضر إريثروبويتين نقي ذو فعالية ٧٠,٤٠٠ وحدة / مجم من البروتين في ناتج ٢١في المائة.

وتصف البراءة الأمريكية رقم ٨٤٠، ٣٩٧، ٤ باسم Takezawa وزملاؤه، طرق لتحضير "ناتج إريثروبويتين" من عينات بول أشخاص اصحاب بواسطة مستبدلات ايون قاعدية ضعيفة وتقترح أن النواتج ذات الوزن الجزيئي المنخفض "ليست لها آثار مثبطة" ضد الاريثروبويتين.

ويصف طلب البراءة البريطانية رقم ٨٨٧، ٠٨٥، ٢ باسم Sagimoto وزملاؤه، المنشورة في ٦ مايو ١٩٨٢، طريقة لإنتاج خلايا ليمفاوية أولية شبيهة بشرية مهجنة hybrid human lymphoblastoid cells، ذات مستويات إنتاج تتراوح بين ٣ الى ٤٢٠ وحدة من الاريثروبويتين لكل مل من معلق الخلايا (موزعة في مزارع بعد تكاثر خلايا العائل الثديية) يحتوي حتى 10^7 خلية لكل مل. وعند مستويات الإنتاج العالية التي يشار الى الحصول عليها، يمكن حساب معدل إنتاج الاريثروبويتين من ٤٠ الى حوالي ٤,٠٠٠ وحدة / 10^6 خلية / ٤٨ ساعة في مزرعة معملية بعد نقل الخلايا في أنظمة تكاثر داخل الجسم (انظر كذلك البراءة الأمريكية المكافئة رقم ٤٣٧٧٥١٣). وتم تقديم الكثير من الاقتراحات لفصل الاريثروبويتين من مصادر نسيجية، وتشمل خلايا سرطانية neoplastic cells، ولكن النواتج كانت منخفضة بشكل واضح. انظر مثلاً؛ Jelkman وزملاؤه Exp. Hematol، ١١ (٧)، ٥٨١ – ٥٨٨ (١٩٨٣)؛ Tambourin وزملاؤه (U. S. A). P. N. A. S، ٨٠، ٦٢٦٩ – ٦٢٧٣ (١٩٨٣)؛ Kastsuoka وزملاؤه .Gann، ٧٤، ٥٣٤ – ٥٤١

(١٩٨٣)؛ Hagiwara وزمـــــلاءه، Blood ٦٣ (٤)، ٨٢٨ – ٨٣٥ (١٩٨٤)؛ و Chappinوزملاؤه، Blood، ٦٤ (٢)، ٣٤١ – ٣٤٧ (١٩٨٤).

وطرق الفصل الأخرى المستخدمة للحصول على إريثروبويتين نقـي تشـمل طرق مناعية. يتم تطوير جسم مضاد متعدد الاستنساخ polyclonal مشتق من مصل الدم موجه ضد الاريثروبويتين عن طريق حقن حيوان ويفضـل جـرذ أو أرنـب، باريثروبويتين بشري. ويتم التعرف على الاريثروبويتين البشري المحتوى على أنـه مادة أنتيجينية antigenic substance غريبة بواسطة الجهاز المناعي للحيوان ويحفز تكوين أجسام مضادة ضد هذا الأنتيجين. وتستجيب الخلايا المختلفة لتحفيـز المـادة الأنتيجينية بإنتاج وإطلاق أجسام مضادة في الدم مختلفة بشكل طفيف عن تلك التـي تنتجها الخلايا المستجيبة. وتظل فعالية الجسم المضاد في مصل دم الحيوان عندما يتم استخلاص الدم منه. وبينما يمكن بعد تنقية المصل أو المستحضرات الأجسام المضادة الغير نقية على هيئة جزء الجلوبيولين المناعي IgG(G) لمصل الدم، اسـتخدام فـي تجارب للاكتشاف والتركيب مع الاريثروبويتين البشري، فإن المواد تعاني من عيوب كبيرة. ويتكون الجسم المضاد هذا من كل الأجسام المضادة المختلفـة الناتجـة عـن الخلايا المنفردة، وهو متعدد الاستنساخ يقوم بالاتحاد مع مكونات في المستخلصـات الخام خلاف الاريثروبويتين وحدة.

ومن المفيد لخلفية هذا الاختراع التطورات الحديثة في مجال تطوير مـزارع مستمرة من الخلايا القادرة على إنتاج فصلية واحدة من الأجسام المضادة التي تتفاعل مناعياً بشكل محدد مع محدد أنتيجيني واحد من الأنتيجين المختارة يمكـن الرجـوع بوجه عام الى Chisholm، High Technology، المجلد ٣، العـدد ١، ٥٧ – ٦٣ (١٩٨٣)، وتم عمل محاولات لاستخدام طرق الاتحاد والتهجين الخلوي لتطوير أجسام مضادة "أحادية الاستنساخ" ضد الاريثروبويتين واستخدام هذه الأجسام المضادة فـي فصل والاكتشاف الكمي للإرثيروبويتين البشري. وكأحد الأمثلة، تمت الإشارة الـى تطوير ناجح لخطوط تهجين خلوي فأر – فأر تفرز أجسام مضادة أحادية الاستنسـاخ ضد الاريثروبويتين البشري المذكور فـي الملخـص باسـم Lee – Huang، رقـم الملخص ١٤٦٣ من Fed. Proc.، ٤١، ٥٢٠ (١٩٨٢). وكمثال أخـر، يـتم ذكـر

وصف مفصل لتحضير واستخدام أجسام مضادة للإرثيروبويتين أحادية الاستنساخ، في Weiss وزملاؤه، P. N. A. S. (VSA)، ٧٩، ٥٤٦٥ – ٥٤٦٩ (١٩٨٢). يمكن أيضاً الرجوع الى Sasaki، Biomed. Biochim. Acta.، ٤٢ (١١ / ١٢) S ٢٠٢ – S ٢٠٦ (١٩٨٣)؛ Yanagawa وزملاؤه، Blood، ٦٤ (٢)، ٣٥٧ – ٣٦٤ (١٩٨٤)، Yanagawa وزملاؤه، J. Biol. Chem، ٢٥٩ (٥)، ٢٧٠٧ – ٢٧١٠ (١٩٨٤)، والبراءة الأمريكية رقم ٤٤٦٥٦٢٤.

ومن المفيد كذلك لخلفية هذا الاختراع هي تقارير عن النشاط المناعي للببتيدات التخليقية والتي تقوم أساساً بنسخ تتابع الحمض الأميني الموجود في البروتينات، الجلايكوبروتينات والنيوكليوبروتينات الطبيعية. وبتحديد أكثر، تم توضيح أن الببتيدات المتعددة المنخفضة الوزن الجزيئي نسبياً تشارك في التفاعلات المناعية والتي تتماثل في المدة والمدى مع التفاعلات المناعية للبروتينات الهامة فسيولوجياً مثل الأنتيجينات الفيروسية، الهرمونات عديدة الببتيد، وما شابه ذلك. ومتضمن ضمن التفاعلات المناعية لهذه الببتيدات المتعددة، هو حث تكوين أجسام مضادة محددة في حيوانات نشيطة مناعياً يمكن مثلاً الرجوع الى: Lerner وزملاؤه، Cell، ٢٣، ٣٠٩ – ٣١٠ (١٩٨١)؛ Ross وزملائه Nature، ٢٩٤، ٦٥٤ – ٦٥٦ (١٩٨١)؛ Walter وزملاؤه؛ P. N. A. S. (U.S.A)، ٧٧، ٥١٩٧ – ٥٢٠٠ (١٩٨٠)؛ Lerner وزملاؤه، P. N. A. S. (U.S.A)، ٧٨، ٣٤٠٣ – ٣٤٠٧ (١٩٨١)، Walter وزملاؤه، P. N. A. S. (U.S.A)، ٧٨، ٤٨٨٢ – ٤٨٨٦ (١٩٨١)؛ Warg وزملاؤه P. N. A. S (U.S.A)، ٧٨، ٧٤١٢ – ٧٤١٦ (١٩٨١)، Green وزملاؤه، Cell، ٢٨، ٤٧٧ – ٤٨٧ (١٩٨٢)؛ Nigg وزملاؤه، (USA) P. N. A. S، ٧٩، ٥٣٢٢ – ٥٣٢٦ (١٩٨٢)؛ Baron وزملاؤه، Cell، ٢٨، ٣٩٥ – ٤٠٤ (١٩٨٢)؛ Dreesman وزملاؤه، Nature، ٢٩٥، ١٥٨ – ١٦٠ (١٩٨٢)، و Scientific American Lerner، ٢٤٨، رقم ٢، ٦٦ – ٧٤ (١٩٨٣)، أنظر كذلك، Kaiser وزملاؤه، Science، ٢٢٣، صفحات ٢٤٩ – ٢٥٥ (١٩٨٤)، المتعلقة بالنشاطات البيولوجية والمناعية للببتيدات التخليقية والتي تشترك تقريباً في التركيبات الثانوية للهرمونات الببتيدية ولكنها لا تشاركها في التكوين التركيبي الأولي

لها. وبالطبع ترتبط الدراسات السابقة بتتابعات الحمض الأميني لبروتينات خلاف الاريثروبويتين، وهي مادة لم يتم نشر أي تتابع حمض أميني ثابت لها. وفي طلب البراءة الأمريكية المصاحبة المعلقة برقم مسلسل ٧٢٤، ٤٦٣، المودع في ٤ فبراير ١٩٨٣، باسم J. Egrie، والمنشورة في ٢٢ أغسطس ١٩٨٤ باسم طلب البراءة الأوربية رقم ٤٤٦ ١١٦ صفر، يتم وصف خط تهجين خلوي فأر – فأر (A. T. C.C. رقم HB 8209) والذي يقوم بإنتاج أجسام مضادة للإرثيروبويتين أحادية الاستنساخ شديد الخصوصية والتي تكون فعالة مناعياً أيضاً بشكل خاص مع ببتيد متعدد يشتمل على تتابع الحمض الأميني التالى:

NH_2-Ala-Pro-Pro-Arg-Leu-Ile-Cys-Asp-Ser-Arg-Val-Leu-Glu-Arg-Tyr-Leu-Leu-Glu-Ala-Lys-COOH.

وتتابع الببتيد المتعدد هو المحدد لأول عشرين حمض أميني في الاريثروبويتين البشري المفصول طبقاً لطريقة Miyake وزملاؤه، J. Bid. Chem، ٢٥٢، ٥٥٥٨ – ٥٥٦٤ (١٩٧٧) والتي تبعاً لها تم إجراء تحليل حمض أميني بواسطة جهاز التتابع ذو الطور الغازي gas phase sequencer (Applied Biasystems, Inc.) طبقاً لطريقة Hewick, M وزملاؤه، J. Bid. Chem، ٥٢٦، ٧٩٩٠ – ٧٩٩٧ (١٩٨١). أنظر أيضا: Sue وزملاؤه، في Proc. Nat. Acod. Sci. (USA)، ٨٠، صفحات ٣٦٥١ – ٣٦٥٥ (١٩٨٣) المتعلقة بتطوير أجسام مضادة متعددة الاستنساخ ضد ٢٦ – مير تخليقي معتمد على تتابع حمض أميني مختلف، و Sytowski وزملاؤه، J. Immunol. Methods.، ٦٩، صفحات ١٨١ – ١٨٦ (١٩٨٤).

وبينما توفر الأجسام المضادة متعددة وأحادية الاستنساخ كما سبق الوصف، مواد مفيدة للغاية للاستخدام في التجارب المناعية لاكتشاف وتحديد كمية الاريثروبويتين ويمكن أن تكون مفيدة في تنقية قابلية الانجذاب للإرثيروبويتين، يبدو أنه غير محتمل أن توفر هذه المواد بسهولة فصلاً واسع المدى لكميات من الاريثروبويتين من المصادر الثديية، تكون كافية لتحاليل أخرى، تجارب إكلينيكية واستخدام علاجي محتمل واسع المدى للمادة في علاج مثلاً: أمراض الكلية المزمنة التي فيها يفشل النسيج المريض في الحفاظ على إنتاج الاريثروبويتين. وبالتالى يتضح

في المجال أن أفضل الآمال لتمييز الاريثروبويتين الثديي بشكل كامل وتوفير كميات كبيرة للاستخدام التشخيصي والإكلينيكي المحتمل تشمل التطبيق الناجح لطرق الاستنساخ للحصول على تخليق ميكروبي واسع النطاق من المركب.

وبينما يبدو أن الجهود الأساسية قد بذلت في محاولة فصل تتابعات DNA التي تحمل شفرة الاريثروبويتين البشري ومن مصادر أخرى ثديية، لا يبدو أن أيا منها يفيد بشكل ناجح. وهذا يرجع. أساساً الى بذرة المصادر النسيجية، وبخاصة مصادر النسيج البشري، الغنية بحمض mRNA بحيث تسمح بتركيب مكتبة cDNA يمكن منها فصل تتابع DNA يحمل شفرة الاريثروبويتين بالطرق التقليدية. وعلاوة على ذلك، لم يعرف إلا القليل جداً عن التتابع المستمر لشقوق الحمض الأميني للإريثروبويتين مما يجعل من غير الممكن مثلاً تكوين مجسات طويلة متعددة النيوكليوتيد يمكن وبسهولة استخدامها بكفاءة في مسح التهجين DNA / DNA لحمض cDNA بخاصة مكتبات DNA الجينومية. وعلى سبيل التوضيح تتابع الحمض الأميني المستخدم للحصول على الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ monoclonal antibody سابقة الذكر الناتجة بواسطة A. T. C.C. رقم HB8209 لا تسمح بتكوين مجس أوليجونيوكليوتيد من ٦٠ قاعدة غير غامض بالطريقة التي يصفها Anderson وزملاؤه، المذكورة آنفا. ويقدر أن الجين البشري للإريثروبويتين قد يظهر على هيئة "جين فردي النسخة" داخل الجينوم البشري وفي أي حالة، محتمل أن تمثل المادة الجينية التي تحمل شفرة الاريثروبويتين البشري أقل من ٠,٠٠٠٠٥ في المائة من DNA الجينومي البشري الكلي والذي يوجد في مكتبة جينومية.

وحتى الآن، أكثر المحاولات المعروفة نجاحاً في الطرق المتعلقة بالاستنساخ للحصول على تتابعات DNA مناسبة للاستخدام في الإنتاج الميكروبي لكميات يمكن فصلها من الاريثروبويتين البشري، كانت أقل بكثير من المستهدف. وكمثال يشير Farber وزملاؤه، في Exp. Hematol، ١١، الملحق ١٤، الملخص ١٠١ (١٩٨٣) الى استخلاص mRNA من نسيج الكلية لقرود البابون المعالجة بواسطة فنيل هيدرازين phenylhydrazine-treated وحقن mRNA في بويضات Xenopus

Laevis، ذات نتيجة انتقالية للإنتاج المعملي لخليط من "نواتج الترجمة" والتي تتضمن توضيح خصائص الاريثروبويتين البيولوجية. وحديثاً جداً، أشار Farber وزملاؤه، في Blood، ٦٢، رقم ٥، الملحق رقم ١، الملخص ٣٩٢ في صفحة ١٢٢ أ (١٩٨٣) الى الترجمة المعملية لحمض mRNA للكلية البشرية بواسطة بويضات الضفادع. وتم تقدير أن خليط ناتج الترجمة يشتمل على ٢٢٠ مللي وحدة من ناتج الترجمة له نشاط إريثروبويتين لكل ميكروجرام من mRNA تم حقنه. وبينما كانت مستويات الترجمة المعملية لحمض mRNA الخارجي الذي يحمل شفرة الاريثروبويتين منخفضة بشكل واضح (مقارنة حتى بالمستويات المسجلة سابقاً لترجمة mRNA في قرود البابون في الناتج المطلوب)، تمت الإشارة الى أن النتائج تؤكد أن الكلية البشرية هي مكان لإنتاج الاريثروبويتين، مما يسمح بتكوين مكتبة cDNA غنية من كلية بشرية يمكن منها فصل الجين المطلوب. [أنظر كذلك في Farber، Clin Res، ٣١ (٤)، ٧٦٩ A (١٩٨٣)].

ومنذ إيداع طلب البرائتين الأمريكيتين برقمين مسلسلين ٥٦١٠٢٤ و ٥٨٢١٨٥ ، ظهر تقرير واحد لاستنساخ وإنتاج ما يعرف بأنه cDNA إريثروبويتين بشري في E. coli. وباختصار تم إدخال عدد من نسخ cDNA في بلازميدات E. coli وقد لوحظ أن نواتج اتحاد ß-lactamase فعالة مناعياً مع جسم مضاد أحادي الاستنساخ ضد "epitope" للإريثروبويتين البشري. أنظر، Lee – Huang في (USA): Proc. Nat. Acad. Sci.، ٨١، صفحات ٢٧٠٨ – ٢٧١٢ (١٩٨٤).

<u>الوصف العام للاختراع</u>

يعمل هذا الاختراع على إعداد ما يلي:-

١- تتابع DNA للاستعمال في تأمين التعبير في خلية مضيفه من الكائن بدائي النواة أو حقيقي النواة من ناتج عديد الببتيد الذي به جزء على الأقل من التطابق التركيبي الأولي لما هو عليه في الاريثروبويتين لكي يسمح أن يكون له أو يمتلك خاصية بيولوجية لجعل خلايا مخ العظم تزيد من إنتاج الخلايا الشبكية وخلايا الدم الحمراء

وزيادة تخليق الهيموجلوبين أو أمتصاص الحديد، وتتابع DNA المذكور المختار من المجموعة المتكونة من:

(أ) تتابعات DNA المذكورة في الجداول ٥، ٦ وملحقاتها المكمله.

(ب) تتابعات DNA التي تهجن تحت ظروف صارمه إلى مناطق تشفير البروتين لتتابعات DNA المحدده في (أ) أو أجزاء منها؛

(ج) تتابعات DNA التي ، ولكن لانحراف أو تفسخ الكود الجيني degenercy of the genetic code ، تهجن إلى تتابعات DNA المحددة في (أ)، (ب).

٢- تتابع DNA طبقا للعنصر ١ المشفر للاريثروبويتين البشري.

٣- تتابع DNA طبقا للعنصر ١ يكون عبارة عن تتابع DNA مشفر للاريثروبويتين من أنواع القرود.

٤- تتابع DNA طبقا للعنصر ٣ ويشمل على منطقة تشفير للبروتين المذكورة في جدول ٥.

٥- تتابع DNA جينوميه طبقا للعنصر ١ أو ٢.

٦- تتابع DNA مشفر للاريثروبويتين لأنواع بشرية طبقا للعنصر ٥.

٧- تتابع DNA طبقا للعنصر ٦ ويشمل على منطقة لتشفير البروتين تذكر في الجدول ٦.

٨- تتابع DNA طبقا للعنصر ١ أو ٢ مترابط تساهميا مع مادة محددة label substance يمكن الكشف عنها.

٩- تتابع DNA طبقا للعنصر ٨، وفيها تكون مادة محددة التي يمكن كشفها هي مادة محددة مشعه radiolable.

١٠- تتابع DNA وحيد الشريط طبقا للعنصر ٨ أو ٩.

١١- تتابع DNA طبقا للعنصر ١، مشفرة لـ [Phe^{15}]hEPO، [Phe^{49}]hEPO، [Phe^{145}]hEPO، [His^{7}]hEPO، [Asn^{2}des-Pro^{2} through Ile^{6}]hEPO، [des-Thr^{16}] through Arg^{166}]hEPO، أو .[Δ27-55]hEPO.

١٢- خلية مضيفه لكائن بدائي النواة procaryotic او حقيقي النواة eucaryotic منقوله أو مصابه مع تتابع DNA طبقا لأي من العناصر ١، ٢، ٣، ٦، ٧ و ٨ بطريقة تجعل الخلية المضيفه تعبر عن ناتج عديد الببتيد المذكور.

١٣- خلية مضيفه منقولة أو مصابه طبقا للعنصر ١٢ تكون تلك الخلية قادرة على التحويل الجليكوسيلي glycosylating لعديد الببتيد.

١٤- خلية مضيفه ثدييه منقوله أو مصابه طبقا للعنصر ١٣.

١٥- خلية COS ثدييه منقوله أو مصابه طبقا للعنصر ١٣.

١٦- خلية CHCO ثدييه منقوله أو مصابه طبقا للعنصر ١٣.

١٧- ناقل DNA بلازميد أو فيروسي دائري ذو وظيفه بيولوجية مشتمل على تتابع DNA طبقا لأي من العناصر ١، ٢، ٣، ٥، ٦، ٧ أو ١١.

١٨- خلية مضيفه كائن بدائي النواة او حقيقي النواة تنقل أو تصاب بطريقة ثابتة مع ناقل DNA طبقا للعنصر ١٧.

١٩- عديد ببتيد معاد اتحاده الجيني recombinant polypeptide به جزء أو كل التطابق التركيبي الأولي للاريثروبويتين البشري أو القردي المذكور في الجدول ٦ أو الجدول ٥ أو اي تغير أو مشتق منه لـــه الخاصية البيولوجية التي تجعل خلايا مخ العظم تزيد من إنتاج الخلايا الشبكية reticulocytes وخلايا الدم الحمراء لزيادة تخليق الهيموجلوبين أو امتصاص الحديد وتتميز بأنها ناتج لتعبير الكائن حقيقي النواة لتتابعات DNA الخارجية ويكون لها وزن جزيئي أكبر بواسطة SDS-PAGE من الاريثروبويتين المعزول من مصادر بوليه.

٢٠- عديد ببتيد الجليكوبروتين طبقا للعنصر ١٩ الذي به تركيب كربوهيدرات متوسط يختلف عن ذلك الخاص بالاريثروبويتين البشري المعزول من مصادر بوليه.

٢١- عديد ببتيد طبقا للعنصر ١٩ أو ٢٠ وفيه يكون التتابع الخارجي exogenous sequence هو تتابع cDNA.

٢٢- عديد ببتيد طبقا للعنصر ١٩ أو ٢٠ وفيه يكون التتابع الخارجي هو تتابع DNA جينومي genomic DNA sequece .

٢٣- عديد ببتيد طبقا للعنصر ١٩ أو ٢٠ وفيه يتم التتابع الخارجي على بلازميد DNA دائري منسوخ بطريقة مستقله أو ناقل فيروسي.

٢٤- عديد ببتيد طبقا لأي من العناصر ١٩ إلى ٢٣ ويتميز بأنه مترابط تساهميا مع مادة محددة يمكن الكشف عنها.

٢٥- عديد ببتيد طبقا للعنصر ٢٤، وفيها تكون المادة المحددة التي يمكن الكشف عنها محددة إشعاعية.

٢٦- ناتج عديد ببتيد من التعبير في خلية مضيفة كائن حقيقي النواة لتتابع DNA طبقا لأي من العناصر ١، ٢، ٣، ٥، ٦، ٧.

٢٧- طريقة لانتاج عديد ببتيد به جزء على الأقل من تطابق تركيبي أولي للاريثروبويتين للسماح بامتلاك خاصية بيولوجية تجعل خلايا مخ العظام تزيد من انتاج الخلايا الشبكية وخلايا الدم الحمراء وزيادة تخليق الهيموجلوبين او امتصاص الجديد، وتتميز هذه الطريقة بزرع (تحت ظروف تغذية مناسبة) لخلية كائن بدائي النواة او كائن حقيقي النواة منقولة أو مصابة بتتابع DNA طبقا للعناصر ١، ٢، ٣، ٥، ٦، ٧. بطريقة تسمح للخلية المضيفة ان تعبر عديد الببتيد المذكور، مع عزل اختياري لناتج عديد الببتيد المطلوب للتعبير عن تتابع DNA.

٢٨- طريقة طبقا للعنصر ٢٧، وتتميز بزراعة خلية مضيفة طبقا لأي من العناصر ١٢- ١٦

٢٩- طريقة طبقا للعنصر ٢٧ او ٢٨ لانتاج عديد ببتيد طبقا لأي من العناصر ١٩- ٢٣، ٢٦.

٣٠- تركيب صيدلي متضمن عديد ببتيد طبقا للطريقة المذكورة في العنصر ٢٧، ٢٨ او ٢٩ مع مخفف أو إضافة او حامل مقبول صيدليا.

٣١- تركيب صيدلي طبقا للعنصر ٣٠، متضمن على عديد الببتيد المذكور في أي من العناصر ١٩- ٢٣، ٢٦.

وخلايا الفقاريات (مثلا: COS-1 و CHO) التي يوفرها هذا الاختراع تشمل الخلايا الأولى المتوفرة والتي يمكن تنميتها معمليا بشكل مستمر والتي عند نموها في المزرعة تكون قادرة على إنتاج، في وسط الزراعة، كمية تزيد عن ١٠٠ وحدة

(ويفضل ٥,٠٠٠ وحدة) من الاريثروبويتين لكل 10^6 خلية في ٤٨ ساعة كما يحدده التحليل المناعي الاشعاعي radioimmunoassay .

ويوفر الاختراع كذلك ببتيدات متعددة تخليقية مستنسخة كليا أو جزئيا من تتابعات مستمرة من شقوق الحمض الأميني للاريثروبويتين والتي يشار اليها لأول مرة في هذا الوصف. وهذه التتابعات، بفضل اشتراكها في خصائص تكوينية وتركيبية أولية، ثانوية أو ثلاثية مع الاريثروبويتين الطبيعي، فإنها قد يكون لها نشاط بيولوجي و/ أو خصائص مناعية مشتركة مع المنتج الطبيعي بحيث يمكن استخدامها كبدائل فعالة بيولوجيا أو مناعيا للاريثروبويتين لعمليات علاجية ومناعية. ويتم بشكل مماثل توفير أجسام مضادة أحادية و متعددة الاستنساخ يتم الحصول عليها بطرق قياسية والتي تكون فعالة مناعيا ضد الببتيدات المتعددة ويفضل كذلك أن تكون فعالة مناعيا ضد الاريثروبويتين الطبيعي.

ولتوضيح هذا الاختراع يتم وصف تتابعات DNA مستنسخة من مصادر بشرية ومن القرود وتتابعات ببتيد متعدد مستقطعة منها بشكل مناسب والتي تمثل على الترتيب التكوين التركيبي الأولي للاريثروبويتين البشري المصدر ومن القرود.

ويوفر الاختراع أيضا نواقل جديدة فيروسية فعالة بيولوجيا ومن DNA بلازميد دائري والتي تتضمن تتابعات DNA لهذا الاختراع وكائنات حية عائلة ميكروبية (مثلا: بكتيرية، خميرة، وخلايا ثديية) متحول أو مثبتة مع هذه النواقل vectors. ويوفر الاختراع بشكل مناظر طرق جديدة لإنتاج ببتيدات متعددة مفيدة تشتمل على مزرعة من هذه الأنواع من العائل الميكروبي المتحولة أو المثبت، في ظروف تسهل الإنتاج واسع النطاق لتتابعات DNA خارجية ناتجة من الناقل، وفصل الببتيدات المتعددة المطلوبة من وسط المزرعة، مكونات خلوية قابلة للتحلل أو أجزاء من الغشاء الخلوي.

وقد يتم فصل وتنقية الببتيدات المتعددة الناتجة في عائل ميكروبي، لهذا الاختراع، بطرق تقليدية مثل: الفصل الكروماتوجرافي التحضيري preparative chromatographic separation، والفصل المناعي المتضمن فصل أجسام مضادة أحادية monoclonal و/ أو متعددة الاستنساخ polyclonal.

وبما أنه يتم في هذا الاختراع توضيح تتابع شقوق حمض أميني للارثيروبويتين، فإن هذا الاختراع يوفر تصنيع كلي و/ أو جزئي لتتابعات DNA تحمل شفرة الاريثروبويتين وتشمل هذه المميزات مثل إدخال الكودونات "المفضلة" للإنتاج بواسطة عائل غير ثديي يتم اختياره، توضيح مواقع الانشطار بواسطة إنزيمات اندونيوكلييز endonuclease enzymes قاصرة وتوضيح تتابعات DNA إضافية مبدئية، طرفية أو متوسطة والذي يسهل تكوين نواقل يتم إنتاجها بسهولة. وبشكل مماثل يوفر الاختراع تصنيع (وتطوير بواسطة طفرة جينية محددة الموقع لكل من cDNA و DNA الجينومي) لتتابعات DNA التي تحمل شفرة الإنتاج الميكروبي لمماثلات الببتيد المتعدد أو المشتقات من الاريثروبويتين والتي تختلف عن الأشكال الطبيعية في تعريف او موقع واحد أو أكثر من شقوق الحمض الأميني (أي: مماثلات محذوفة تحتوي على أقل من كل الشقوق الخاصة بهرمون EPO و/ أو مماثلات الاستبدال حيث يستبدل واحد أو أكثر من الشقوق المحددة بشقوق أخري و/ أو مماثلات إضافية فيها يضاف شق حمض أميني واحد أو أكثر الى الجزء الطرفي أو الأوسط من الببتيد المتعدد)؛ والتي تشترك في بعض من أو كل خصائص الصور الطبيعية.

وتتابعات DNA الجديدة الخاصة بالاختراع تتضمن كل التتابعات المفيدة في تامين الإنتاج في خلايا عائل حقيقة النواة أو أولية النواة لنواتج الببتيد المتعدد ذات جزء على الأقل من التكوين التركيبي الأولي وواحدة أو أكثر من الخصائص البيولوجية للاريثروبويتين والتي يمكن فهمها عن طريق:

(أ) تتابعات DNA الموضحة في أشكال ٥ و ٦ في هذا الوصف أو الشرائط المكملة لها ؛

(ب) تتابعات DNA التي تتهجن (في ظروف التهجين مثل تلك الموضحة في هذا الوصف أو في ظروف أكثر قسوة) مع تتابعات DNA الموضحة في (أ) أو إجزاء منها؛ و

(ج) تتابعات DNA التي، باستثناء انحلال الشفرة الجينية، قد تتهجن مع تتابعات DNA الموضحة في (أ) و(ب) السابقين.

ويتم بشكل خاص في الجزء (ب) توضيح تتابعات DNA جينومية تحمل شفرة صور متقاربة من الاريثروبويتين من القرود والإنسان و/ أو تحمل شفرة أنواع أخري من الاريثروبويتين الثديي. ويتم بشكل خاص في الجزء (ج) توضيح تتابعات DNA مصنعة تحمل شفرة EPO، أجزاء EPO، ومماثلات EPO والتي قد تحتوي تتابعات DNA لها على كودونات تسهل ترجمة RNA المراسل في العائل من اللافقاريات.

ويشمل الاختراع عائلة من الببتيدات المتعددة التي يحمل شفرتها أجزاء من DNA المكمل لتتابع DNA الجينومي البشري من أعلى شريط الموضح في شكل ٦ في هذا الوصف، أي: "بروتينات عكسية مكملة" كما يصف Tramontona وزملاؤه، في Nudeic Acids Research، ١٢، صفحات ٥٠٤٩-٥٠٥٩ (١٩٨٤).

ويوضح الاختراع كذلك تركيبات صيدلية تشتمل على كميات فعالة من منتجات الببتيد المتعددة للاختراع مع مواد تخفيف، مواد إضافية و/ أو مواد حاملة مناسبة والتي تسمح بتقديم علاج اريثروبويتين، وبخاصة في علاج حالات الانيميا وبالأخص حالات الانيميا مثل المصاحبة للفشل الكلوي المزمن .

وقد يتم "تمييز" نواتج الببتيد المتعدد للاختراع بعلامة عن طريق اتحاد تساهمي مع مادة مميزة يمكن اكتشافها (مثلا: تمييزها إشعاعيا بواسطة I^{125}) لإعطاء كواشف مفيدة في الكشف عن وتحديد كمية الاريثروبويتين في عينة النسيج الصلبة أو السائلة مثل الدم أو البول. ويمكن كذلك تمييز نواتج DNA للاختراع بعلامات يمكن الكشف عنها (مثل علامات مشعة وعلامات غير مشعة مثل بيوتين biotin) واستخدامها في عمليات تهجين DNA لتحديد موقع جين الاريثروبويتين و/ أو موقع أي عائلة جينية متعلقة به في الخريطة الكروموسومية في الانسان، القرود وطوائف الثدييات الأخرى. ويمكن أيضا استخدامها للتعرف على اضطرابات جين الاريثروبويتين على مستوى DNA واستخدامها كعلامات جينية للتعرف على الجينات المحاورة واضطراباتها.

وكما سيتم الوصف بالتفصيل فيما يلي، يقوم هذا الاختراع كذلك بتوفير تحسينات واضحة في طرق اكتشاف عديد نيوكليوتيد محدد فردي الشرائط ذات تتابع

غير معروف في عينة خلوية أو فيروسية غير متجانسة تتضمن عديد نيوكليوتيدات فردية الشرائط متعدد حيث:

(أ) يتم تحضير خليط من مجسات probes عديد نيوكليوتيد فردية الشرائط مميزة لعلامة، حيث به تتابعات من قواعد تتنوع بشكل موحد، وكل من هذه المجسات مكمل محتمل وبشكل خاص لتتابع من القواعد المعتزم أن يكون فريدا لعديد النيوكليوتيد المراد اكتشافه،

(ب) يتم تثبيت العينة على مادة تحتية substrate صلبة،

(ج) تعالج المادة التحتية التي تم تثبيت العينة عليها لتقليل أي ارتابط أخر للنيوكليوتيدات المتعددة عليها باستثناء ما يحدث عن طريق التهجين مع النيوكليوتيدات المتعددة في هذه العينة،

(د) تتصل المادة التحتية المعالجة التي تم تثبيت العينة عليها، بشكل مؤقت مع الخليط المذكور من المجسات المميزة بعلامة في ظروف تسهل تهجين فقط بين عديد النيوكليوتيدات المتكاملة كليا، و

(هـ) يتم اكتشاف عديد النيوكليوتيد المحدد بمراقبة وجود تفاعل تهجين بينة وبين المجس المتكامل كلياً معه داخل الخليط المذكور من المجسات المميزة بعلامة، كما يتم الإثبات بوجود كثافة أعلى من المادة المميزة بعلامة على المادة التحتية عند موقع عديد النيوكليوتيد المحدد مقارنة بالكثافة المحيطة للمادة المميزة بالعلامة الناتجة من ارتباط غير محدد للمجسات المميزة مع المادة التحتية.

وتكون الطرق فعالة بشكل خاص في الحالات التي تشير باستخدام ٦٤، ١٢٨، ٢٥٦، ٥١٢، ١٠٢٤ أو اكثر من مجسات عديد النيوكليوتيد الخليطة ذات طول من ١٧ إلى ٢٠ قاعدة في نواتج تهجين DNA / DNA أو RNA / RNA أو DNA / RNA.

وكما سيتم الوصف فيما يلي، سمحت الطرق المحسنة سابقة الذكر بشكل واضح بالتعرف على نسخ cDNA، تحمل شفرة إريثروبويتين من مصادر طائفة القرود في مكتبة تم تحضيرها من mRNA من خلية كلية قرود تعانى من الأنيميا، وبشكل اكثر تحديداً، تم استخدام خليط من ١٢٨ مجس ٢٠ - مير متنوعة بشكل

موحد مبنية على معلومات تتابع حمض أميني مشتقة من أجزاء تتابع من الإريثروبويتين البشري في طرق تهجين المستعمرات للتعرف على سبعة نسخ cDNA "موجبة" للإرثيروبويتين في عدد كلي من ٢٠٠,٠٠٠ مستعمرة. وبشكل أكثر وضوحا، سمح استخدام الطرق المحسنة لهذا الاختراع بالفصل السريع لثلاثة نسخ موجبة في مدي ١,٥٠٠,٠٠٠ طبقة أكولة phage plaques تمثل مكتبة جينومية بشرية. وتم إجراء هذا باستخدام الخليط السابق من ١٢٨ مجس ٢٠ – مير مع مجموعة ثانية من ١٢٨ مجس ١٧ – مير بناءاً على تحليل الحمض الأميني لتتابع مستمر مختلف من الإريثروبويتين البشري.

وتمثل الطرق الموضحة المذكورة سابقاً أول حالة معروفة لاستخدام عدة مجسات أوليجونيوكليوتيد مختلطة في عمليات تهجين DNA / DNA موجهة الى فصل النسخ الجينومية الثديية وأول حالة معروفة لاستخدام خليط من أكثر من ٣٢ مجس أوليجونيوكليوتيد في فصل نسخ cDNA.

وسيتضح لذوي الخبرة في المجال عدة جوانب ومميزات للاختراع عند مراعاة الوصف التفصيلي التالى والذي يعطي توضيحات لاستخدام الاختراع في تجسيماته المفضلة.

وصف الأشكال والرسومات

وفيما يلي شرح الأشكال من ١ الى ٤، حيث:

شكل ١: هو رسم توضيحي لتحليل مناعي إشعاعي لمقارنة فاعلية مواد EPO البشرية ومن القرود معاد الاتحاد مع معاد EPO البشرية الموجودة في الطبيعة.

شكل ٢: يوضح ناقل pDSVL – MkE.

شكل ٣: يوضح ناقل pSVgHuEPO.

شكل ٤: يوضح ناقل pDSVL - gHuEPO.

الوصف التفصيلي

طبقاً لهذا الاختراع، تم فصل وتمييز تتابعات DNA تحمل شفرة جزء من او كل تتابع عديد الببتيد للإريثروبويتين من الإنسان والقرود (والمشار اليه في هذا الوصف أحياناً بالرمز "EPO"). وعلاوة على ذلك، تم إنتاج DNA البشري ومن القرود في خلايا حقيقية النواة وأولية النواة لإعطاء كميات يمكن فصلها من عديد الببتيدات التي تظهر خصائص بيولوجية (مثلاً: مناعية) التي تخص EPO الطبيعي وكذلك نشاطات EPO البيولوجية في المعمل وداخل الجسم.

وتم فصل DNA من مصادر قرود، من مكتبة cDNA تكونت بواسطة mRNA مشتق من نسيج كلية القرود التي أصيبت كيميائياً بحالة أنيميا والتي تم تحديد مصل الدم لها مناعياً، بأنه يحتوي على مستويات عالية من EPO مقارنة بمصل دم قرد طبيعي سليم. وتم فصل نسخ cDNA المطلوبة، والمحتوية على DNA الذي يحمل شفرة EPO من خلال استخدام تهجين مستعمرة DNA / DNA باستخدام تجمع من ١٢٨ مجس أوليجونيوكليوتيد مختلط، ٢٠ – مير، ذو علامة مشعة ويتعلق بالمسح السريع لعدد ٢٠٠,٠٠٠ مستعمرة واعتمد تصميم مجسات الأوليجوكليوتيدات على تتابع حمض اميني يتوفر بواسطة التجزئة الإنزيمية والتقسيم التتابعي لعينة صغيرة من EPO البشري.

وتم فصل DNA من مصادر بشرية من مكتبة DNA جينومية بشرية. وتم فصل النسخ المحتوية على DNA الذي يحمل شفرة EPO من خلال تهجين طبقة DNA / DNA يستخدم التجميع السابق الذكر من ١٢٨ مجس ١٧ – مير مميز بعلامة مشعة، والذي يعتمد تتابعاته على معلومات تتابع حمض أميني تم الحصول عليها من قطعة EPO بشرية إنزيمية مختلفة.

وتم توضيح المستعمرات والطبقات الموجبة positive colonies and plaques عن طريق تتابع ثنائي منزوع الأكسجين dideoxy لحمض DNA مستنسخ باستخدام مجموعة فرعية من ١٦ تتابع داخل تجمع من مجسات ٢٠ – مير وتم تعريض النسخ المختارة الى تحليل تتابع نيوكليوتيدي مما ينتج عنه استخلاص تكوين تركيبي أولي لعديد ببتيدات EPO التي تحمل شفرته. وأظهرت تتابعات الببتيد

المتعدد المستخلصة درجة عالية من التجانس مع بعضها البعض ومع تتابع جزئي ينتج عن تحليل حمض أميني لقطع EPO بشري.

تم إدخال نسخة cDNA، موجب مختارة القرود، ونسخة جينومية بشرية موجبة مختارة في ناقل DNA "مكوكي shuttle" والذي تم زيادته (تعزيزه) في E. coli ويستخدم لتثبيت الخلايا الثديية في مستحضرات السائل الطافى من وسط المزرعة والذي يقدر انه يحتوى على حوالي ٣٠٠٠ مللى وحدة من EPO لكل مل من سائل المزرعة.

ويتم تقديم الأمثلة التالية توضيح الاختراع وتتوجه بشكل خاص للطرق التي تم إجراؤها قبلاً للتعرف على نسخ cDNA، في القرود التي تحمل شفرة EPO ونسخ جينومية بشرية، وبالطرق التي ينتج عنها هذا التعرف، وبتتابع وتطوير أنظمة الإنتاج وبالتوضيح المناعي لإنتاج EPO في هذه الأنظمة.

وبالتحديد أكثر، يتوجه المثال ١ الى تتابع حمض أميني من قطع EPO بشري وتكوين خليط من مجسات مميزة بعلامة مشعة مبنية على نتائج هذا التتابع. ويتوجه المثال ٢ بوجه عام الى الطرق المتعلقة بالتعرف على نسخ cDNA موجبة من القرود وبالتالى يعطي معلومات تتعلق بعلاج الحيوانات والتحليل المناعي المشع(RIA) لأمصال دم هذه الحيوانات. ويتعلق المثال ٣ بتحضير مكتبه cDNA، مسح تهجين المستعمرة وتوضيح النسخ الموجبة، تتابع DNA لنسخة cDNA موجبة والحصول على معلومات تكوين تركيبي أولي لعديد ببتيد EPO من القرود (تتابع حمض أميني) ويتوجه المثال ٤ الى طرق تتعلق بالتعرف على نسخ جينومية بشرية موجبة وبالتالى يوفر معلومات تتعلق بمصدر للمكتبة الجينومية، طرق تهجين الطبقة وتوضيح النسخ الموجبة. ويتوجه المثال ٥ بتتابع DNA من نسخة جينومية موجبة والحصول على معلومات تتابع حمض أميني لعديد ببتيد EPO بشري تشتمل على مقارنة بينة وبين معلومات تتابع EPO من القرود. ويتعلق المثال ٦ بطرق لتكوين ناقل يشتمل على DNA يحمل شفرة EPO مشتق من نسخة cDNA موجبة من القرود، واستخدام الناقل لتثبيت خلايا COS -1 ومزرعة من الخلايا المثبتة. ويتوجه المثال ٧ الى طرق لتكوين ناقل يشتمل على DNA يحمل شفرة EPO مشتق من

نسخة جينومية بشرية موجبة، واستخدام الناقل لتثبيت خلايا COS-1 ومزرعة من الخلايا المثبتة. ويتوجه المثال ٨ الى طرق تحليل مناعي تجزأ على السوائل الطافية لوسط الناتجة عن مزرعة من الخلايا المثبتة طبقاً للأمثلة ٦ و ٧. ويتوجه المثال ٩ الى نشاط بيولوجي معملي داخل الجسم الخاص بهرمون EPO منتج ميكروبياً، في الأمثلة، ٦ و ٧.

ويتوجه المثال ١٠ لتطوير أنظمة إنتاج عائل ثديي الخاص بـ cDNA EPO من طائفة القرود و DNA جينومي بشري، وتتضمن خلايا مبيض الهامستر الصيني Chinese hamster ovary (CHO) والنشاطات المناعية والبيولوجية لنواتج أنظمة الإنتاج هذه وكذلك تمييز هذه النواتج. ويتوجه المثال ١١ الى تحضير جينات مصنعة تحمل شفرة EPO ومماثلات EPO، حيث تحتوي جيناته عدد من الكودونات التفاضلية للإنتاج في E. coli وخلايا الخميرة، بإنتاج أنظمة إنتاج تعتمد عليها. ويتعلق المثال ١٢ بأشكال النشاط المناعي والبيولوجي لنواتج إنتاج الأنظمة في المثال ١١.

المثال ١

أ- تتابع الحمض الأميني لجزء EPO البشري:

تم فصل EPO البشري من البول وتعريضه لعملية هضم بإنزيم التريبسين tryptic digestion والذي يؤدي إلى تطوير وفصل ١٧ جزء منفرد بكميات تقارب ١٠٠ – ١٥٠ بيكومول.

وتم تمييز الأجزاء بشكل منفصل بأرقام وتم تحليلها من حيث تتابع الحمض الأميني باستخدام تحليل التتابع الدقيق microsequence analysis باستخدام متتبع طور غازي (الأجهزة الحيوية التطبيقية) للحصول على مجموعة معلومات التتابع الموضحة في الجدول ١ التالى حيث تم استخدام شفرات من حروف فردية ويميز الحرف "X" البقية (المتخلف) الذي لم يتم تحديده بشكل واضح.

الجدول ١

رقم الجزء	نتيجة تحليل التتابع
T4a	A-P-P-R
T4b	G-K-L-K
T9	A-L-G-A-Q-K
T13	V-L-E-R
T16	A-V-S-G-L-R
T18	L-F-R
T21	K-L-F-R
T25	Y-L-L-E-A-K
T26a	L-I-C-D-S-R
T26b	L-Y-T-G-E-A-C-R
T27	T-I-T-A-D-T-F-R
T28	E-A-I-S-P-P-D-A-A-M-A-A-P-L-R
T30	E-A-E-X-I-T-T-G-X-A-E-H-X-S-L-N-E-X-I-T-V-P
T31	V-Y-S-N-F-L-R
T33	S-L-T-T-L-L-R
T35	V-N-F-Y-A-W-K
T38	G-Q-A-L-L-V-X-S-S-Q-P-W-E-P-L-Q-L-H-V-D-K

ب- تصميم وانشاء مخاليط مجس الاوليجونيوكليوتيد:

تم مراجعة تتابعات الحمض الأميني المذكور في الجدول ١ في نطاق تحلل الشفرة الوراثية لأجل التأكد من إمكانية تطبيق طرق المجس المخلوط على طرق تهجين DNA/DNA على مكتبات cDNA و / او DNA الوراثي واظهر هذا التحليل أنه داخل الجزء رقم T35 تتواجد سلسلة من ٧ شقوق حمض اميني (Val -Asn -Phe -Tyr – Ala -Trp -Lys) التي يمكن تمييزها بشكل فريد كما تم تشفيره بواسطة واحد من ١٢٨ تتابع من تتابعات DNA الممكنة التي تلتف في

شكل ٢٠ زوج أساسي حيث تم تحضير مجموعة أولى من ١٢٨ اوليجونيوكليوتيد ٢٠- مير باستخدام طرق الفوسفو أميديت القياسية standard phosphoamidite methods (راجع على سبيل المثال ما كتبه Beaucage وزملائه في Tetrahedron Letters، ٢٢، صفحة ١٨٥٩-١٨٦٢ (١٩٨١) على دعامة صلبة طبقا للتتابع الموضح في الجدول ٢ التالى.

الجدول ٢

الشق -	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys
٣`	CAA	TTG	AAG	ATG	CGA	ACC	-TT ٥`
	T	A	A	A	T		
	G				G		
	C				C		

واظهر التحليل اكثر أنه داخل الجزء رقم T38 تتواجد سلسلة من ٦ شقوق حمض أميني (Gln -Pro-Trp-Glu -Pro -Leu) على اساسه يمكن تحضير مجموعة من ١٢٨ اوليجونيوكليوتيد مخلوط لمجسات ١٧-مير كما هو موضح في الجدول ٣، التالى.

الجدول ٣

الشق -	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	
٣`	GTT	GGA	ACC	CTT	GGA	GA	- ٥`
	C	T		C	T	A	
		G			G		
		C			C		

تم تمييز مجسات الأوليجونيوكليوتيد oligonucleotide probes عند الطرف ٥` باستخدام gamma-^{32}P-ATP-، ٧٥٠٠-٨٠٠٠ سي Ci / مل مول (ICN) باستخدام T, polynucleotide kinase (NEN).

المثال ٢

أ- طرق معالجة القرود والتحليل المناعي الاشعاعي RIA

تم معالجة قرود ماكاكا فاسيكيولاريس Macaca fascicularias إناث (٢,٥-٣ كجم، عمرهم ١,٥-٢ سنة) تحت الجلد باستخدام محلول ذو اس هيدروجيني يساوي ٧ من هيدروكلوريد الفنيل هيدرازين phenylhydrazine hydrochloride عند مستوى جرعة ١٢,٥ مجم / كجم في الأيام ١ و ٣ و ٥ وتم متابعة صورة الدم قبل كل حقنة وفي اليوم السابع او عندما يكون مستوى صورة الدم hematocrit اقل من ٢٥ في المائة من المستوى المبدئي، تم تجميع مصل الدم والكلى بعد تناول جرعات بمقدار ٢٥مجم/كجم من هيدروكلوريد الكيتامين ketamine hydrochloride وتم تجميد المواد المجمعة مباشرة في نيتروجين سائل ثم تخزينها عند -٧٠°م.

ب- التحليل المناعي الإشعاعي في حالة EPO

تم إجراء طرق التحليل المناعي الإشعاعي التي تم تطبيقها للتحديد الكمي لمقدار EPO في العينات باتباع الطرق التالية:

تم تحضين عينة إريثروبويتين قياسية او عينة غير معروفة سويا على مضاد المصل لمدة ساعتين عند ٣٧°م وبعد التحضين لمدة ساعتين تم تبريد انابيب العينات على الثلج ثم اضيف إريثروبويتين مميز باليود١٢٥ ^{125}I-labelled erythropoietin وتم تحضين الأنابيب عند صفر°م لمدة ١٥ ساعة اخرى على الأقل حيث احتوت كل أنبوبة تحليل على ٥٠٠ ميكرولتر من خليط التحضين الذي يتكون من ٥٠ ميكرولتر من الأمصال المناعية المخففة و١٠,٠٠٠ cpm من الإريثروبويتين - يود ١٢٥ و٥ ميكرولتر من التراسيلول Trasylol وصفر - ٢٥٠ ميكرولتر من إما EPO القياسي أو العينة غير المعروفة مع PBS يحتوي على ٠,١ في المائة BSA لاستكمال الحجم المتبقي وكان مضاد المصل المستخدم هو نزيف الاختبار الثاني لأرنب تم تمنيعه باستخدام ١ في المائة مستحضر نقي من الإريثروبويتين البولي البشري ثم تم ضبط تخفيف مضاد المصل النهائي على التحليل بحيث لم يتجاوز ^{125}I-EPO المرتبط بالجسم المضاد ١٠-٢٠ في المائة من الاعداد الكلية

المدخلة وبشكل عام، يناظر ذلك تخفيف مضاد للمصل نهائي يتراوح من ١ : ٥٠,٠٠٠ حتى ١ : ١٠٠,٠٠٠.

وتم ترسيب الإريثروبويتين – I^{125} المرتبط بالجسم المضاد عن طريق إضافة ١٥٠ ميكرولتر من Staph A وبعد ٤٠ دقيقة من التحضين تم فصل العينات بالطرد المركزي وتم غسل الكريات مرتين باستخدام ٠,٧٥ مل من ١٠ مل مولار Tris-HCl ذو أس هيدروجيني يساوي ٨,٢ يحتوي على ٠,١٥ مولار NaCl و٢ مل مولار EDTA و ٠,٠٥ في المائة Triton X-100 وتم إحصاء الكريات المغسولة في عداد جاما لتحديد النسبة المئوية من الإريثروبويتين- I^{125} المرتبط وتم طرح الأعداد المرتبطة بالأمصال المناعية الأولية من كل القيم النهائية لتصحيح الترسيب غير النوعي وتم تحديد محتوى الإريثروبويتين في العينات غير المعروفة عن طريق المقارنة مع المنحنى القياسي.

وتم تطبيق الطريقة السابقة على مصل القرود الذي تم الحصول عليه في الجزء أ، السابق، بالإضافة إلى مصل القرود غير المعالج وتم تحليل مستويات المصل الطبيعية بحيث يحتوي على حوالي ٣٦ ميكرو وحدة/ مل في حين احتوى مصل القرود المعالج على ١٠٠٠ إلى ١٧٠٠ ميكرو وحدة / مل.

المثال ٣

أ – إنشاء مكتبة cDNA القرود:

تم فصل RNA المراسل من على القرود الطبيعية والمصابة بفقر الدم باستخدام طريقة ثيوسيانات الجوانيدينيوم guanidinium thiocyanate procedure التي وصفها Chirgwin وزملائه في Biochemistry، ١٨، صفحة ٥٢٩٤ (١٩٧٩) وتم تنقية mRNA عديد $(A)^+$ عن طريق إمرار Oligo(dT)-ceullose مرتين على عمود فصل كروماتوجرافي كما هو في الصفحة ١٩٧-١٩٨ باستخدام Maniatis وزملائه تحت عنوان "الاستنساخ الجزيئي، دليل معملي" (مختبرات Cold Springs Harbor ، كولد سبرينقز Cold Springs ،هاربور Harbor، نيويورك، ١٩٨٢) وتم إنشاء مكتبة cDNA تبعا للتعديل المذكور في الطرق العامة التي وصفها Okayama وزملائه في Mol. and Cell. Biol.، ٢، الصفحات ١٦١-١٧٠

(١٩٨٢) وكانت الخواص الرئيسية للطرق المفضلة حاليا كما يلي: (١) تم استخدام pUC8 على انه الناقل الوحيد الذي تم قطعه بواسطة PstI ثم تذييله بواسطة Oligo dT ذو طول بمقدار ٦٠-٨٠ قاعدة و(٢) تم استخدام عملية هضم HincII لإزالة ذيل Oligo dTمن احد اطراف الناقل و (٣) تم إجراء عملية تصنيع الخيط الأول وتذييل Oligo dG باتباع الطريقة المنشورة و(٤) تم استخدام عملية هضم BamHI لإزالة تذييله Oligo dG من أحد أطراف الناقل و(٥) استبدال خيط RNA بـ DNA تم في وجود رابطين

GATCTAAAGACCGTCCCCCCCCC و ACGGTCTTTA

بكمية مولارية أكثر ثلاث مرات عن الناقل المذيل بالأوليجو dG.

ب- طرق تهجين المستعمرات لفحص مكتبة cDNA القرود:

تم نشر E. coli المتحولة بكثافة مقدارها ٩٠٠٠ مستعمرة لكل طبق ١٠ × ١٠سم على اطباق تغذية تحتوي على ٥٠ ميكروجرام / مل من الأمبسيللين Ampicillin وتم تبليل مرشحات الفحص الوراثي GeneScreen Filters (New England Nuclear رقم الدليل NEF-٩٧٢) اولا على طبق BHI-CAM (مستحضر حقن المخ والقلب من باكتو ٣٧ جم / لتر واحماض الكاس أمينو ٢ جم / لتر والآجار ١٥ جم / لتر، المحتوي على ٥٠٠ ميكروجرام / مل من الكلور امفينيكول chloramphenicol) وتم استخدامه لرفع المستعمرات من الطبق وتم زراعة المستعمرات في نفس الوسط لمدة ١٢ او اطول لمضاعفة أرقام نسخ البلازميد وتم معالجة المستعمرات المضاعفة (الجانب المرتفع للمستعمرة) عن طريق وضع المرشحات بشكل متسلسل على قطعتين من ورقة واتمان ٣ مم Whatman 3 MM paper المشبعة بكل من المحاليل التالية:

١) ٥٠ مل مولار جلوكوز - ٢٥ مل مولار Tris-HCl (pH = ٨) -١٠ مل مولار EDTA (pH = ٨) لمدة ٥ دقائق؛ و

٢) ٠,٥ مولار NaOH لمدة ١٠ دقائق، و

٣) ١ مولار Tris-HCl (pH = ٧,٥) لمدة ثلاث دقائق.

ثم تم تجفيف المرشحات بالهواء في فرن تفريغ عند ٨٠°م لمدة ساعتين.

وتم تعريض المرشحات لعملية هضم بالبروتيناز ك proteinase K من خلال المعالجة بمحلول يحتوي على ٥٠ ميكروجرام / مل من إنزيم البروتياز في محلول منظم k [٠,١ مولار Tris-HCl (pH = ٨) – ٠,١٥ مولار NaCl – ١٠ مل مولار EDTA (pH = ٨,٢) – ٠,٢ في المائة SDS]. وبشكل محدد، تم إضافة ٥ مل من المحلول لكل مرشح وتم ترك عملية الهضم مستمرة عند ٥٥°م لمدة ٣٠ دقيقة، بعدها تم إزالة المحلول.

ثم تم معالجة المرشحات بمقدار ٤ مل من محلول التهجين الأولى prehybridization المنظم (٥ × SSPE – ٠,٥ في المائة SDS – ١٠٠ ميكروجرام / مل SS E. coli DNA – ٥ × BFP)

وتم إجراء معالجة التهجين الأولى عند ٥٥°م بشكل عام لمدة ٤ ساعات أو اكثر، بعدها تم إزالة محلول التهجين الأولي المنظم.

وتم إجراء عملية التهجين بالطريقة التالية: حيث تم إضافة ٣ مل من محلول التهجين (٥ × SSPE – ٠,٥ في المائة SDS – ١٠٠ ميكروجرام / مل tRNA الخميرة) لكل مرشح حيث يحتوي المحلول على ٠,٠٢٥ بيكومول picomoles لكل واحد من ١٢٨ تتابع مجس في الجدول ٢ (تم تمييز الخليط الكلي بالخليط EPV) وتم الحفاظ على المرشحات عند ٤٨°م لمدة ٢٠ ساعة وكانت درجة الحرارة هذه أقل بمقدار ٢°م عن اقل درجة حرارة تحلل محسوبة (Td) التي تم تحديدها لأي من المجسات.

وبعد التهجين، تم غسل المرشحات ثلاث مرات لمدة ١٠ دقائق على جهاز رج باستخدام ٦ × SSC – ٠,١ في المائة SDS عند درجة حرارة الغرفة ثم غسله من مرتين إلى ثلاث مرات باستخدام ٦ × SSC – ١ في المائة SDS عند درجة حرارة التهجين (٤٨°م).

وأظهر التصوير الإشعاعي الذاتي Autoradiography للمرشحات سبعة مستنسخات موجبة بين ٢٠٠,٠٠٠ مستعمرة تم فحصها.

وتم إجراء تحليل التتابع المبدئي لأحد مستنسخات cDNA القرود (المسماه بالنسخة ٨٣ التي تم عن طريق تعديل طريقة Wallace وزملائه الموصوفة في

Gene ، ١٦، الصفحة ٢١-٢٦ (١٩٨١) وباختصار، تم جعل DNA البلازميد من نسخة cDNA ، القرود ٨٣ خطي عن طريق الهضم بواسطة ECORI ثم نزع طبيعته عن طريق التسخين في حمام ماء مغلي ثم تم تحديد تتابع النيوكليوتيد بواسطة طريقة dideoxy باسم Sanger وزملائه في P. N. A. S (USA) ٧٤، الصفحات ٥٤٦٣-٥٤٦٧ (١٩٧٧) وتم استخدام مجموعة فرعية من خليط EPV للمجسات التي تتكون من ١٦ تتابع كجزء أساسي لتفاعلات التتابع.

ج- تتابع EPO cDNA في القرود:

تم إجراء تحليل النيوكليوتيد للنسخة ٨٣ باستخدام طرق الخلط العشوائي الموصوفة في Methods in Enzymology، ١٠١، الصفحات ٢٠- ٧٨ (١٩٨٣) وتم في الجدول ٤ توضيح تحليل خريطة حصر مبدئي لجزء EcoRI/ HindlII المستنسخ ذو ١٦٠٠ زوج قاعدي في النسخة ٨٣ وتم إعطاء المواقع التقريبية لمواقع تمييز إنزيم الإندونيوكلياز الحصري restriction endo-nuclease enzyme من حيث عدد القواعد ٣` إلى موقع EcoRI عند الطرف ٥` في الجزء وتم إجراء عملية إيجاد تتابع النيوكليوتيد عن طريق تتبع الأجزاء الحصرية الفردية مع مضاهاة الأجزاء المتداخلة فعلى سبيل المثال، تداخل معلومات التتابع التي يعطيها تحليل النيوكليوتيدات في الجزء الحصري المسمى باسم C113 (Sau3A عند حوالي ١١١/ SmaI عند حوالي ٣٢٤) والتتابع في الترتيب العكسي للجزء المسمى C73 (AluI عند حوالي ٤٢٤ / BstEII عند حوالي ٢٠٣).

الجدول ٤

الإنزيم الحصري Restriction Enzyme	
موقع التمييز	المواقع التقريبية
Eco RI	١
Sau 3A	١١١
Sma I	١٨٠
Bst EII	٢٠٣
Sma I	٣٢٤
Kpn I	٣٧١
Rsa I	٣٧٢
Alu I	٤٢٤
Pst I	٤٢٦
Alu I	٤٣٠
Hpa I	٤٦٦
Alu I	٥٤٦
Pst I	٦٠١
Pvu II	٦٠٤
Alu I	٦٠٥
Alu I	٧٨٢
Alu I	٧٨٨
Rsa I	٧٩٢
Pst I	٨٠٧
Alu I	٨٤١
Alu I	٩٢٧
Nco I	٩٤٦

الانزيم الحصري Restriction Enzyme

موقع التمييز	المواقع التقريبية
Sau 3A	١٠١٤
Alu I	١٠٧٢
Alu I	١١١٥
Alu I	١٢٢٣
Pst I	١٣٠١
Rsa I	١٣٤٣
Alu I	١٣٨٤
Hind III	١٤٤٩
Alu I	١٤٥٠
Hind III	١٥٨٥

سمح إيجاد تتابع لمقدار حوالي ١٣٤٢ زوج من القواعد (داخل المنطقة التي تربط الموقع ٣` Sau3A إلى موقع EcorI وموقع Hind III) وتحليل كل إطارات القراءة الممكنة بتطوير معلومات تتابع DNA والحمض الأميني الموضحة في الشكل ٥، والتي تضم الأجزاء ٥أ و ٥ب و ٥ج وفي الشكل المذكور، تم تمييز شق الحمض الأميني المبدئي للطرف الأميني في EPO الناضج (كما تم تأكيده بالعلاقة مع تحليل التتابع المذكور سابقا لعشرين شق أميني طرفي) بالعدد + ١ ويكون وجود مشفر ATG المحدد للميثيونين methionine (المسمى – ٢٧) "اعلى" شق الانين alanine في الطرف الأميني الأولي كشق أول خاص بتتابع الحمض الأميني في البروتين الناضج مؤشر لاحتمالية التعبير عن EPO بشكل مبدئي في السيتوبلازم في شكل مادة أولية تحتوي على منطقة "دليل" من ٢٧ حمض أميني التي تم قطعة قبل دخول EPO ناضج إلى الدورة الدموية وتم تمييز مواقع إضافة الجليكوسيل glycosylation الأساسية داخل عديد الببتيد بأقواس وتم تحديد الوزن الجزيئي التقديري في المنطقة التي تم فك شفرتها بأن يكون ٢١,١١٧ دالتون وتم تحديد الوزن الجزيئي لمقدار ١٦٥ شق في عديد الببتيد الذي يمثل EPO القرود الناضج بمقدار ١٨,٢٣٦ دالتون Daltons.

جدول ٥

تحويل EPO cDNA في القرد

```
Sau3A
GATCCCGCGCCCCCTGGACAGCCGCCCTCTCCTCCAGGCCCGTGGGCCTGGCCCTGCCC

CGCTGAACTTCCCCGGGATGAGGACTCCCGGTGTGGTCACCGCGCGCCTAGGTCGCTGAG


                        -27                                 -20
                        Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp
GGACCCCGGCCAGGCGCGGAGATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG

                                    -10
Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro
CTG TGG CTT CTC CTG TCT CTC GTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA

          -1  +1                                        10
Val Pro Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu
GTC CCG GGC GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT GAC AGC CGA GTC CTG

                                20                  *
Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Val Thr Met
GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG GAG GCC GAG AAT GTC ACG ATG

          30                                    *       40
Gly Cys Ser Glu Ser Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro
GGC TGT TCC GAA AGC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACC GTC CCA


                                50'
Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
GAC ACC AAA GTT AAC TTC TAT GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTC GGG

          60                                            70
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu
CAG CAG GCT GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTC TCA GAA

                                80
Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Val Leu Ala Asn Ser Ser Gln Pro
GCT GTC CTG CGG GGC CAG GCC GTG TTG GCC AAC TCT TCC CAG CCT

          90                                        100
Phe Glu Pro Leu Gln Leu His Met Asp Lys Ala Ile Ser Gly Leu
TTC GAG CCC CTG CAG CTG CAC ATG GAT AAA GCC ATC AGT GGC CTT

                                110
Arg Ser Ile Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Glu Ala
CGC AGC ATC ACC ACT CTG CTT CGG GCG CTG GGA GCC CAG GAA GCC
```

جدول ٥ (باقي)

```
      120                                                  130
Ile Ser Leu Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
ATC TCC CTC CCA GAT GCG GCC TCG GCT GCT CCA CTC CGA ACC ATC

                        140
Thr Ala Asp Thr Phe Cys Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe
ACT GCT GAC ACT TTC TGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC

      150                                                  160
Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Arg
CTC CGG GGA AAG CTG AAG CTG TAC ACG GGG GAG GCC TGC AGG AGA

      165
Gly Asp Arg OP
GGG GAC AGA TGA CCAGGTGCGTCCAGCTGGGCACATCCACCACCTCCCTCACCAACA

CTGCCTGTGCCACACCCTCCCTCACCACTCCCGAACCCCATCGAGGGGCTCTCAGCTAAG

CGCCAGCCTGTCCCATGGACACTCCAGTGCCAGCAATGACATCTCAGGGGCCAGAGGAAC
TGTCCAGAGCACAACTCTGAGATCTAAGGATGTCGCAGGGCCAACTTGAGGGCCCAGAGC
ACGAAGCATTCAGAGAGCAGCTTTAAACTCAGGAGCAGAGACAATGCAGGGAAAACACCT
GAGCTCACTCGGCCACCTGCAAAATTTGATGCAGGACACGCTTTGGAGGCAATTTACCTG
TTTTTGCACCTACCATCAGGGACAGGATGACTGGAGAACTTAGGTGGCAAGCTGTGACTT
CTCAAGGCCTCACGGGCACTCCCTTGGTGGCAAGAGCCCCCTTGACACTGAGAGAATATT
TTGCAATCTGCAGCAGGAAAAATTACGGACAGGTTTTGGAGGTTGGAGGGTACTTGACAG
GTGTGTGGGGAAGCAGGGCGGTAGGGGTGGAGCTGGGATGCGAGTGAGAACCGTGAAGAC
AGGATGGGGGCTGCCCTCTGCTTCTCGTGCGGTCCAAGCTT
                                    HindIII
```

ويمكن تعريض تتابع عديد الببتيد في الجدول ٥ بسهولة إلى التحليل من حيث وجـــود مناطق محبة للماء بدرجة كبيرة و/ او خواص موضعية ثانوية التي تشير إلى المناطق المكونة للمناعة بدرجة كبيرة وأساسية عن طريق استخدام مثلا طرق Hopp وزملائه في Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (USA) P. N. A. S.، ٧٨، الصـــفحات ٣٨٢٤-٣٨٢٨ (١٩٨١) و Kyte وزملائه في J. Mol. Biol.، ١٥٧، الصفحات ١٠٥- ١٣٢ (١٩٨٢) و/ او Chou وزملائه في Biochem.، ١٣، الصفحات ٢٢٢- ٢٤٥ (١٩٧٤) وفي Advances in Enzymology، ٤٧، الصفحات ٤٥-٤٧ (١٩٧٨) ويكون التحليل الذي يستخدم الكومبيوتر طبقا لطريقة Hopp وزملائه متاحا عن طريق برنامج يسمى PEP الجزء المرجعي ٦,٧ المتاح من مؤسسة Intelligenetics ، ١٢٤، ميدان الجامعة بالو التو، كاليفورنيا.

المثال ٤

أ – مكتبة الشفرة الوراثية البشرية:

تم الحصول على مكتبة شفرية وراثية لكبد الجنين البشري المتكون من طور Ch4A المحضرة باتباع طرق Lawn وزملائه في Cell، في السابق والحفاظ على‌ها للاستخدام في اختبار تهجين البلاك plaque hybridization assay.

ب- طرق تهجين البلاك لفحص مكتبة الشفرة الوراثية البشرية:

تم تحليل جزيئات الخلايا الآكلة وتم تثبيت DNAs على المرشحات (٥٠٠,٠٠٠ بلاك لكل مرشح) باتباع طرق Woo في Methods in Enzymology ، ٦٨، الصفحات ٣٨٩- ٣٩٥ (١٩٧٩) باستثناء استخدام مرشحات New England Nuclear) Gene Screen Plus رقم الدليل NEF- ٩٧٦) وأطباق NZYAM (NaCl ٥ جم، $MgCl_2 - 6H_2O$ ٢ جم، NZ-Amine A، ١٠ جم، مستخلص الخميرة، ٥ جم، أحماض الكاسامينو casamino acids ٢ جم، المالتوز maltose ٢ جم والأجار Agar ١٥ جم لكل لتر).

وتم تسخين المرشحات المجففة في الهواء عند ٨٠°م لمدة ساعة ثم هضمها بالبروتينازك Proteinase k كما هو موصوف في المثال ٣، الجزء ب وتم إجراء التهجين الأولى باستخدام ١ مولار NaCl- ١ في المائة محلول SDS منظم عند ٥٥°م لمدة ٤ ساعات او اكثر، بعدها تم إزالة المحلول المنظم وتم إجراء التهجين والغسل بعد التهجين والغسل بعد التهجين كما هو موصوف في المثال ٣، الجزء ب وتم استخدام كلا من الخليط من ١٢٨ مجس ٢٠ مير المسمى EPV والخليط من ١٢٨ مجس ١٧ مير في الجدول ٣ (المسمى خليط EPQ) وتم إجراء التهجين عند ٤٨°م وباستخدام خليط مجس EPV وتم إجراء تهجين خليط مجس EPQ عند ٤٦°م- ٤ درجات اقل من Td المحسوبة الأقل لعناصر الخليط وتم إزالة المجس المهجن لإعادة التهجين عن طريق الغليان مع ١ × SSC – ٠,١ SDS لمدة دقيقين وأظهر التصوير الإشعاعي الذاتي للمرشحات ثلاث مستنسخات موجبة (نشطة مع كلا من مخاليط المجسات) بين ١,٥٠٠,٠٠٠ بلاك خلايا آكلة تم فحصهم وتم التحقق من النسخ الموجبة على انها مشفرة لـ EPO من خلال تتابع DNA والتصوير الدقيق

الالكتروني لتكوين المزدوج المخلط باستخدام cDNA القرود من المثال ٣ وأعطت هذه الطريقة أيضا دليل على الانترونات introns المتعددة في تتابع DNA للشفرة الوراثية.

المثال ٥

٥ تم إجراء تحليل تتابع النيوكليوتيد لأحد المستنسخات الموجبة (المميزة باسم AhE1) وتم الحصول على النتائج بشكل حديث وتوضيحها في الجدول ٦.

AAGCTTCTGGGCTTCCAGACCCAGCTACTTTGCGGAACTCAGCAACCCAGGCATCTCTGAGTCTCCGCCCA

AGACCGGGATGCCCCCCAGGGGAGGTGTCCGGGAGCCCAGCCTTTCCCAGATAGCACGCTCCGCCAGTCCC

AAGGGTGCGCAACCGGCTGCACTCCCCTCCCGCGACCCAGGCCCCCGGAGCAGCCCCCATGACCCACACGC

ACGTCTGCAGCAGCCCCGCTCACGCCCCGGCGAGCCTCAACCCAGGCGTCCTGCCCCTGCTCTGACCCCGG

GTGGCCCCTACCCCTGGCGACCCCTCACGCACACAGCCTCTCCCCCACCCCCACCCGCGCACGCACACATG

CAGATAACAGCCCCGACCCCCGGCCAGAGCCGXAGAGTCCCTGGGCCACCCCGGCCGCTCGCCTGCCGCTG

CGCCGCACCGCGCTGTCCTCCCGGAGCCGGACCGGGGCCACCGCGCCCXGCTCTGCTCCGACACCGCGCCC

CTTGGACAGCCGCCCTCTCCTCTAGGCCCGTGGGGCTGGCCCTGCACCGCCGAGCTTCCCGGGATGAGGXX

	-27			-24	
	Met	Gly	Val	His	
CCCGGTGACCGGCGCGCCCCAAGTCGCTGAGGGACCCCGGCCAAGCGCGGAG	ATG	GGG	GTG	CAC	G

GTGAGTACTCGCGGCCTGCGCGCTCCCGGCGCCCGGGTTCCTGTTTGAGCGGGGATTTAGCGCCCCGGCT

```
ATTGGCCAAGAGGTGGCTGGGTTCAAGGACCGGCCACTTGTCAAGGACCCCGGAAGGGCGAGGGGGGTGGG

GCAGCCTCCACGTGCCGCGGGGACTTGGGGGAGTTCTTGGGGATGGCAAAAACCTGGCCTGTTGAGGGGCA

CAGTTTGGGGTTGGGGAGGAGGTTTGGGGTTCTGCTGTGCAGTTGTGTCGTTGTCAGTGTCTCG[E.S.]

TTGCACACGCACAGATCAATAAGCCAGAGGCAGCACCTGAGTGCTTGCATGGTTGGGACAGGAAGGACGAG


CTGGGGCAGAGACGTGGGGATGAAGGAAGCTGTCCTTCCACAGCCACCCTTCTCCCCCCCCGCCTGACTCT

                          -23          -20
                          Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
CAGCCTGGCTATCTGTTCTAG      AA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG

    -10                                        -1  +1
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys
CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT

         10                                                20          *
Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG GAG GCC GAG AAT ATC

 26
Thr
ACG GTGAGACCCCTTCCCCAGCACATTCCACAGAACTCACGCTCAGGGCTTCAGGGAACTCCTCCCAGAT


CCAGGAACCTGGCACTTGGTTTGGGGTGGAGTTGGGAAGCTAGACACTGCCCCCCTACATAAGAATAAGTC
```

فيما (فيما) ١ شكل

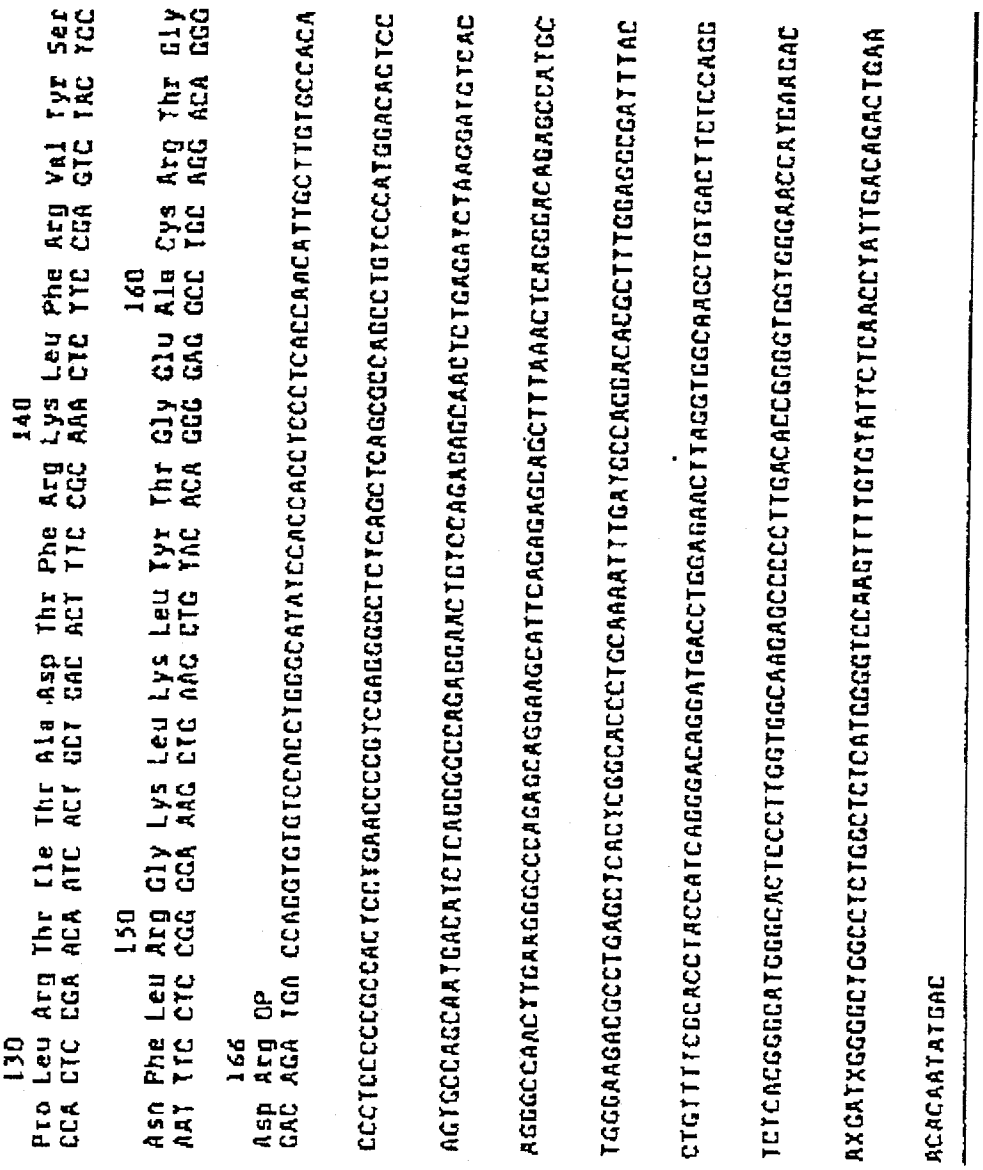
```
TGGTGGCCCCAAACCATACCTGAAACTAGGCAAGGAGCAAAGCCAGCAGATCCTACGCCTGTGGCCCAGGG

                                                                27          30
                                                                Thr Gly Cys Ala Glu
CCAGAGCCTTCAGGGACCCTTGACTCCCCGGGCTGTGTGCATTTCAG                 ACG GGC TGT GCT GAA

                                    *       40
His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr
CAC TGC AGC TTG AAT GAG AAT ATC ACT GTC CCA GAC ACC AAA GTT AAT TTC TAT

 50                    55
Ala Trp Lys Arg Met Glu
GCC TGG AAG AGG ATG GAG GTGAGTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTCCTTTCTTTTGGAGAATCTCATT

TGCGAGCCTGATTTTGGATGAAAGGGAGAATGATCGGGGGAAAGGTAAAATGGAGCAGCAGATGAGGCT

GCCTGGGCGCAGAGGCTCACGTCTATAATCCCAGGCTGAGATGGCCGAGATGGGAGAATTGCTTGAGCCCT

GGAGTTTCAGACCAACCTAGGCAGCATAGTGAGATCCCCCATCTCTACAAACATTTAAAAAAATTAGTCAG

GTGAAGTGGTGCATGGTGGTAGTCCCAGATATTTGGAAGGCTGAGGCGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAA

TTTGAGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCACTGCACTCCAGCCTCAGTGACAGAGTGAGGCCCTGTCTCA
```

جدول ٦ (باقي)

```
AAAAAGAAAAGAAAAAAGAAAAATAATGAGGGCTGTATGGAATACATTCATTATTCATTCACTCACTCACT

CACTCATTCATTCATTCATTCATTCAACAAGTCTTATTGCATACCTTCTGTTTGCTCAGCTTGGTGCTTGG

GGCTGCTGAGGGGCAGGAGGGAGAGGGTGACATGGGTCAGCTCGACTCCCAGAGTCCACTCCCTGTAG

 56                  60                                                  70
Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
GTC GGG CAG CAG GCC GTA GAA GTC TGG CAG GGC CTC GCC CTG CTG TCG GAA GCT

                                80           *                          90
Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu
GTC CTG CGG GGC CAG GCC CTG TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG

                                    100
Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu
CAG CTG CAT GTG GAT AAA GCC GTC AGT GGC CTT CGC AGC CTC ACC ACT CTG CTT

110                 115
Arg Ala Leu Gly Ala Gln
CGG GCT CTG GGA GCC CAG GTGAGTAGGAGCGGACACTTCTGCTTGCCCCTTTCTGTAAGAAGGGGGA

GAAGGGTCTTGCTAAGGAGTACAGGAACTGTCCGTATTCCTTCCCTTTCTGTGGCACTGCAGCGACCTCCT

                    116             120
                    Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala
GTTTTCTCCTTGGCAG    AAG GAA GCC ATC TCC CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT
```

جدول ٦ (يتبع)

جدول ٦(باقي)



وفي جدول ٦، يميز تتابع DNA المستمر المبدئي خيط علوي من ٦٢٠ قاعدة فيما هو بشكل واضح عبارة عن تتابع غير مترجم يسبق مباشرة جزء مترجم من جين EPO البشري وبشكل محدد أكثر، اتضح أن التتابع يضم الطرف ٥` للجين الذي يؤدي إلى تشفير منطقة DNA مترجمة للاحماض الأمينية الأربعة الأولى (-٢٧ حتى -٢٤) لتتابع رئيسي ("تتابع أولي") ولم يتم حتى الآن تحديد أربعة أزواج

قاعدية في التتابع قبل ذلك الذي يشفر بداية الدليل وبالتالى تم تمييزهم بـالرمز "X" وبعد ذلك يأتي انترون به ٦٣٩ زوج قاعدي (تم إيجاد تتابع ٤٣٩ زوج منهم وتم تمييز المائتي زوج قاعدي المتبقية تم تمييز بعضها بالرمز "I.S.") والذي يسبق مباشرة مشفر لحمض الجلوتاميك glutamine الذي تم تسميته الشق -٢٣ في عديد البيتيد المترجم وقد لوحظ أن تتابع الإكسون exon الذي يلي مباشرة يشفر شقوق الحمض الأميني من خلال شق الانين alanine (المسمى الشق +١ في تتابع الحمض الاميني في EPO البشري الناضج) إلى المشفر الخاص بالثريونين threonine عند الموضع +٢٦ حيث يلي ذلك انترون ثاني يتكون من ٢٥٦ قاعدة كما تم تسميتهم بشكل محدد وبعد هذا الانترون يتواجد تتابع اكسون لشقوق الحمض الاميني من ٢٧ في ٥٥ وبعد ذلك يتواجد انترون ثالث يتكون من ٦١٢ زوج قاعدي كبدايات ويشفر الاكسون التالى الشقوق ٥٦ في ١١٥ في EPO البشري ثم يبدأ بعد ذلك انترون رابع به ١٣٤ قاعدة كما هو محدد وبعد الانترون الرابع يتواجد إكسون يشفر الشقوق أرقام ١١٦ حتي ١٦٦ ومشفر "ايقاف" (TGA) وفي النهاية ، يحدد الشكل ٦ تتابع من ٥٦٨ زوج قاعدي الذي فيه تتواجد منطقة ٣ غير مترجمة في جين EPO البشري ولم يتم إيجاد تتابع لاثنين من هذه الازواج القاعدية ("X") حتي الآن.

وبالتالى فإن الجدول ٦ يساعد في التعرف على الوضع النسبي التركيبي الأولي (تتابع الحمض الاميني) في EPO البشري الناضج على أنه يحتوي على ١٦٦ شق حمض أميني محدد (الوزن الجزيئي التقديري = ٨,٣٩٩) ويتضح أيضاً في الشكل تتابع تنسيق DNA لتتابع دليل من ٢٧ شق سوياً مع تتابعات ٥ّ و٣ DNA الذي قد يكون مميزاً في وظائف المحفز/ المشغل في أوبرون الجين البشري human gene operon وتم تمييز مواقع اضافة الجليكوسيل الاساسية في EPO البشري الناضج عديد البيتيد في هذا الشكل باقواس ومما يستحق الملاحظة أن تتابع الحمض الاميني المحدد في الشكل ٦ يمثل بشكل مناسب ذلك الموجود في الشكل المجنح allelic form الموجود في الطبيعة للاريثروبويتين البشري وتم تدعيم هذا الموضع بما هو موجود في نتائج المجهودات المستمرة لايجاد تتابع للمكونات البولية المفصولة من الاريثروبويتين البشري التي أعطت نتيجة توضح أن عدد كبير من جزيئات

الاريثروبويتين الموجودة يوجد به ميثونين methionine عند الشق ١٢٦ على العكس من السيرين serine كما هو موضح في الجدول.

ويوضح الجدول ٧، التالى، مدى تماثل تتابع عديد الببتيد بين EPO البشري وEPO القرود وفي الخط المستمر العلوي في الشكل، تم استخدام رموز من حروف فردية لتمثل تتابعات عديد الببتيد التي تم فك شفرتها في EPO البشري التي تبدأ بالشق ٢٧ ويوضح الخط المستمر السفلي تتابع عديد الببتيد المستنتج في EPO القرود الذي يبدأ عند رقم الشق المسمي -٢٧ وتم استخدام النجوم لابراز تماثل التتابع ويجب أن نلاحظ أن تتابعات EPO البشرية وفي القرود المستنتجة تظهر شق lysine (K) "اضافي" عند الموضع ١١٦ (البشري) وتوضح الاشارة بالارتباط مع الشكل ٦ أن هذا الشق يكون عند حافة رابطة شطر mRNA في تتابع الشفرة الوراثية وتم التحقق من وجود شق الليسين في تتابع عديد الببتيد البشري اكثر عن طريق ايجاد تتابع لنسخة cDNA البشري المحضرة من mRNA المفصول من خلايا cos-1 المتحولة باستخدام DNA الشفرة الوراثية البشرية في المثال ٧، اللاحق.

جدول ٧

مقارنة لعديد الببتيدات البشرية والقرديه

```
                -20       -10        +1        10        20        30        40
Human   MGVHECPAWLWLLLSLVSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTK
        ********************************************** * ** * ********** *****
Monkey  MGVHECPAWLWLLLSLVSLPLGLPVPGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENVTMGCSESCSLNENITVPDTK

                50        60        70        80        90        100       110
Human   VNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKE
        ********************************** * ***** ****** *** ***** **********
Monkey  VNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQAVLANSSQPFEPLQLHHDKAISGLRSITTLLRALGAQ-E

                120       130       140       150       160
Human   AISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR
        *** ********************************************* ***
Monkey  AISLPDAASAAPLRTITADTFCKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRAGDR
```

المثال ٦

كان نظام التعبير المختار للمحاولات المبدئية للتصنيع الميكروبي لكميات قابلة للفصل من مادة EPO عديد الببتيد المشفر بواسطة cDNA القرود الناتج من طرق المثال ٣ هو عبارة عن نظام يتضمن خلايا عائل ثديية (أي خلايا COS-1 ، A.T.C.C رقم ١٦٥٠ ـCRL) وتم تطعيم الخلايا بناقل "مكوكي" قادر على التضاعف الذاتي في عائل E. coli (نتيجة لوجود DNA المشتق من pBR 322) والعوائل الثديية (نتيجة لوجود DNA المشتق من فيروس SV40).

وبشكل محدد أكثر، تم انشاء ناقل تعبير طبقا للطرق التالية حيث تم مضاعفة نسخة البلازميد ٨٣ الموضحة في المثال ٣ في E. coli وتم فصل DNA المشفر لـ EPO القرود الذي يبلغ ١,٤ kb تقريباً باستخدام عملية هضم EcoRI وHindIII وتم بشكل منفصل عزل جزء Hind III /SalI حوالي ٤ kb من pBR 322 وتم الحصول على جزئ "رابط" EcoRI /SalI حوالي ٣٠ bp من 10 RF DNA M13mp (معامل P وL) واحتوى هذا الرابط بشكل متسلسل طرف لزج EcoRI متبوعاً بمواقع تمييز SstI وSmaI و BamHI و XbaI وطرف لزج SalI وتم ربط الاجزاء الثلاثة السابقة للحصول على بلازميد متوسط حوالي ٥,٤ kb ("pERS") حيث تم ربط EPO DNA على أحد الجوانب بواسطة "صف" من مواقع تمييز الاندونيوكلياز الحصري endonuclease recognition وتم بعد ذلك هضم pERS باستخدام HindII و salI للحصول على EPO DNA ورابط EcoRI مع salI

(MB13mp 10). وتم ربط جزء ١,٤ kb مع BamHI /SalI حوالي ٤ kb في pBR322 ورابط جزء MBmp 10 HindIII/ BamHI RF آخر الذي له حوالي ٣٠ bp وتم تمييز جزء M13الرابط بالطرف HindIII اللزج متبوعاً بمواقع التمييز PstI وSalI و XbaI وطرف BamI اللزج وكان الناتج المربوط مرة أخرى بلازميد وسيط مفيد ("pBR-EPO") الذي يحتوي على EPO DNA المرتبط على كلا من الجانبين بواسطة صفوف من مواقع الحصر.

وتم انشاء الناقل المختار للتعبير عن EPO DNA في خلايا COS-1 ("pDSVL1") مسبقاً للسماح بالاختيار والمضاعفة الذاتية في E. coli وتم الحصول على هذه الخواص من مصدر التضاعف وتتابعات DNA جين مقاومة للأمبيسلين Ampicillin الموجودة في المنطقة الواقعة بين النيوكليوتيدات ٢٤٤٨ حتى ٤٣٦٢ في pBR322 وتم تعديل هذا التتابع تركيبياً عن طريق إضافة رابط يعطي موقع تمييز HindIII مجاور مباشرة للنيوكليوتيد ٢٤٤٨ قبل الادخال في الناقل. ومن بين خواص الناقل المختار المفيدة الأخرى هي القدرة على التضاعف ذاتياً في خلايا COS-1 ووجود تتابع محفز فيروسي وظيفي في الخلايا الثديية. وتم الحصول على هذه الخواص من مصدر تضاعف تتابع DNA وتتابع DNA المحفز الفيروسي "للجين الأخير" الموجود في التتابع 342 bp المحدد للنيوكليوتيد من رقم ٥١٧١ حتي ٢٧٠ في الشفرة الوراثية SV40 وتم الحصول على موقع الحصر الفريد (BamHI) في الناقل والمجاور مباشرة لتتابع المحفز الفيروسي من خلال استخدام تتابع رابط متاح تجارياً (الابحاث التعاونية) وتم أيضاً إدخال تتابع ٢٣٧ زوج قاعدي الى الناقل (المشتق على هيئة أرقام النيوكليوتيد ٢٥٥٣ حتى ٢٧٧٠ في SV40) المحتوي على إشارة عديد الادينيل polyadenylation signal في mRNA الفيرسي "للجين الاخير" المشار اليه بشكل عام بمركب إنهاء فك الشفرة) وتم وضع هذا الجزء في الناقل في الاتجاه المناسب بالمقارنة مع المحفز الفيروسي "للجين الأخير" من خلال موقع BamHI الفريد ويتواجد أيضا في الناقل جين ثديي آخر عند موقع غير أساسي لعملية فك الشفرة الاساسية لجين تم إدخاله عند موقع BamHI الفريد، بين المحفز الفيروسي والتتابعات النهائية [احتوي الجين الثديي على حوالي ٢,٥٠٠ bp جين صغير لريداكتاز ثاني هيدرو الفولات الفأري mouse dihydrofolate reductase (DHFR) المفصول من بلازميد pMG-1 كما وصف Gasser وزملاؤه في P.N.A.S،(USA) ، ٧٩، الصفحات ٦٥٢٢-٦٥٢٦، (١٩٨٢)] ومرة أخرى تحتوي المكونات التشغيلية الرئيسية في البلازميد pDSVL1 على النيوكليوتيدات ٢٤٤٨ حتى ٤٣٦٢ في pBR322 سويا مع النيوكليوتيدات ٥١٧١ حتى ٢٧٠ (٣٤٢ bp) و٢٥٥٣ حتى ٢٧٧٠ (٢٣٧ bp) في SV40 DNA.

وباتباع الطرق الموصوفة مثلا ما كتبه Maniatis وزملائه، فيما سبق، تم فصل DNA المشفر لـ EPO من البلازميد pBR-EPO على هيئة جزء BamHI وربطه داخل البلازميد pDSVL1 المقطوع بواسطة BamHI وتم استخدام تحليل الانزيم الحصري للتأكد من إدخال جين EPO في الاتجاه الصحيح في اثنين من الناقلات المستنسخة الناتجة (الناقلات المزدوجة H و L) ويوضح الشكل ٢، البلازميد pDSVL-MkE وتم حفظ الناقلات مع جينات EPO في الاتجاه الخاطئ (الناقلات F وX و G) للاستخدام كمراجع سالبة في تجارب التطعيم المصممة لتحديد مستويات التعبير عن EPO في العوائل المتحولة بالناقلات التي فيها EPO DNA في الاتجاه الصحيح.

وتم دمج الناقلات H وL و F و X وG مع DNA الناقل (DNA كبد وطحال الفئران) وتم استخدامهم في تطعيم أطباق ٦٠ مم مزدوجة باستخدام طرق راسب فوسفات الكالسيوم الدقيق calcium phosphate microprecipitate وتم أيضا تطعيم أطباق مزدوجة ٦٠ مم بواسطة DNA الناقل كمرجع سلبي لتحول "مقلد mock" وبعد ٥ أيام تم اختبار كل أوساط المزرعة من حيث وجود عديدات الببتيد التي لها الخواص المناعية التي لدى EPO الموجودة في الطبيعة.

المثال ٧:

أ) نظام التعبير عن EPO المبدئي الذي يتضمن خلايا COS-1:

تضمن النظام المختار للمحاولات المبدئية للتصنيع الميكروبي لكميات قابلة للفصل من مادة عديد ببتيد EPO البشري المشفرة بواسطة نسخة DNA EPO الشفرة الوراثية البشرية ،وأيضاً التعبير في خلايا عائل ثديي (أي خلايا COS-1، رقم A.T.C-C، CRL-١٦٥٠). وتم أولاً الاستنساخ الفرعي لجين EPO البشري داخل ناقل "مكوكي" القادر على التضاعف الذاتي في كل من عوائل E. coli (نتيجة لوجود DNA المشتق من pBR 322) وفي الخط الخلوي الثديي COS-1 (نتيجة لوجود DNA مشتق من فيروس SV40) ثم تم تطعيم الناقل المكوكي المحتوي على جين EPO داخل خلايا COS-1 وتم انتاج مادة عديد ببتيد EPO في الخلايا المطعمة وافرازه في داخل وسط زراعة الخلايا.

وبشكل محدد أكثر، تم انشاء ناقل تعبير طبقا للطرق التالية حيث تم فصل DNA من النسخة lanbda clone λhE1 المحتوي على جين EPO الشفرة الوراثية وتعريضه للهضم بواسطة الاندونيوكليازات الحصرية BamHI وHindIII وتم فصل جزء DNA ٥,٦ kb معروف باحتوائه على جين EPO الكامل ثم تم خلط هذا الجزء وربطه مع البلازميد البكتيري pUC8 (معامل بيثيسدا Bethesda للأبحاث) الذي تم هضمه بشكل مماثل للحصول على البلازميد الوسيط "pUC8-HuE" الذي يعطي مصدر مناسب لهذا الجزء الحصري.

وتم انشاء الناقل المختار للتعبير عن EPO DNA في خلايا COS-1 (pSV4SEt) مسبقاً واحتوى البلازميد pSV4SEt على تتابعات DNA تسمح بالاختيار والتضاعف الذاتي في E. coli وتم الحصول على هذه الخواص من مصدر التضاعف وتتابعات DNA جين مقاومة الأمبسيلين الموجودة في المنطقة التي تربط النيوكليوتيدات ٢٤٤٨ حتى ٤٣٦٢ في البلازميد البكتيري pBR 322 وتم تعديل التتابع تركيبياً عن طريق إضافة رابط يعطي موقع تمييز HindIII مجاور مباشرة للنيوكليوتيد ٢٤٤٨ وكان البلازميد pSV4SEt قادر على التضاعف الذاتي في خلايا COS-1 وتم الحصول على هذه الخاصية باستخدام جزء ٣٤٢ bp يحتوي على مصدر فيروسي SV40 للتضاعف (ارقام النيوكليوتيد ٥١٧١ حتى ٢٧٠) وتم تعديل هذا الجزء عن طريق إضافة رابط يعطي موضع تمييز ECORI مجاور للنيوكليوتيد ٢٧٠ ورابط يعطي نيوكليوتيد مجاور لموقع تمييز SaII ٥١٧١ ويتواجد جزء ١٠٦١ bp من SV40 ايضا في هذا الناقل (ارقام النيوكليوتيد ١٧١١ حتى ٢٧٧٢ زائد رابط يعطي موقع تمييز SaII مجاور لرقم النيوكليوتيد ٢٧٧٢) وداخل هذا الجزء يتواجد تتابع تمييز BamHI فريد وبشكل عام، احتوى البلازميد pSV4SEt على موقع تمييز BamHI و HindIII فردية مما يسمح بإدخال جين EPO البشري والتتابعات التي تسمح بالتضاعف والاختبار في E. coli والتتابعات التي تسمح بالتضاعف في خلايا COS-1.

ومن اجل إدخال جين EPO إلى داخل pSV4SEt، فإنه تم هضم البلازميد pUCB-HuE باستخدام اندونيوكليازات حصر BamHI و HindIII وتم فصل

جزء DNA الذي يشفر EPO ٥,٦ Kb وتم أيضا هضم pSV4SEt باستخدام BamHI و HindIII وجزء ٢٥١٣ bp الرئيسي المفصول (للحفاظ على الوظائف الضرورية) ثم تم خلط هذه الأجزاء وربطها للحصول على الناقل النهائي "pSVgHuEPO" (راجع الشكل ٣) وتم نشر هذا الناقل في E. coli ثم فصل DNA الناقل وتم استخدام تحليل إنزيم الحصر للتأكد من إدخال جين EPO.

وتم استخدام البلازميد pSVgHuEPO DNA للتعبير عن مادة عديد ببتيد EPO البشري في خلايا COS-1 وبشكل محدد اكثر تم دمج pSVgHuEPO DNA مع DNA الناقل وتطعيمه داخل اطباق ثلاثية ٦٠ مم من خلايا COSP-1 وكمرجع، تم تطعيم DNA الناقل بمفرده أيضا داخل خلايا COS-1 ثم تم أخذ عينات من أوساط زراعة الخلايا بعد ٥ و٧ أيام واختبارها من حيث وجود عديدات الببتيد التي لها الخواص المناعية الموجودة لدى EPO البشري الموجود في الطبيعة.

ب- نظام التعبير عن EPO الثاني الذي يتضمن خلايا COS-1:

تم تصميم نظام آخر أيضا للحصول على انتاج أفضل من مادة عديد ببتيد EPO المشفرة بواسطة نسخة DNA EPO الشفرة الوراثية البشرية في خلايا COS-1 (A. T. C. C رقم CRL-1650).

وفي النظام السابق مباشرة، تم التعبير عن EPO في خلايا COS-1 باستخدام محفزة الذي يندرج داخل جزء حصر BamHI إلى HindIII ٥,٦ Kb وفي البناء التالى، تم تغيير جين EPO بحيث يتم التعبير عنه باستخدام محفز SV40 الأخير.

وبشكل محدد أكثر، تم تعديل جزء حصر EPO البشري الوراثي BamHI حتى HindIII ٥,٦ Kb بالطرق التالية حيث تم شطر البلازميد pUC8-HuE كما هو موصوف سابقا باستخدام اندونيوكليازات حصر BamHI و BstEII حيث يشطر BstEII داخل جين EPO ٥,٦ kb عند الموضع الذي يكون عبارة عن ٤٤ زوج قاعدي ٥ إلى ATG الابتدائي الذي يشفر الببتيد الأولى وحوالي ٦٨٠ زوج قاعدي ٣` إلى موقع حصر HinidIII ثم تم فصل الجزء الذي به حوالي ٤٩٠٠ زوج قاعدي وتم تصنيع جزء DNA رابط تخليقي يحتوي على اطراف SaII و Bst II

اللزجة وموقع تمييز BamHI الداخلي ثم تنقيته ثم تم خلط الجزئين وربطهم بالبلازميد pBR322 الذي تم قطعه باستخدام SaII و BamHI لانتاج البلازميد الوسيط pBRgHE ويمكن فصل جين EPO البشري الوراثي منه على هيئة جزء هضم BamHI الذي به ٤٩٠٠ زوج قاعدي الذي يحمل الجين التركيبي الكامل مع ٤٤ زوج قاعدي ATG فردي ٣` مع موقع BamHI المجاور لمنطقة التشفير الطرفية الأمينية.

ثم تم فصل هذا الجزء وإدخاله على هيئة جزء BamHI داخل بلازميد ناقل التعبير المشطور بواسطة BamHI وهو pDSVL1 (الموصوف في المثال ٦) وتم استخدام البلازميد الناتج pSVLgHuEPO كما هو موضح في الشكل ٤ للتعبير عن مادة عديد ببتيد EPO من خلايا COS-1، كما هو موصوف في الأمثلة ٦ و ٧أ.

المثال ٨

تم تحليل اوساط الزراعة من نمو مزارع COS-1 المطعمة الستة من المثال ٦ باستخدام التحليل المناعي الإشعاعي طبقا للطرق المذكورة في المثال ٢، الجزء ب ثم تم تحليل كل عينة عند مستويات عينات بمقدار ٢٥٠ و ١٢٥ و ٥٠ و ٢٥ ميكرولتر وكانت المحاليل الرائقة من نمو الخلايا المطعمة بشكل زائف أو المطعمة فعليا بناقلات بها اتجاه جين EPO غير صحيح سالبة بشكل غير ملتبس للفاعلية المناعية لـ EPO وبالنسبة لكل عينة من المحلولين الرائقين المشتقين من نمو خلايا COS-1، المطعمة بناقلات (Hand L) التي بها EPO DNA في الاتجاه الصحيح فإن النسبة المئوية لتثبيط ارتباط ^{125}I-EPO مع الجسم المضاد تتراوح من ٧٢ إلى ٨٨ في المائة الذي يضع كل القيم عند قمة المنحنى القياسي وبالتالى فإن التركيز الفعلى من EPO في المحلول الرائق لوسط الزراعة لم يمكن تقديره بشكل يمكن الاعتماد علىه حيث تم عمل تقدير محدود تماما بمقدار ٣٠٠ مل وحدة / مل على الرغم من ذلك من حساب القيمة الأكبر حجم لعينة محدودة (٢٥٠ ميكرولتر).

وتم اختبار سائل زراعة تمثيلي طبقا للمثال ٦ وسوائل الزراعة في اليوم الخامس والسابع الناتجة من المثال ٧أ في اختبار RIA من أجل مقارنة الفاعلية لمواد EPO البشرية ومن القرود معاد الاتحاد مع مادة EPO القياسية البشرية الموجودة في

الطبيعة وتم وضع النتائج في شكل بياني في الشكل ١ وباختصار، اظهرت النتائج على نحو متوقع ان EPO القرود معاد الاتحاد يتنافس بشكل واضح على الجسم المضاد لمضاد EPO البشري على الرغم من انه لم يكن قادرا على تثبيط الارتباط بشكل كامل تحت ظروف الاختبار وبالرغم من ذلك فإن اقصى قيم للنسبة المئوية للتثبيط الخاصة بـ EPO البشري معاد الاتحاد تقترب جدا من تلك لمادة EPO القياسية البشرية وتشير الطبيعة المتوازية لمنحنيات الجرعة – الاستجابة تماثل مناعي للتتابعات (القمة اللاصقة للمستصد epitopes) بشكل عام ثم اعيد تقييم التقديرات المسبقة لـ EPO القرود في سوائل الزراعة عند مستويات التخفيف الأعلى هذه ووجد أنها تتراوح من ٢,٩١ إلى ٣,١٢ وحدة / مل وتم ضبط مستويات انتاج EPO البشري المقدرة بشكل مناظر عند ٣٩٢ مل وحدة / مل بالنسبة لعينة نمو اليوم الخامس و٥٦٧ مل وحدة / مل بالنسبة لعينة نمو اليوم السابع وكانت مستويات انتاج EPO القرود المقدرة في المثال ٧ب لنظام التعبير في نفس الترتيب أو أفضل.

المثال ٩

تم تعريض سوائل الزراعة المحضرة طبقا للمثاليين ٦ و ٧ لتحليل معملي خاص بفاعلية EPO باتباع طريقة Goldwasser وزملائه في Endocrinology، ٩٧، ٢، صفحة ٣١٥-٣٢٣ (١٩٧٥) وتراوحت مستويات EPO القرود المقدرة لسوائل الزراعة المختبرة من ٣,٢ إلى ٤,٣ وحدة / مل وكانت زراعة سوائل EPO نشطة ايضا في هذا الاختبار المعملي وايضا أمكن معادلة هذا النشاط بالجسم المضاد لمضاد EPO وتم تعريض سوائل زراعة EPO القرود معاد الاتحاد من المثال ٦ لاختبار من حيث الفاعلية الحيوية داخل الجسم باتباع الطرق العامة التي وصفها Cotes وزملائه في Nature، ١٩١، صفحة ١٠٦٥- ١٠٦٧ (١٩٦١) وهاموند وزملائه في Ann. N. Y. Acad. Sci.، ١٤٩، صفحة ٥١٦-٥٢٧ (١٩٦٨) وتراوحت مستويات الفاعلية من ٠,٩٤ إلى ١,٢٤ وحدة / مل.

المثال ١٠

في الأمثلة السابقة، تم انتاج مادة EPO القرود او البشري معاد الاتحاد من الناقلات المستخدمة في تطعيم خلايا COS-1 حيث تتضاعف هذه الناقلات في خلايا

COS-1 نتيجة لوجود مستصد SV4OT داخل الخلايا ومصدر SV40 للتكاثر على الناقلات وعلى الرغم من ان هذه الناقلات تنتج كميات مفيدة من EPO في خلايا COS-1 فإن التعبير يكون مؤقتا فقط (٧ إلى ١٤ يوم) نتيجة للفقدان المحتمل للناقل وبالإضافة لذلك، فإن نسبة صغيرة فقط من COS-1 تصبح مطعمة بشكل منتج بالناقلات ويصف هذا المثال أنظمة تعبير تستخدم خلايا -DHFR من مبيض الفأر الصيني (CHO) والعلامة القابلة للاختيار DHFR (لمعروفة أنظمة التعبير المشابهة، راجع براءة الاختراع الأمريكية رقم ٤٣٩٩٢١٦ وطلبات براءة الاختراع الأوروبية أرقام ١١٧٠٥٨ و ١١٧٠٥٩ و ١١٧٠٦٠ وكلها منشورة في ٢٩ أغسطس ١٩٨٤].

وينقص خلايا CHO DHFR$^-$ خلايا CHD K1 (DuX-B11)، Urlaub وزملائه في Proc-Nat- Acad. Sci. (USA)، العدد ٧٧، ٤٤٦١ (١٩٨٠) إنزيم ثاني هيدرو فولات ريداكتاز (DHFR) نتيجة للطفرات في الجينات التركيبية وبالتالى تتطلب وجود الجليسين glycine والهيبو زانثين hypoxanthine والثايميدين thymidine في اوساط الزراعة وتم تطعيم البلازميدات pDSVL-MKE (المثال ٦) او pDSVL-gHuEPO (المثال ٧ب) سويا بواسطة DNA الناقل داخل خلايا CHO DHFR التي تنمو في الأوساط المحتوية على الهيبوزانثين hypoxanthine والثايميدين thymidine والجليسين glycine في أطباق زراعة ٦٠ مم ثم تم خلط البلازميد pSV-gHuEPO (المثال ٧أ) مع البلازميد pMG2 المحتوي على جين ثاني هيدروفورت ريداكتاز الفأر المستنسخ داخل ناقل البلازميد البكتيري pBR322 (باسم Gasser وزملائه، كما سبق) ثم تم تطعيم خليط البلازميد وDNA الناقل داخل خلايا CHO DHFR$^-$ (الخلايا التي تكتسب بلازميد واحد سوف تكتسب بشكل عام ايضا بلازميد ثاني) وبعد ثلاثة أيام، تم نشر الخلايا عن طريق إضافة التريبسين trypsinization داخل العديد من أطباق الزراعة ١٠٠ مم في الأوساط التي ينقصها الهيبوزانثين hypoxanthine والثايميدين thymidine وتكون تلك الخلايا التي تحولت بشكل ثابت بواسطة جين DHFR فقط وبالتالى جين EPO هي الخلايا الباقية في هذا الوسط وبعد ٧-٢١ يوم، تصبح مستعمرات الخلايا الباقية واضحة ويمكن

اكثار هذه المستعمرات المتحولة بعد النشر عن طريق إضافة الترييسين بشكل مستمر في وسط ينقصه الهيبوزانثين hypoxanthine والثايميدين thymidine للحصـــول على سلالات خلوية جديدة

(مثل CHOpDSVL-MkEPO و CHOpSV-gHuEPO و CHO- pDSVL- gHuEPO).

وتم اختبار سوائل الزراعة من سلالات الخلايا السابقة في اختبار RIA مـــن حيث وجود EPO القرود او البشر معاد الاتحـــاد واحتـــوى وســـط ســـلالة CHO pDSVL-MkEPO على EPO لـــه خواص مناعية مثل تلك الناتجة مـــن خلايـــا COS-1 المطعمة بالبلازميد pDSVL-MKEPO واحتوى سائل زراعة ٦٥ ساعة تمثيلي على EPO القرود بتركيز ٠,٦٠ وحدة / مل.

واحتوت سوائل الزراعة من CHO pSVg-HuEPO و CHOpDSVL- gHuEPO على EPO البشري معاد الاتحاد الذي له خواص مناعية مثل تلك الناتجة باستخدام خلايـــا COS-1 المطعمـــة بالبلازميـــد pSV-gHuEPO أو pDSVL- gHuEPO واحتوى سائل زراعة ٣ ايام تمثيلي من CHO pSVgHu EPO علـــى ٢,٩٩ وحدة / مل من EPO البشري واحتوت عينـــة ٥,٥ يـــوم مـــن pDSVL- CHO gHuEPO على ١٨,٢ وحدة / مل من EPO البشري كما تم قياسها باستخدام اختبار RIA.

ويمكن زيادة كمية EPO المنتجة بواسطة سلالات الخلايا الموصوفة ســـابقا عن طريق تضاعف الجين للحصول على سلالات خلايا جديدة لها انتاجية اكبر ويمكن تثبيط إنزيم ثاني هيدروفولات ريداكتاز (DHFR) الذي هو الناتج المشفر بواســـطة جين DHFR باستخدام العقار ميثوتريكسات Methotrexate (MTX) وبشكل محدد اكثر، يتم تثبيط الخلايا المتكاثرة في الوسط الذي ينقصه الهيبوزانثين والثايميدين أو قتلها باستخدام MTX وتحت الظروف المناسبة (مثل اقل تركيزات من MTX) يمكن الحصول على خلايا مقاومة وقادرة على النمو في وجود MTX وقد وجـــد ان هـــذه الخلايا تكون مقاومة لعقار MTX نتيجة لتضاعف عدد جينات DHFR مما يـــؤدي إلى زيادة انتاج انزيم DHFR ويمكن معالجة الخلايا الباقية بدورها بتركيزات متزايدة

من MTX للحصول على سلالات خلوية تحتوي على أعداد أكبر من جينات DHFR وقد وجد ان "الجينات العابرة Passenger genes" (مثل EPO) المحمولة على ناقل التعبير سويا مع جين DHFR او المتحولة بواسطة جين DHFR تزداد عادة في عدد نسخهم الجينية.

وكمثال لتجربة نظام المضاعفة هذا تم تعريض السلالة الخلوية CHO pDSVL-MkE لتركيزات متزايدة من MTX (صفر نانومولار و ٣٠ نانومولار و١٠٠ نانومولار) وتم تحليل عينات من وسط زراعة ٦٥- ساعة تمثيلي من كل خطوة تضاعف باستخدام RIA وتحديد انها تحتوي على ٠,٦٠ و ٢,٤٥ و ٦,١٠ وحدة / مل على التوالى وتم تعريض السلالة الخلوية CHO pDSVL-gHu EPO لسلسلة من تركيزات MTX متزايدة بمقدار ٣٠ نانومولار و٥٠ نانومولار و١٠٠ نانومولار و٢٠٠ نانومولار و١ ميكرومولار و٥ ميكرومولار MTX واحتوت عينة وسط زراعة ٣ ايام تمثيلي من خطوة ١٠٠ نانومولار MTX على EPO البشري عند مستوى ٣٠٨٩ ± ١٢٩ وحدة / مل كما تم تأكيده في اختبار RIA واحتوت عينات وسط زراعة ٤٨ ساعة تمثيلي من خطوات ١٠٠ نانومولار و١ ميكرو مولار MTX، على التوالى على EPO البشري عند مستوى ٤٦٦ و١٣٥٢ وحدة / مل كما تم تحديدها باختبار RIA (متوسط الاختبارات الثلاثية) وفي هذه الطرق تم وضع ١ × ١٠^{٦} خلية في طبق في ٥ مل من الوسط في أطباق زراعة ٦٠ مم وبعد ٢٤ ساعة تم إزالة الأوساط واستبدالها، بمقدار ٥ مل من وسط خالى من المصل (DMEM عالى الجلوكوز مزود بمقدار ٠,١ مل مولار أحماض امينية غير أساسية و L-glutamine) وتم ترك EPO ليتراكم لمدة ٤٨ ساعة في الوسط الخالى من المصل ثم تم تجميع الوسط للاختبار في RIA وتم إضافة التريبسين إلى الخلايا وإحصائها واعطت قيم RIA المتوسطة لكل من ٤٦٧ وحدة / مل و ١٣٥٢ وحدة / مل للخلايا النامية عند ١٠٠ مل مولار و١ ميكرومولار MTX على التوالى كميات فعلية بمقدار ٢٣٣٥ وحدة / طبقة و ٦٧٥٠ وحدة / طبقة وكان متوسط أعداد الخلايا لكل طبق ١,٩٤ × ١٠^{٦} و ٣,١٢ × ١٠^{٦} خلية على التوالى وكانت معدلات

الانتاج الفعالة لظروف الزراعة تلك هي ١٢٦٤ و ٢١٦٧ وحدة / ١٠^{٦} خليـــة / ٤٨ ساعة.

وتكون الخلايا في المزارع cultures الموصوفة مباشرة سابقا عبـــارة عـــن تجمع مخلط جينيا وتم استخدام طرق الفحص القياسية في محاولـــة لفصـــل النســـخ المتماثلة جينيا مع اعلى قدرة انتاج راجع القسم أ، الجزء ٢، من كتاب "النقاط التـــي يجب اخذها في الاعتبار عند تمييز خطوط الخلايا المستخدمة لانتاج المواد الحيويـــة "في ١ يونيو، ١٩٨٤، مكتب مراجعة الابحاث الحيوية، مركـــز العقـــاقير والمـــواد الحيوية، منظمة الغذاء والأدوية الأمريكية.

ويمكن تحسين انتاجية خطوط خلايا CHO المنتجة لـــ EPO الموصـــوفة سابقا عن طريق استخدام طرق الزراعة الخلوية المناسبة ويتطلب تكـــاثر الخلايـــا الثديية في المزرعة بشكل عام وجود المصل في وسط النمو وتسهل طريقـــة انتـــاج الأريثروبويتين من خلايا CHO في الوسط الذي لا يحتوي على المصل بشكل كبير عملية تنقية الأريثروبويتين بشكل من وسط الزراعة وتكون الطريقة الموصوفة لاحقا قادرة على انتاج الأريثروبويتين بشكل اقتصادي في وسط خالى من المصل بكميـــات كبيرة كافية للانتاج.

وتم استخدام سلالة خلايا CHO pDSVL-gHu EPO التي تنمو في ظروف زراعة الخلايا القياسية لوضع قوارير زراعة الخلايا المغزلية وتم تكاثر الخلايا على هيئة خط الخلايا معلق في قارورة زراعة الخلايا المغزلية في الأوساط التي تحتوي على ٥٠-٥٠ خليط من DMEM عالى الجلوكوز و Ham's F12 المزود بمقدار ٥ في المائة مصل جينين بقري fetal calf serum و L-glutamine والبنيسللين والستر بتومايسين Streptomycin و٠,٠٥ مل مولار احماض امينية غير أساسية والتركيز المناسب من الميثوتريكسات وتسمح زراعة المعلق الخلوي لخلايا CHO التي تنتج EPO بالاتساع بسهولة لأحجام كبيرة وتم استخدام خلايا CHO، التي تنمو في المعلق لوضع زجاجات الملف عند كثافة وضع مبدئي بمقدار ١,٥ × ١٠^{٧} خلية حيوية لكل ٨٥٠ سم^{٢} زجاجة ملف في ٢٠٠ مل من الوسط ثم تم ترك الخلايا لتنمو بشكل مجمع على هيئة خط خلايا ملتصق طوال فترة ثلاثة أيام

وكان الوسط المستخدم لهذا الطور من النمو هو نفسه المستخدم للنمو في المعلق وعند نهاية فترة النمو الممتدة ثلاثة أيام تم إزالة الوسط المحتوي على المصل ووضعه مع ١٠٠ مل من الوسط الخالى من المصل و٥٠- ٥٠ خليط من DMEMعالي الجلوكوز وHam's Fl2 المزود بمقدار ٠,٠٥ مل مولار أحماض أمينية غير أساسية وL-glutamin ثم تم إعادة زجاجات الملف إلى محضن زجاجة الملف لفترة ١-٣ ساعات وتم إزالة الوسط مرة أخرى واستبداله بمقدار ١٠٠ مل من الوسط الخالى من المصل الحديث حيث تقلل فترة التحضين لمدة ١-٣ ساعات للوسط الخالى من المصل من تركيز البروتينات المصلية الملونة ثم أعيدت زجاجات الملف إلى الحضانة لمدة ٧ أيام أثنائها تراكم الاريثروبويتين في وسط الزراعة الخالى من المصل عند نهاية طور الإنتاج لمدة ٥ أيام أزيل الوسط المكيف وتم استبداله بوسط جديد خالى من المصل لدورة إنتاج ثانية وكمثال لتجربة نظام الإنتاج هذا، احتوت عينة وسط خالى من المصل بعد ٧ أيام تمثيلي على اريثروبويتين بشري بتركيز ٣٨٩٢ ± ٤٠٩ وحدة/ مل كما تم تقديره بواسطة RIA واعتمادا على كثافة الخلايا التقديرية بمقدار ٠,٩ إلى ١,٨ × ١٠^{٥} خلية/ سم^{٢}، احتوت كل زجاجة ملف سعة ٨٥٠ سم^{٢} على ٠,٧٥ إلى ١,٥ × ١٠^{٨} خلية وبالتالى كان معدل إنتاج EPO في اليوم السابع لمزرعة ١٠٠ مل هو ٧٥٠ إلى ١٤٧٠ وحدة/ ١٠^{٦} خلية/ ٤٨ ساعة.

وتم تعريض سوائل الزراعة من السلالة الخلوية CHO pDSVL- MkEPO المنقولة في ١٠ نانومولار MTX إلى RIA في اختبارات فاعلية EPO المعملية وداخل الأحياء واحتوت عينة الوسط المكيف على ٤١,٢ ± ١,٤ وحدة/ مل من MkEPO كما تم قياسها بواسطة RIA و٤١,٢ ± ٠,٠٦٤ وحدة/ مل كما تم قياسها بواسطة اختبار الفاعلية الحيوية في الأحياء وأظهر تتابع الحمض الأميني لنواتج عديد الببتيد وجود نواتج EPO وهو نوع أساس به ٣ شقوق من تتابع "الدليل" المجاور للألانين الطرفي الأميني المفترض وسواء كان ذلك نتيجة للمعالجة غير الصحيحة للغشاء لعديد الببتيد في خلايا CHO أو يعكس اختلاف في تركيب الطرف الأميني في EPO القرود بالمقارنة مع EPO البشري فما يزال ذلك غير معروف في الوقت الحالى.

وتم تعريض سوائل الزراعة من السلالة الخلوية CHO pDSVL- gHuEPO الاختبارات الثلاثة حيث احتوت عينة ٥,٥ يوم على EPO البشري معاد الاتحاد في الوسط عند مستوى ١٨,٢ وحدة/ مل باختبار RIA و ١٥,٨ ± ٤,٦ وحدة/ مل بالاختبار المعملي و ١٦,٨ ± ٣ وحدة/ مل بالاختبار في الأحياء.

وتم تعريض سائل الزراعة من خلايا CHO pDSVL- gHuEPO المحضرة بالتضاعف على خطوات باستخدام ١٠٠ نانومولار MTX للاختبارات الثلاثة واحتوت عينة ٣ ايام على EPO البشري معاد الاتحاد عند مستوى ٣٠٨٩ ± ١٢٩ وحدة/ مل باختبار RIA و٢٥٨٩ ± ٧١,٥ وحدة/ مل بالاختبار المعملي و٢٠٤٠ ± ١٦٠ وحدة/ مل بالاختبار في الأحياء وأظهر تتابع الحمض الأميني لهذا المنتج طرف أميني يناظر ذلك الموضع في جدول ٦.

وتم سحب الوسط المكيف الخلوي من خلايا CHO المطعمة بالبلازميد pDSVL- MkE في ١٠ نانو مولار MTX وتم ديلزة MTX لعدة أيام مما أدى إلى الحصول على وسط لـــه فاعلية EPO بمقدار ٢٢١ ± ٥,١ وحدة/ مل (EPO- CCM) ولتحديد التأثير المعملي لمركب EPO- CCM على مستويات صورة الدم في فئران Balb/ C الطبيعية فإنه تم إجراء التجربة التالية حيث تم ضبط الوسط المكيف الخلوي من خلايا CHO غير مطعمة (CCM) وEPO- CCM باستخدام PBS . وتم استخدام CCM للمجموعة المرجعية (٣ فئران) ومستويين للجرعات من EPO- CCM- ٤ وحدات لكل حقنة و٤٤ وحدة لكل حقنة- للمجموعات التجريبية (فأرين/ مجموعة) وطوال فترة ٥ أسابيع تم حقن الفئران السبعة داخل الغشاء البيرتوني intraperitoneally ٣ مرات في الأسبوع وبعد الحقنة الثامنة تم تحديد متوسط قيم صورة الدم للمجموعة المرجعية بمقدار ٥٠,٤ في المائة ولمجموعة ٤ وحدات ٥٥,١ في المائة ولمجموعة ٤٤ وحدة ٦٧,٩ في المائة.

ويمكن استعادة نواتج التعبير الخلوي الثديي بسهولة في شكل نقي من وسط الزراعة باستخدام HPLC (C_4) باستخدام تدرج من الايثانول ويفضل عند أس هيدروجيني مقداره ٧.

وتم إجراء محاولات أساسية لتمييز نواتج الجليكوبروتين معاد الاتحاد عن الوسط المكيف للتعبير عن خلايا COS-1 وCHO لجين EPO البشري بالمقارنة مع EPO البولي البشري المفصـــول باســـتخدام كـــلا من تحليل Western blot وSDS-PAGE وتشير هذه الدراسات إلى أن المادة EPO المنتجة لـــ CHO وزن جزيئي مرتفع نوعا ما عن ناتج التعبير COS-1 الذي بدوره كان أكبر قليلا عن المستخلص البولي البشري للمصدر المسحوب وكانت كل النواتج نوعا ما مخلطة وأدت المعالجة بإنزيم الامينيداز العصبي Neuraminidase enzyme لإزالة حمض السياليك sialic acid إلى الحصول على نواتج COS-1 وCHO معاد الاتحاد لها وزن جزيئي متساوي تقريبا التي لم يكن أي منهما أكبر من المستخلص البولي البشري الاسيالو الناتج وأدق المعالجة بإنزيم الاندوجليكوسيداز إف Endoglycosidase F enzyme (EC 3.2.1) لناتج CHO معاد الاتحاد والناتج من المستخلص البولي (لإزالة الكربوهيدرات كلية من كلاهما) إلى نواتج متماثلة بشكل أساسي لها خواص وزن جزيئي متطابقة بشكل أساسي.

وتكون نواتج الجلايكوبروتين التي يعطيها هذا الاختراع شاملة النواتج التي لها وضع نسبي تركيبي أولي مزدوج بدرجة كافية عن تلك الاريثروبويتين الموجود في الطبيعة للسماح بالحصول على واحدة أو اكثر من الخواص الحيوية لها ولها تركيبة كربوهيدرات متوسطة تختلف عن تلك الايثروبويتين الموجود في الطبيعة.

المثال ١١

يتعلق هذا المثال بالتصنيع الكلي عن طريق تركيب قواعد النيوكليوتيد لإثنين من الجينات التركيبية التي تشفر تتابع EPO البشري في الشكل ٦ وتتضمن على التوالى مستنسخات "مفضلة" للتعبير في خلايا E. coli والخميرة (س. سيريفيزياي S.cerevisiae) وتم أيضا وصف بناء الجينات التي تشفر مماثلات EPO البشري وباختصار، كان المنهج المستخدم بشكل عام كما تم توضيحه في الوصف الكتابي المشار اليه سابقا باسم Alton وزملائه (براءة الاختراع الدولية رقم ٨٣/٤٠٥٣) وتم تصميم الجينات للتركيب المبدئي للأوليجو نيوكليوتيدات التركيبية داخل مزدوجات متعددة التي بدورها تم تركيبها داخل أجزاء متفرقة ثلاثة وتم تصميم هذه الأجزاء

للتضاعف السهل وبعد إزالة نظام التضاعف يمكن تركيبها على التوالى أو من خلال ربط جزء متعدد في ناقل التعبير المناسب.

وتوضح الجداول من ٨ حتى ١٤ الآتيه تصميم وتركيب الجين المصنع الذي يشفر ناتج ترجمة EPO البشري الذي ينقصه أي دليل أو تتابع مسبق ولكن يشمل شق ميثيونين methionine residue مبدئي عند الموضع-١. وعلاوة على ذلك، تمت الإشارة إلى الجين المدخل في المشفرات المفضلة في E.coil في جزء أساسي وتمت الإشارة إلى البناء بالتالى باسم جين "ECEPO".

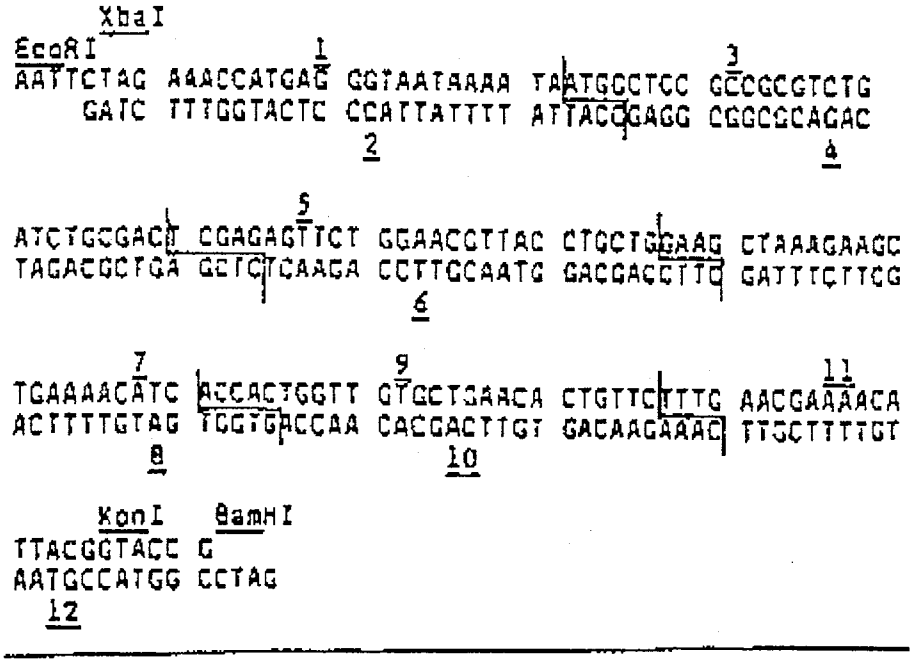
جدول ٨

قسم ECEPO ١ اوليجونيوكليوتيدات

1.	AATTCTAGAAACCATGAGGGTAATAAAATA
2.	CCATTATTTTATTACCCTCATGGTTTCTAG
3.	ATGGCTCCGCCGCGTCTGATCTGCGAC
4.	CTCGAGTCGCAGATCAGACGCGGCGGAG
5.	TCGAGAGTTCTGGAACGTTACCTGCTG
6.	CTTCCAGCAGGTAACGTTCCAGAACT
7.	GAAGCTAAAGAAGCTGAAAACATC
8.	GTGGTGATGTTTTCAGCTTCTTTAG
9.	ACCACTGGTTGTGCTGAACACTGTTC
10.	CAAAGAACAGTGTTCAGCACAACCA
11.	TTTGAACGAAAACATTACGGTACCG
12.	GATCCGGTACCGTAATGTTTTCGTT

جدول ٩

قسم ECEPO ١



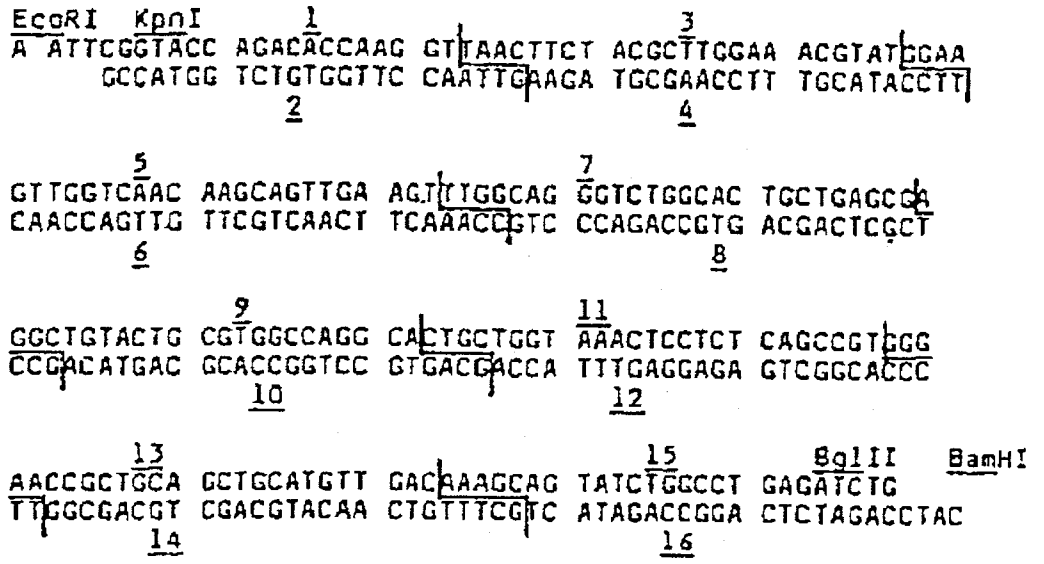
جدول ١٠

قسم ECEPO ٢ اوليجونيوكليوتيدات

1.	AATTCGGTACCAGACACCAAGGT
2.	GTTAACCTTGGTGTCTGGTACCG
3.	TAACTTCTACGCTTGGAAACGTAT
4.	TTCCATACGTTTCCAAGCGTAGAA
5.	GGAAGTTGGTCAACAAGCAGTTGAAGT
6.	CCAAACTTCAACTGCTTGTTGACCAAC
7.	TTGGCAGGGTCTGGCACTGCTGAGCG
8.	GCCTCGCTCAGCAGTGCCAGACCCTG
9.	AGGCTGTACTGCGTGGCCAGGCA
10.	GCAGTGCCTGGCCACGCAGTACA
11.	CTGCTGGTAAACTCCTCTCAGCCGT
12.	TTCCCACGGCTGAGAGGAGTTTACCA
13.	GGGAACCGCTGCAGCTGCATGTTGAC
14.	GCTTTGTCAACATGCAGCTGCAGCGG
15.	AAAGCAGTATCTGGCCTGAGATCTG
16.	GATCCAGATCTCAGGCCAGATACT

جدول ١١

قسم ECEPO ٢



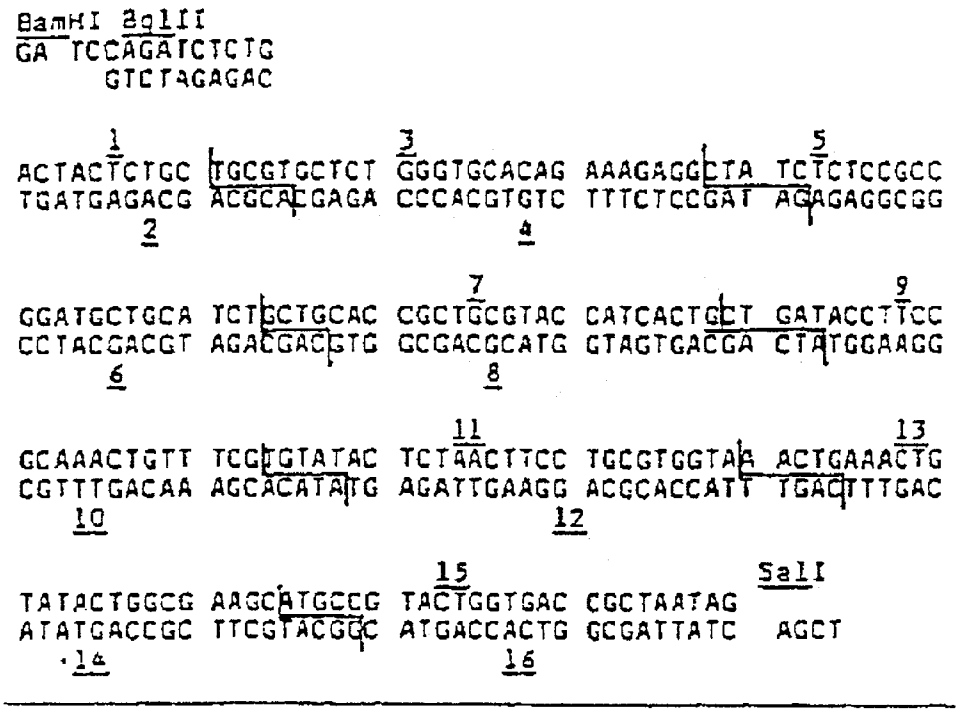
جدول ١٢

قسم ECEPO ٢

1.	GATCCAGATCTCTGACTACTCTGC
2.	ACGCAGCAGAGTAGTCAGAGATCTG
3.	TGCGTGCTCTGGGTGCACAGAAAGAGG
4.	GATAGCCTCTTTCTGTGCACCCAGAGC
5.	CTATCTCTCCGCCGGATGCTGCATCT
6.	CAGCAGATGCAGCATCCGGCGGAGA
7.	GCTGCACCGCTGCGTACCATCACTG
8.	ATCAGCAGTGATGGTACGCAGCGGTG
9.	CTGATACCTTCCGCAAACTGTTTCG
10.	ATACACGAAACAGTTTGCGGAAGGT
11.	TGTATACTCTAACTTCCTGCGTGGTA
12.	CAGTTTACCACGCAGGAAGTTAGAGT
13.	AACTGAAACTGTATACTGGCGAAGC
14.	GGCATGCTTCGCCAGTATACAGTTT
15.	ATGCCGTACTGGTGACCGCTAATAG
16.	TCGACTATTAGCGGTCACCAGTAC

جدول ١٣

قسم ECEPO ٢



جدول ١٤

ECEPO GENE

```
                                        -1  1
                                        Met Ala
      XbaI                                
CTAG AAACCATGAG GGTAATAAAA TAATGGCTCC GCCGCGTCTG
     TTTGGTACTC CCATTATTTT ATTACCGAGG CGGCGCAGAC

ATCTGCGACT CGAGAGTTCT GGAACGTTAC CTGCTGGAAG CTAAAGAAGC
TAGACGCTGA GCTCTCAAGA CCTTGCAATG GACGACCTTC GATTTCTTCG

TGAAAACATC ACCACTGGTT GTGCTGAACA CTGTTCTTTG AACGAAAACA
ACTTTTGTAG TGGTGACCAA CACGACTTGT GACAAGAAAC TTGCTTTTGT

TTACGGTACC AGACACCAAG GTTAACTTCT ACGCTTGGAA ACGTATGGAA
AATGCCATGG TCTGTGGTTC CAATTGAAGA TGCGAACCTT TGCATACCTT

GTTGGTCAAC AAGCAGTTGA AGTTTGGCAG GGTCTGGCAC TGCTGAGCGA
CAACCAGTTG TTCGTCAACT TCAAACCGTC CCAGACCGTG ACGACTCGCT

GGCTGTACTG CGTGGCCAGG CACTGCTGGT AAACTCCTCT CAGCCGTGGG
CCGACATGAC GCACCGGTCC GTGACGACCA TTTGAGGAGA GTCGGCACCC

AACCGCTGCA GCTGCATGTT GACAAAGCAG TATCTGGCCT GAGATCTCTG
TTGGCGACGT CGACGTACAA CTGTTTCGTC ATAGACCGGA CTCTAGAGAC

ACTACTCTGC TGCGTGCTCT GGGTGCACAG AAAGAGGCTA TCTCTCCGCC
TGATGAGACG ACGCACGAGA CCCACGTGTC TTTCTCCGAT AGAGAGGCGG

GGATGCTGCA TCTGCTGCAC CGCTGCGTAC CATCACTGCT GATACCTTCC
CCTACGACGT AGACGACGTG GCGACGCATG GTAGTGACGA CTATGGAAGG

GCAAACTGTT TCGTGTATAC TCTAACTTCC TGCGTGGTAA ACTGAAACTG
CGTTTGACAA AGCACATATG AGATTGAAGG ACGCACCATT TGACTTTGAC

                                        SalI
TATACTGGCG AAGCATGCCG TACTGGTGAC CGCTAATAG
ATATGACCGC TTCGTACGGC ATGACCACTG GCGATTATCA GCT
```

وبشكل محدد أكثر، يوضح الجدول ٨ الاوليجو نيوكليوتيدات المستخدمة للحصول على الجزء ١ من جين ECEPO الذي يشفر الشقوق الأمينية الطرفية لعديد الببتيد البشري وتم تركيب الاوليجو نيوكليوتيدات داخل المزدوجات (١ و٢ و٣ و٤، الخ) ثم تم ربط المزدوجات للحصول على الجزء ١ ECEPO كما في الشكل ١١

ويجب أن نلاحظ أن الجزء المجمع يشمل أطراف EcoRI وBamHI اللزجة الطرفية المناظرة التي "أسفل" الطرف EcoRI اللزجة عبارة عن موقع تمييز إنزيم الحصر XbaI وتلك "أعلى" الطرف اللزج BamHI عبارة عن موقع تمييز KpnI ويمكن مضاعفة الجزء I بسهولة باستخدام ناقل الخلايا الأكلة M13 المستخدمة للتحقق من تتابع الجزء وتم حدوث بعض الصعوبات عند فصل الجزء على هيئة جزء XbaI/ KpnI من RF DNA المتكونة في E. coli، بشكل محتمل نتيجة لإضافة المثيل إلى قواعد موقع تمييز KpnI داخل العائل وتم بالتالى فصل DNA الخلايا الآكلة فردية الخلايا وجعلها في شكل خيوط ثنائية معمليا باستخدام الامتداد الأساسي ثم بعد ذلك تم فصل الجزء مزدوج الخيوط المطلوب بسهولة.

وتم بناء الأجزاء ٢ و٣ في جين ECEPO (الجداول ١١ إلى ١٣) بطريقة مماثلة من الاوليجو نيوكليوتيدات في الأشكال ١٢ و١٤ على التوالى ثم تم مضاعفة كل جزء في ناقل M13 المستخدم للتحقق من التتابع ثم تم فصله عن DNA الخلايا الآكلة وكما هو واضح من الشكل ١٣ تم بناء الجزء ٢ في ECEPO باستخدام EcoRI وBamHI الأطراف اللزجة ويمكن فصله على هيئة جزء KpnI/ BgIII وبالمثل تم تحضير الجزء ٣ في ECEPO باستخدام أطراف BamHI وsaII اللزجة ويمكن فصله من RF DNA الخلايا الآكلة على هيئة جزء BgIII/ SaII ثم تم تركيب الأجزاء الثلاثة المحضرة بسهولة داخل تتابع DNA مستمر (الجدول ١٤) التي تشفر عديد ببتيد Epo البشري الكامل باستخدام مشفر ميثيونين طرفي أميني (ATG) لتنشيط بدء فك شفرة E. coli ولاحظ أيضا أنه "أعلى" ATG المبدئي توجد سلسلة من أزواج القاعدة التي تضاعف بشكل أساسي تتابع موقع ارتباط الريبوسوم في جين OMP-f المعبر عنه بدرجة كبيرة للايشيرشيا كولاي E. coli.

ويمكن استخدام أي ناقل تعبير مناسب لنقل ECEPO وكان الناقل المحدد المختار للتعبير عن جين ECEPO هو البلازميد "الحساس لدرجة الحرارة" pCFM536- وهو مشتق من البلازميد pCFM414 (A.T.C.C ٤٠٠٧٦)- كما هو موصوف في طلب براءة الاختراع الأمريكية المعلق رقم ٦٣٦٧٢٧ المودع في ٦ أغسطس ١٩٨٤ باسم Charles F. Morris وبشكل محدد أكثر، تم هضم

pCFM536 باستخدام XbaI وHindIII وتم فصل الجزء الكبير واستخدامه في عملية ربط من جزئين باستخدام جين ECEPO وتم تركيب الأجزاء ١ (XbaI/ KpnI) و٢ (KpnI/ BgIII) و٣ (BgIII/ SaII) مسبقا في الترتيب الصحيح داخل M13 وتم فصل جين EPO منهم على هيئة جزء XbaI/ HindIII فردي وأحتوى هذا الجزء من جزء من الرابط المتعدد من الخلايا الآكلة M13 mp9 الذي يمتد بين مواقع SaII حتى HindIII وتم التحكم في التعبير عن البلازميد المعبر الناتج p536 باستخدام محفز Lambda P_L Promoter الذي هو نفسه قد يكون تحت تحكم جين كابح C_{1857} (مثل تلك الذي تعطيه سلالة E. coli K12ΔHtrp).

ويمكن تعديل جين ECEPO المصنع السابق بشكل متعدد لتشفير مماثلات الاريثربويتين مثل [Asn^2, des- Pro^2 through Ile^6]hEPO وَ [His^7]]hEPO كما هو موصوف سابقا.

أ- [Asn^2, des Pro^2 through Ile^6]hEPO

تم تصنيع البلازميد ٥٣٦ الذي يحمل جين ECEPO المصنع في الجدول ١٤على هيئة مدخل XbaI الى HindIII باستخدام HindIII وXhoI حيث يقطع الاندونيوكلياز الأخير جين ECEPO عند موقع تمييز زوج القاعدة ٦ الفريد الممتد للقاعدة الأخيرة في المشفر الذي يشفر Asp^8 حتى القاعدة الثانية في مشفر Arg^{10} وتم تصنيع تتابع "رابط" XbaI /XhoI الذي له التتابع التالى:

XbaI +1 2 7 8 9

Met Ala Asn Cys Asp xhoI

5`- CTAG ATG GCT AAT TGC GAC-3`

3`- TAC CGA TTA ACG CTG AGCT-5`

وتم إدخال التتابعات الجينية لهرمون ECEPO الرابطة Xbal /Xhol و Xhol /HindIII في القطعة الكبيرة الناتجة من هضم البلازميد pCFM526 وهو مشتق من البلازميد pCFM414 (A.T.C.C ٤٠٠٧٦)-كما هو موضح في طلب البراءة الأمريكية المعلقة برقم مسلسل ٧٢٧، ٦٣٦، المودع في ٦ أغسطس ١٩٨٤ باسم Charles F. Morris للحصول على تتابع DNA ناتج من البلازميد يحمل شفرة انتاج الصورة Met^{-1} من المماثل المطلوب في E. coli.

ب- [His^7]hEPO

تم هضم البلازميد ٥٣٦ بواسطة HindIII وXhoI كما في الجزء (أ) السابق. وتم تصنيع الرابطة XbaI / XhoI ذات التتابع التالى:

XbaI +1 2 3 4 5 6 7 8 9 XhoI

Met Ala Pro Pro Arg Leu Ile His Asp ٥

5`- CTAG ATG GCT CCG CCA GGT CTG ATC CAT GAC-3`

3`- TAC CGA GGC GGT GGT GCA GAC TAG GTA CTG AGCT-5`

ثم تم إدخال الرابطة وقطعة التتابع ECEPO XhoI /HindIII في pCFM526 للحصول على تتابع DNA ناتج من البلازميد الذي يحمل شفرة انتاج Met^{-1} من المماثل المطلوب في E. coli.

وتركيب الجين المصنع (SCEPO) الذي يحمل كودونات التفاضل في الخميرة هو كما سبق الوصف في الجداول من ١٥ الى ٢١. وكما هو الحال مع جين ECEPO، ويتضمن التركيب الكلي تكوين ثلاثة مجموعات من أوليجونيوكليوتيدات (الجداول ١٥، ١٧ و١٩) والتي تكونت في صورة أزواج وتم تجميعها في أقسام (الجداول ١٦، ١٨ و٢٠). وتجب ملاحظة أن التخليق تم تسهيله جزئياً باستخدام بعض الكودونات أقل من الأفضل في كلاً من التكوينات SCEPO و ECEPO ، أي أوليجونيوكليوتيدات ٧-١٢ من القسم ١ من كلاً من الجينين متطابقين، كما كانت أوليجونيوكليوتيدات ١-٦ من القسم ٢ في كل جين.

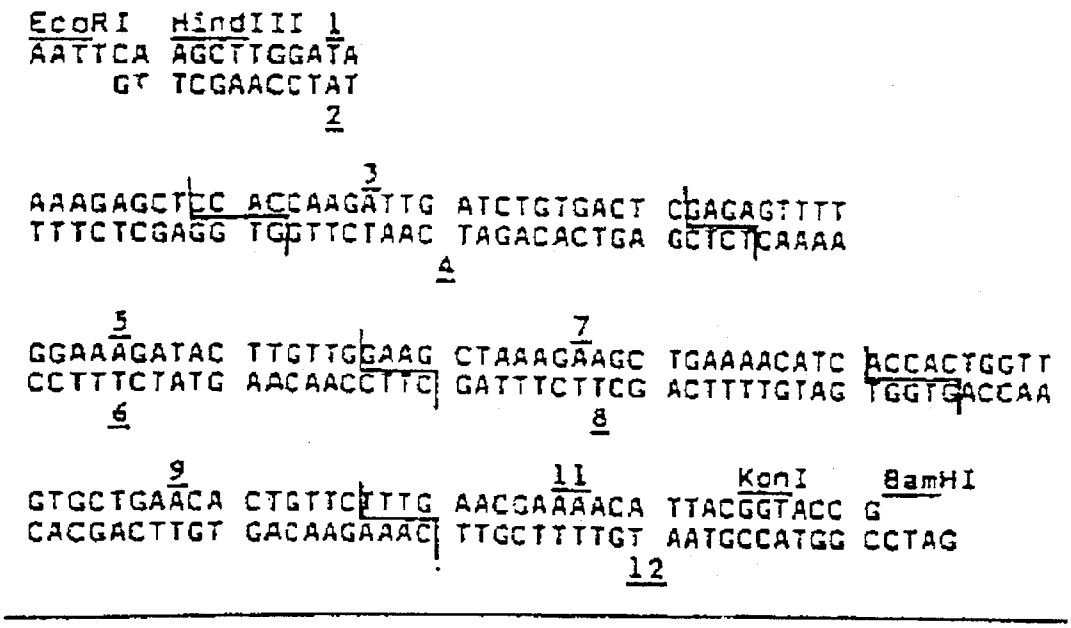
جدول ١٥

قسم SCEPO ١ اوليجونيوكليوتيدات

1.	AATTCAAGCTTGGATAAAAGAGCT
2.	GTGGAGCTCTTTTATCCAAGCTTG
3.	CCACCAAGATTGATCTGTGACTC
4.	TCTCGAGTCACAGATCAATCTTG
5.	GAGAGTTTTGGAAAGATACTTGTTG
6.	CTTCCAACAAGTATCTTTCCAAAAC
7.	GAAGCTAAAGAAGCTGAAAACATC
8.	GTGGTGATGTTTTCAGCTTCTTTAG
9.	ACCACTGGTTGTGCTGAACACTGTTC
10.	CAAAGAACAGTGTTCAGCACAACCA
11.	TTTGAACGAAAACATTACGGTACCG
12.	GATCCGGTACCGTAATGTTTTCGTT

جدول ١٦

قسم SCEPO ١



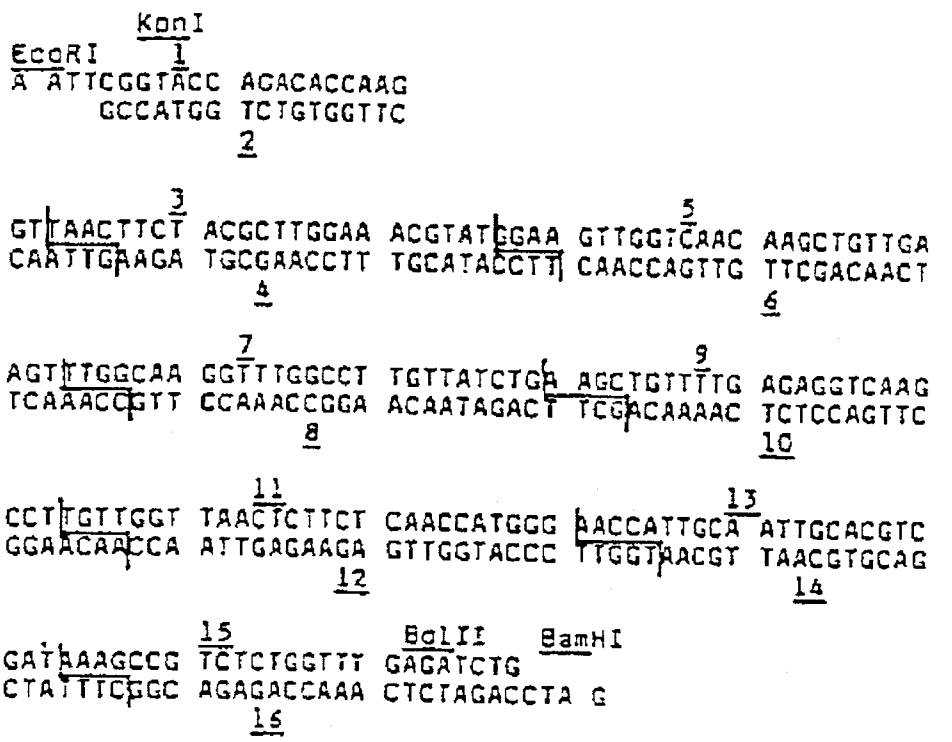
جدول ١٧

قسم SCEPO ٢ اوليجونيوكليوتيدات

1.	AATTCGGTACCAGACACCAAGGT
2.	GTTAACCTTGGTGTCTGGTACCG
3.	TAACTTCTACGCTTGGAAACGTAT
4.	TTCCATACGTTTCCAAGCGTAGAA
5.	GGAAGTTGGTCAACAAGCAGTTGAAGT
6.	CCAAACTTCAACTGCTTGTTGACCAAC
7.	TTGGCAAGGTTTGGCCTTGTTATCTG
8.	GCTTCAGATAACAAGGCCAAACCTTG
9.	AAGCTGTTTTGAGAGGTCAAGCCT
10.	AACAAGGCTTGACCTCTCAAAACA
11.	TGTTGGTTAACTCTTCTCAACCATGGG
12.	TGGTTCCCATGGTTGAGAAGAGTTAACC
13.	AACCATTGCAATTGCACGTCGAT
14.	CTTTATCGACGTGCAATTGCAA
15.	AAAGCCGTCTCTGGTTTGAGATCTG
16.	GATCCAGATCTCAAACCAGAGACGG

جدول ١٨

قسم SCEPO ٢



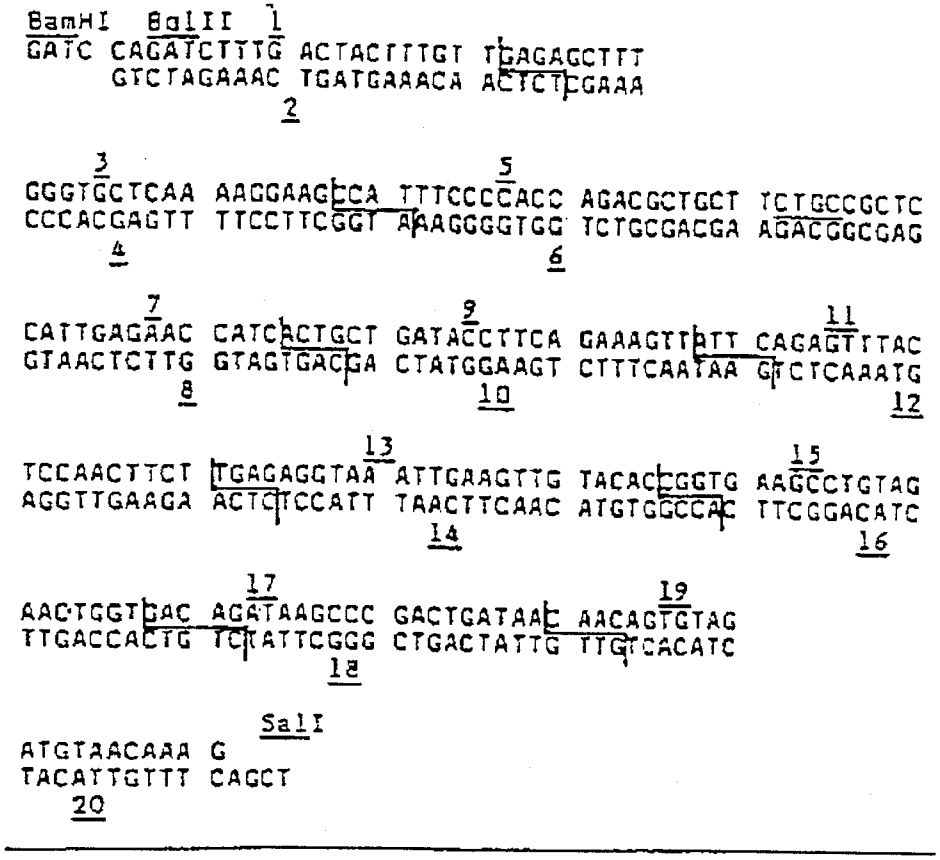
جدول ١٩

قسم SCEPO ٣ اوليجونيوكليوتيدات

1.	GATCCAGATCTTTGACTACTTTGTT
2.	TCTCAACAAAGTAGTCAAAGATCTG
3.	GAGAGCTTTGGGTGCTCAAAAGGAAG
4.	ATGGCTTCCTTTTGAGCACCCAAAGC
5.	CCATTTCCCCACCAGACGCTGCTT
6.	GCAGAAGCAGCGTCTGGTGGGGAA
7.	CTGCCGCTCCATTGAGAACCATC
8.	CAGTGATGGTTCTCAATGGAGCG
9.	ACTGCTGATACCTTCAGAAAGTT
10.	GAATAACTTTCTGAAGGTATCAG
11.	ATTCAGAGTTTACTCCAACTTCT
12.	CTCAAGAAGTTGGAGTAAACTCT
13.	TGAGAGGTAAATTGAAGTTGTACAC
14.	ACCGGTGTACAACTTCAATTTACCT
15.	CGGTGAAGCCTGTAGAACTGGT
16.	CTGTCACCAGTTCTACAGGCTTC
17.	GACAGATAAGCCCGACTGATAA
18.	GTTGTTATCAGTCGGGCTTAT
19.	CAACAGTGTAGATGTAACAAAG
20.	TCGACTTTGTTACATCTACACT

جدول ٢٠

قسم SCEPO ٣



جدول ٢١

```
                -1 +1
HindIII         ArgAla
AGCTTGGATA AAAGAGCTCC ACCAAGATTG ATCTGTGACT CGAGAGTTTT
    ACCTAT TTTCTCGAGG TGGTTCTAAC TAGACACTGA GCTCTCAAAA

GGAAAGATAC TTGTTGGAAG CTAAAGAAGC TGAAAACATC ACCACTGGTT
CCTTTCTATG AACAACCTTC GATTTCTTCG ACTTTTGTAG TGGTGACCAA

GTGCTGAACA CTGTTCTTTG AACGAAAACA TTACGGTACC AGACACCAAG
CACGACTTGT GACAAGAAAC TTGCTTTTGT AATGCCATGG TCTGTGGTTC

GTTAACTTCT ACGCTTGGAA ACGTATGGAA GTTGGTCAAC AAGCTGTTGA
CAATTGAAGA TGCGAACCTT TGCATACCTT CAACCAGTTG TTCGACAACT

AGTTTGGCAA GGTTTGGCCT TGTTATCTGA AGCTGTTTTG AGAGGTCAAG
TCAAACCGTT CCAAACCGGA ACAATAGACT TCGACAAAAC TCTCCAGTTC

CCTTGTTGGT TAACTCTTCT CAACCATGGG AACCATTGCA ATTGCACGTC
GGAACAACCA ATTGAGAAGA GTTGGTACCC TTGGTAACGT TAACGTGCAG

GATAAAGCCG TCTCTGGTTT GAGATCTTTG ACTACTTTGT TGAGAGCTTT
CTATTTCGGC AGAGACCAAA CTCTAGAAAC TGATGAAACA ACTCTCGAAA

GGGTGCTCAA AAGGAAGCCA TTTCCCCACC AGACGCTGCT TCTGCCGCTC
CCCACGAGTT TTCCTTCGGT AAAGGGGTGG TCTGCGACGA AGACGGCGAG

CATTGAGAAC CATCACTGCT GATACCTTCA GAAAGTTATT CAGAGTTTAC
GTAACTCTTG GTAGTGACGA CTATGGAAGT CTTTCAATAA GTCTCAAATG

TCCAACTTCT TGAGAGGTAA ATTGAAGTTG TACACCGGTG AAGCCTGTAG
AGGTTGAAGA ACTCTCCATT TAACTTCAAC ATGTGGCCAC TTCGGACATC

AACTGGTGAC AGATAAGCCC GACTGATAAC AACAGTGTAG
TTGACCACTG TCTATTCGGG CTGACTATTG TTGTCACATC

            SalI
ATGTAACAAA G
TACATTGTTT CAGCT
```

وتم تسلسل أقسام SCEPO المتجمعة في M13 وكانت الأقسام ١، ٢ و٣ قابلة للفصل من الخلية الأكولة مثل قطع HindIII/ KpnI/ BGIII ، و BGIII/ SaII.

ونظام انتاج نواتج جين SCEPO المفضل حالياً هو نظام إفرازي مبني على إفراز عامل ألفا من إس. سيريفيسيا S.cerevisiae ، كما هو موضح في طلب البراءة الأمريكية المعلقة برقم ٤٨٧٧٥٣ المودع في ٢٢ ابريل ١٩٨٣، باسم Grant A. Bitter، المنشور في ٣١ أكتوبر ١٩٨٤ باسم طلب البراءة الاوروبية ١٢٣٢٩٤ وباختصار يتضمن النظام تكوينات فيها يوجد DNA الذي يحمل شفرة التتابع القائد من ناتج جين العائل ألفا في الخميرة، مباشرة في الموقع ٥ بالنسبة لمنطقة الشفرة في الجين الخارجي الذي يتم انتاجه. ونتيجة لذلك، فإن ناتج الجين المترجم يتضمن تتابع قائد أو فردي والذي يتم "التخلص منه processed off" بواسطة إنزيم خميرة داخلي أثناء مسار الإفراز لباقي الناتج. ونتيجة لأن التكوين يسمح باستخدام كودون بدء ترجمة العامل الفا (ATG)، فلم تكون هناك حاجة لتوفير هذا الكودون عند الموقع -١ من جين SCEPO. وكما سيتضح من الشكل ٨، التتابع الذي يحمل شفرة الأنين (+١) يكون مسبوقاً بتتابع رابط يسمح بالادخال المباشر في بلازميد يشتمل على DNA لأول ٨٠ شق من قائد العامل ألفا يتبع محفز العامل الفا. وتضمن التكوين المحدد المفضل لإنتاج جين SCEPO، ربط رباعي الأجزاء يشتمل على قطع قسم SCEPO السابقة الذكر وقطعة كبيرة من هضم HindIII/ SaII للبلازميد paC3. ومن البلازميد الناتج paC3/ SCEPO ، تم فصل تتابع قائد ومحفز العامل α وجين SCEPO بالهضم بواسطة BamHI وربطها في بلازميد pYE تم هضمه بواسطة BamHI لتكوين بلازميد الانتاج pYE/ SCEPO

المثال ١٢

يتعلق هذا المثال بإنتاج نواتج استنساخ من جينات ECEPO وSCEPO من أنظمة الانتاج للمثال ١١.

وعندما استخدم نظام إنتاج مصمم للاستخدام في خلايا عائل E.coli، تم تحويل البلازميد p536 من المثال ١١ إلى خلايا E.coli AM7 المحولة مسبقاً ببلازميد مناسب، pMW1 ، به جين C_{1857}. وتم الحفاظ على مزرعة الخلايا في

مرق LB (٥٠ ميكروجم/ مل من أمبسيللين و٥ ميكرو جم/ مل من كاناميسين Kanamycin ، ويفضل مع ١٠ مللى مول من $MgSO_4$) فى درجة ٢٨°م وعند نمو الخلايا فى المزرعة حتى O. D. 600 تساوي ٠,١، تم حث انتاج EPO برفع حرارة المزرعة الى ٤٢°م . وزرعت الخلايا حتى حوالي O.D. 40 لاعطاء انتاج EPO (كما يتم تقديره بواسطة gel) حوالي ٥ مجم/ لتر من OD.

وتم جمع الخلايا، تحليلها، وتكسيرها بواسطة French Press (مكبس فرنسي يقوم ١٠,٠٠٠ رطل/ بوصة$^{-٢}$) وعولجت بواسطة ليسوزايم lysozyme ومنظف NP-40. وتمت إذابة الجينية pellet الناتجة عن الطرد المركزي ٢٤,٠٠٠ x جم بواسطة guanidine HCl وتعريضها لتنقية أخرى من خطوة واحدة من طريق. HPLC (كروماتوجرافيا السائل عالية الاداء) ذات طور C4 (Vydac) العكسي (ETOH، صفر –٨٠، ٥٠مللى مول من NH4Ac، الأس الهيدروجيني ٤,٥). واظهر تتابع البروتين ان الناتج بنسبة نقاء اكبر من ٩٥ في المائة واظهرت النتائج التى تم الحصول عليها طرفين امينيين مختلفين، A-P-P-R و P-P-R بنسبة كمية حوالي ٣: ١. وهذه الملاحظة الأخيرة لنواتج hEPO وhEPO [des Ala^{1}] تشير الى ان "تشغيل processing" النهاية الامينية فى خلايا العائل تعمل على إزالة الميثونين الطرفى وفى بعض الحالات الأنين المبدئي. وكان النشاط بالتحليل المناعي المشع لنواتج الفصل عند مستوى ١٥٠,٠٠٠ الى ١٦٠,٠٠٠ وحدة/ مجم، وكان تحليل النشاط المعملي هو ٣٠,٠٠٠ الى ٦٢,٠٠٠ وحدة/ مجم، ويتراوح تحليل النشاط داخل الجسم من حوالي ١٢٠ الى ٧٢٠ وحدة / مجم، (بالمقارنة مع، ناتج فصل البول البشري القياسي حوالي ٧٠,٠٠٠ وحدة/ مجم فى كل تحليل). واختلف منحنى الاستجابة للجرعة للناتج المستنسخ فى التحليل داخل الجسم بشكل كبير عن ذلك الخاص بقياس EPO البولي البشري.

وتم تحويل كل من بلازميدات مماثل EPO المتكونة فى الجزئين (أ) و (ب) من المثال ١١ فى خلايا E. coli AM7 محولة بواسطة pMW1 وزرعت الخلايا كما سبق. وتم اختيار نواتج الفصل النقية فى كل من تحاليل RIA و RIA المعملية وكانت نتائج التحليل المعملي لنواتج نتائج hEPO [Asn^{2},des-Pro^{2} through Ile^{6}]

حوالي ١١,٠٠٠ وحدة/ مجم و٦,٠٠٠ وحدة/ مجم من البروتين على الترتيب، بينما كانت نتائج التحليل لنواتج h EPO [His^7] حوالي ٤١,٠٠ وحدة/ مجم و١٤,٠٠٠ وحدة/ مجم من البروتين على الترتيب مما يشير الى أن نواتج المماثل كانت ربع أو عشر ناتج الانتاج "الأم" في التحاليل.

وفي نظام الانتاج المصمم للاستخدام خلايا عائل إس. يريفيزيا S.cerevisiae، تم تحويل البلازميد pYE / SCEPO في عائلتين مختلفتين، YSDP4 (genotype a pep4-3 trpl) و RK81 (genotype aa pep4-3 trpl). وزرعت خلايا العائل YSDP4 المتحولة في وسط SD (Methods in Yeast Genetics، معامل Cold Spring Harbor، كولد سبرنج هاربور، نيويورك، صفحة ٦٢ (١٩٩٨٣)) مزودة بأحماض كازامينو casamino بنسبة ٠,٥ في المائة، وأس هيدروجين ٦,٥ في درجة ٣٠°م. وتم جمع الوسط عندما زرعت الخلايا حتى ٣٦ O.D محتوية على نواتج EPO بمستويات حوالي ٢٤٤ وحدة/ مل (٩٧ ميكروجم / لتر OD بواسطة RIA). وأعطت خلايا RK81 المتحولة المزروعة حتى ٦,٥ O.D أو ٦٠ O.D، وسط بتركيزات EPO حوالي ٨٠-٩٠ وحدة/ مل (٣٤ ميكروجم/ لتر O.D بواسطة RIA). وأظهرت التحالي المبدئية اختلافاً كبيراً في نواتج الانتاج بواسطة أنظمة الانتاج، وهذا يرجع بشكل محتمل الى التنوع في المعالجة الجلايكوزيلية glycosylation للبروتينات الناتجة، وغالباً المحتوى العالي من المانوز mannose من الكربوهيدرات المصاحبة.

وتم إيداع بلازميدات PαC3 و pYE في خلايا HB101 E. coli طبقاً لقواعد ممارسة مكتب البراءات الأمريكية في ٢٧ سبتمبر ١٩٨٤، مع American Type Culture Collection، 12301 Parklawn Drive، Rockville، Md.، بأرقام إيداع AT.C.C ٣٩٨٨١ و AT.C.C ٣٩٨٨٢ على الترتيب. وتم بنفس الطريقة إيداع البلازميدات pCFN526 في خلايا AM7، pCFM536 في خلايا JM103، و pMW1 في خلايا JM103 في ٢١ نوفمبر ١٩٨٤ على أنها ٣٩٩٣٤، ٣٩٩٣٣، ٣٩٩٣٢ AT. C. C. ، على الترتيب. وتم

ايداع سلالات سكارواميسيز سيريفيزيا YSPD4 S.cerevisiae و RK81 في ٢١ نوفمبر ١٩٨٤ بأرقام ٢٠٧٣٣ ، ٢٠٧٣٤ A.T.C.C على الترتيب.

ويتضح بسهولة من الامثلة التوضيحية السابقة أن هذا الاختراع يوفر العديد من النواتج والطرق القيمة بشكل استثنائي في العديد من أوجهه.

والببتيدات المتعددة التي يوفرها هذا الاختراع هي مواد مفيدة بشكل واضح، سواءا كانت نواتج منتجة ميكروبيا أو نواتج تخليقية، حيث تم عمل التكوين التركيبي الاولي، الثانوي أو الثلاثي لها أول ما تم بواسطة هذا الاختراع.

وكما سبقت الاشارة، تشترك النواتج المستنسخة والتخليقية للاختراع، بدرجات مختلفة، في النشاط البيولوجية المعملية لنواتج EPO المفصولة من مصادر طبيعية وبالتالى يقترح أنها تستخدم كبدئل لنواتج فصل EPO في وسط المزرعة المستخدم لزراعة خلايا تكوين الخلايا الدموية الحمراء في المزرعة، وبشكل مماثل، ولدرجة أن نواتج عديد الببتيد لهذا الاختراع تشترك في النشاط داخل الجسم لنواتج فصل EPO الطبيعية، فإنها مناسبة بشكل واضح للاستخدام في طرق العلاج بالاريثروبويتين الممارسة على الثدييات ومن ضمنها الانسان للحصول على أي من أو كل من التاثيرات المشار اليها فيما يلي لهرومون EPO داخل الجسم مثل: تحفيز استجابة الخلية الشبكية reticulocyte ، تطوير تأثيرات تحركات الحديد ferrokinetic (مثل تأثيرات أيض الحديد في البلازما وتأثيرات زمن النخاع الانتقالى)، تغيرات كتلة الخلايا الحمراء، تحفيز تخليق الهيموجلوبين C (أنظر: Eschbach وزملاؤه، السابق الاشارة اليه) وكما يشير المثال ١٠، زيادة مستويات الهيماتوكريت hematocrit في الثدييات. ويدخل ضمن الادميين الذين يمكن علاجهم بمنتجات هذا الاختراع، المرضي بوجه عام الذين يحتاجون لنقل الدم ويتضمنون ضحايا الصدمات، مرضى الجراحات، مرضى أمراض الكلى ويتضمنون مرضى الغسيل الكلوي، والمرضى الذين يعانون من مختلف اضطرابات مكونات الدم، مثل الهيموفيليا hemophilia (سيولة الدم)، أنيميا الدم المنجلية sickle cell disease ، وما شابه ذلك. ويمكن توقع أن تقليل الحاجة لنقل الدم من خلال استخدام علاج EPO، ينتج عنه تقليل في نقل عوامل العدوى. ومنتجات الاختراع، يفضل انتاجها بطرق الاستنساخ، يتوقع أن تكون خالية

من البيروجين pyrogens ، المواد المثبطة الطبية وما شابه ذلك فمن المحتمل أنها تعطي فعالية كلية محسنة في الطرق العلاجية المرافقة للمنتجات الطبيعية ويتوقع كذلك أن العلاج بالاريثروبويتين بمنتجات هذا الاختراع يفيد في تحسين قدرة حمل الاوكسجين عند الأفراد الذين يعانون من ظروف بيئية قليلة في الأوكسجين ويمكن الحصول على تأثيرات قلبية ووعائية مفيدة.

وهناك طريقة مفضلة لاعطاء منتجات عديد الببتيد لهذا الاختراع وهي بالحقن (مثلا: في الوريد IV، في العضل IM، تحت الجلد SC، أو في البريتون IP) والتركيبات المعطاة تتضمن عادة كميات فعالة علاجيا من منتج مع مواد تخفيف، مواد حاملة و/ أو مواد إضافية مقبولة. وتشير الدراسات الفارماكولوجية الحركية المبدئية preliminary pharmacokinetic الى عمر نصفي أطول داخل الجسم لمنتجات EPO من القرود عند إعطاؤها بالحقن في العضل بدلا من الحقن الوريدي. ومن المتوقع أن تختلف الجرعات المؤثرة بشكل كبير اعتمادا على الحالة المعتزم علاجها ولكن يتوقع ان تكون الجرعات العلاجية لهذا الاختراع فيما بين ٠,١ (حوالي ٧ وحدة) الى ١٠٠ (حوالي ٧٠٠٠ وحدة) ميكروجم/ كجم من وزن الجسم، من المادة الفعالة. ويعتزم استخدام مواد التخفيف القياسية مثل البيومين albumin مصل الدم البشري في تركيبات الاختراع الصيدلية، وكذلك المواد الحاملة القياسية مثل محلول الملح.

والمواد الاضافية المناسبة للاستخدام في تركيبات الاختراع تشمل مركبات يشار اليها على حدة بتأثيراتها المحفزة لتكوين خلايا الدم الحمراء، مثل التستوستيرونات testosterones، محفزات الخلية السلفية (الام) progenitor، عامل النمو الشبيه بالانسولين، بروستاجلاندينات prostaglandins، سيروتونين serotonin، AMP الحلقي، البرولاكتين prolactin وثالث يودوثيرونين triiodothyronine، وكذلك العوامل المستخدمة بشكل عام في علاج الانيميا اللا تخليقية aplastic anemia، مثل مثينولين methenolene، ستانوزولول stanozolol و ناندرولون nandrolone [انظر مثلا: Resegotti وزملاؤه في Panminerra Medica، ٢٣، ٢٤٣- ٢٤٨ (١٩٨١)؛ MoGonigle وزملاؤه،

Kidney Int.، ٢٥ (٢)، ٤٣٧- ٤٤٤ (١٩٨٤)، Pavlovic -Kantera وزملاؤه، Expt. Hematol، ٨ (ملحق ٨)، ٢٨٣- ٢٩١ (١٩٨٠)، و Kurtz، FEBS letters، ١٤-أ-(١)، ١٠٥- ١٠٨ (١٩٨٢)]. ويشير الاختراع كذلك الى مواد اضافية وهي مواد يشار إلى أنها تقوم بتحسين أو تعزيز وتأثيرات الاريثروبويتين أو asialo-EPO، مثل المحفزات الادرينالية adrenergic agonists، الهرمونات الدرقية thyroid hormones، اندروجينات androgens و BPA [انظر؛ Dunn، "Current Concepts in Erythropoiesis"، John Wiley وأولاده (كيتشستر، انجلترا، ١٩٨٣)؛ Weiland وزملاؤه، Blut ، ٤٤ (٣)، ١٧٣- ١٧٥ (١٩٨٢)، Kalmanti، Kidney Int.، ٢٢، ٣٨٣- ٣٩١ (١٩٨٢)، Shahidi، NEW Eng. J. Med.، ٢٨٩، ٦٢- ٨٠ (١٩٧٣)، Fisher وزملاؤه، Steroids، ٣٠ (٦)، ٨٣٣- ٨٤٥ (١٩٧٧)، Urabe وزملاؤه، J.Exp. Med.، ١٤٩، ١٣١٤- ١٣٢٥ (١٩٧٩)، و Billat وزملاؤه، Expt. Hematol، ١٠ (١)، ١٣٣- ١٤٠ (١٩٨٢)] وكذلك عائلات من المركبات التي تسمى "عوامل محفزة لتكوين الخلايا الدموية الحمراء في الكبد" [أنظر، Naughton وزملاؤه Acta. Haemat.، ٦٩، ١٧١- ١٧٩ (١٩٨٣)] و "محفزات الاريثروبويتين erythrotropins" [كما يصف Congote، وزملاؤه، في الملخص ٣٦٤ من. مجريات الموتمر الدولي السابع للغدد الصماء (مدينة الكيبيك، ١- ٧ يوليو ١٩٨٤)، Congote، Biochem. Biophys. Res.Comm.، ١١٥ (٢)، ٤٤٧- ٤٨٣ (١٩٨٣) و Congote، Anal.Biochem، ١٤٠، ٤٢٨- ٤٣٣ (١٩٨٤)] و "اريثروجينين erythrogenin" [كما يصف Rothman وزملاؤه، J. Surg. Oncol.، ٢٠، ١٠٥- ١٠٨ (١٩٨٢)]. ونتائج المسح الاولي المصممة لقياس استجابات تكوين الخلايا الحمراء في فئران تعرضت مسبقا لنقص الاوكسجين تعاني من زيادة الخلايا الدموية الحمراء تم معالجتها إما بواسطة 5-α-dihydrotestosterone أو ناندرولون nandrolone ثم أعطيت اريثروبويتين الخاص بهذا الاختراع، كانت لها نتائج متماثلة.

والاستخدامات التشخيصية لعديد الببتيدات لهذا الاختراع هي واسعة بنفس الطريقة وتشمل استخدام في صور ذات علامة أو بدون في مختلف طرق التحليل

المناعي التي تتضمن RIA، ELISA وما شابه ذلك، و كذلك مختلف تحاليل النشاط داخل الجسم وفي المعمل. انظر مثلاً؛ Dunn وزملاؤه Expt.Hematol " (٧)، ٥٩٠-٦٠٠(١٩٨٣)؛ LBCIk,. Gibson وزملاؤه، Pathology، ١٦، ١٥٥-١٥٦ (١٩٨٤)؛ krystal، Exp. Hemotol، ١١ (٧)، ٦٤٩-٦٦٠ (١٦٨٣)؛ Satio وزملاؤه، Jap.J. Med. ، ٢٣(١)، ١٦-٢١ (١٩٨٤)، Nathan وزملاؤه، Neu. Eng. J. Med.، ٣٠٨(٩)، ٥٢٠-٥٢٢ (١٩٨٣)؛ ومختلف المراجع التي تشير الى التحاليل المشار اليها في هذا الوصف. وعديد ببتيدات هذا الاختراع، وتشمل الببتيدات التخليقية التي تشمل على تتابعات شقوق لهرمون EPO أشير اليها لأول مرة في هذا الوصف ، توفر أيضاً مواد نقية مفيدة للغاية للحصول على أجسام مضادة متعددة للاستنساخ و"بنوك" من الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ المحددة لمختلف القمم الأنتيجينية المستمرة والغير مستمرة لهرمون EPO.وكأحد الامثلة، التحليل الأولي لتتابعات الحمض الاميني في شكل ٦ في سياق المداواة المائية hydropathicity طبقاً الى Hopp وزملاؤه، P. N. A. S. (U.S.A)، ٧٨، صفحات ٣٨٢٤-٣٨٢٨ (١٩٨١) وتركيبات ثانوية طبقاً إلى Chou وزملاؤه، Ann. Rer. Biochem.، ٤٧، صفحة ٢٥١ (١٩٧٨) اظهرت أن ببتيدات تخليقية مستنسخة من تتابعات مستمرة من شقوق متفرعة المواقع ٤١-٥٧ ضمنية ١١٦- ١٢٨ ضمنية و ١٤٤ - ١٦٦ ضمنية ويحتمل أن تنتج استجابة انتيجينية عالية وتعطي اجسام مضادة احادية ومتعددة الاستنساخ تتفاعل مناعيا مع كل من الببتيد التخليقي والبروتين كله. ويتوقع أن تكون هذه الأجسام المضادة مفيدة في اكتشاف وتنقية قابلية انجذاب EPO والمنتجات المتعلقة بهرمون EPO.

وفيما يلي توضيح للببتيدات التخليقية الثلاثية التي تم تحضيرها:

(١) hEPO ٤١-٥٧٩، V-P-D-T-K-V-N-F-Y-A-W-K-R-M-E-V-G

(٢) hEPO ١١٦-١٢٨ K-E-A-I-S-P-P-D-A-A-S-A-A

(٣) hEPO ١١٦-١٤٤ V-Y-S-N-F-L-R-G-K-L-K-L-Y-T-G-E-A-C-R-T-G-O-R

وأوضحت دراسات التطعيم الأولية التي تستخدم عديد الببتيدات السابق ذكرها، استجابة إيجابية ضعيفة نسبيا إلى hEPO ٤١-٥٧، واستجابة لا تذكر إلى hEPO

١١٦-١٢٨، واستجابة إيجابية قوية إلى hEPO ١٤٤-١٦٦، كما هي مقاسة بواسطة قدرة أجسام مضادة في مصل دم أرنب على الترسيب المناعي لنواتج فصل EPO بشري مميز بواسطة I^{125}. ولم تظهر دراسات النشاط داخل الجسم على الببتيدات الثلاثة، أي نشاط يذكر سواءاً بمفرده أو في اتحاد.

وبينما تقوم التتابعات المستنتجة من شقوق الحمض الأميني لهرمون EPO الثديي التي توفرها الأمثلة التوضيحية أساسا بتحديد التكوين الأولي لهرمون EPO الناضج، فسيتضح أن التتابع المحدد من ١٦٥ شق حمض أميني لهرمون EPO في القرود في شكل ٥ و ١٦٦ شقا لهرمون EPO الآدمي في شكل ٦ لا تحدد مجال الاختراع من عديد الببتيدات المفيدة. ويوضح من هذا الاختراع الصور المماثلة الطبيعية المختلفة من EPO والتي يشير الأبحاث السابقة في عديد الببتيدات الثديية الفعالة بيولوجيا مثل الأنترفيرون γ البشري human γ interferon، إلى احتمال وجودها. (قارن مثلا: طوائف الانترفيرون المناعية البشرية التي يشار إلى ان بها شق أرجينين في الموقع ١٤٠ في EPO في الطلب المنشور رقم ٠٧٧٦٧٠ والطوائف التي يشار إلى ان بها جلوتامين في الموقع رقم ١٤٠ في: Gray وزملاؤه، Nature، ٢٩٥، صفحات ٥٠٣-٥٠٨ (١٩٨٢) ويتميز كلتا الطائفتين بتكونهما من تتابعات انترفيرون جاما بشري "ناضج"). وقد تختلف الصور المماثلة من عديد ببتيدات EPO البشري عن بعضها البعض وعن التتابعات في الأشكال ٥ و ٦ في طول التتابع و/ أو الحذف، الاستبدال، الإدخال او الإضافة لأحماض أمينية في التتابع، وبالتالى اختلافات محتملة في القدرة على المعالجة الجلايكوزيلية. وكما سبقت الإشارة، يعتقد أن أحد الصور المماثلة المزعومة لطوائف EPO تشمل شق ميثونين في الموقع ١٢٦. وبالتالى، يحتمل كذلك أن تظهر صور مماثلة طبيعية من DNA يحمل شفرة EPO وتتابعات cDNA جينومية، والتي تحمل شفرة الأنواع السابق ذكرها من عديد الببتيدات المماثلة أو ببساطة تستخدم كودونات مختلفة لتحديد نفس الببتيدات المتعددة كما سبق ذكره.

وبالإضافة للصور المماثلة الطبيعية من EPO الناضج، يتضمن هذا الاختراع أيضا "منتجات EPO" أخرى مثل مماثلات عديد الببيتدات EPO وقطع من EPO

"ناضج" وباتباع الطرق سابقة الذكر في الطلب المنشور باسم Alton وزملائه (البراءة العالمية ٠٤٠٥٣/ ٨٣) يمكن بسهولة يصمم ويصنع جينات تحمل شفرة انتاج ميكروبي لعديد ببيتدات لها تكوينات اولية تختلف عن تلك المذكورة في هذا الوصف لهرمون EPO الناضج في هوية ومكان واحد أو اكثر من الشقوق (مثلا: استبدالات، إضافات وحذف طرفي ووسطي). وكبديل، قد يتم بسهولة إجراء تعديلات على جينات DNA وEPO الجينومي بطرق تغيير جيني موجه للموقع معروفة تماما وتستخدم للحصول على مماثلات ومشتقات من EPO وتشترك منتجات EPO هذه على الأقل في واحد من الخصائص البيولوجية لهرمون EPO ولكن قد تختلف في غيرها. وعلى سبيل المثال، منتجات EPO للاختراع تشمل تلك التي يتم تقصيرها بواسطة مثلا: الحذف hEPO [Asn^2, des-Pro^2 through Ile^6]، des-Thr^{163}] hEPO [through Arg^{166}] و "Δ27-55hEPO" حيث يحتوي الأخير على شقوق تحمل شفرتها وأكسون كامل محذوف؛ او التي تكون اكثر ثباتا عند التحلل المائي (ولذلك، قد يكون لها أكثر من تأثير واضح أو أطول تأثيرا من EPO الطبيعي)؛ او التي تم تغييرها او حذف واحد او اكثر من المواقع المحتملة للمعالجة الجلايكوزيلية glycosylation (والتي قد ينتج عنها نشاطات أعلى لمنتجات الخميرة)؛ أو التي تم بها حذف او استبدال شقوق سيستايين بواسطة مثلا: هستيدين او سيرين (مثل المماثل Hepo [His^7] ويمكن بسهولة أكبر فصلها في صورة نشيطة من أنظمة ميكروبية؛ أو التي بها واحد او اكثر من شقوق تيروزين مستبدلة بفنيل ألانين (مثل المماثلات hEPO [Phe^{15}]، hEPO [Phe^{19}]، و hEPO [Phe^{145}]، وقد ترتبط بسهولة مع مستقبلات EPO اكثر أو اقل على الخلايا المستهدفة. ويتم كذلك توضيح قطع عديد ببتيد تستنسخ فقط جزء من تتابع الحمض الأميني المستمر او تكوينات ثانوية في EPO الناضج، حيث هذه القطع لها نشاط واحد من EPO (مثلا: الارتباط مع المستقبل) وليست الأخرى (مثلا: نشاط محفز لتكوين الخلايا الدموية الحمراء). وفيما يتعلق بهذا الغرض فإن المهمة بشكل خاص هي تلك القطع من EPO التي يتم توضيحها عند مراعاة تتابع DNA في شكل ٦، أي "قطع" من تتابع EPO المستمر الكلي والتي يتم تحديدها بتتابعات داخلة والتي قد تمثل "مواقع" محددة من النشاط

البيولوجي. ومن المهم ذكره او غياب النشاط داخل الجسم لأي واحد أو اكثر من "منتجات EPO " للاختراع والتي لا تكون حائلا بأي حال للاستخدام العلاجي (انظر؛ Weiland وزملائه المذكورة سابقا) او الاستخدام في مواطن أخرى، مثلا في تحليل EPO او تثبيط EPO. وقد تكون مثبطات الإريثروبويتين نافعة بشكل واضح في علاج زيادة كرات الدم الحمراء او حالات زيادة انتاج EPO [انظر مثلا؛ Adamson، Practice Hasp. ١٨ (١٢)، ٤٩-٥٧ (١٩٨٣)، و Hellmann وزملاؤه، Clin. Lab. Haemat.، ٥ ، ٣٣٥ - ٣٤٢ (١٩٨٣)].

وطبقا لجانب آخر من الاختراع، فإن تتابعات DNA المستنسخة الموصوفة في هذا الاختراع والتي تحمل شفرة عديد ببتيدات EPO بشرية ومن القرود هي قيمة لشكل بارز للمعلومات والتي تعطيها فيما يتعلق بتتابع الحمض الأميني للإريثروبويتين الثديي والذي كان غير قيما هاهنا بالرغم من عقود من عمليات التحليل لنواتج فصل المنتجات الطبيعية. وتتابعات DNA أيضا هامة بشكل واضح كمنتجات مفيدة في الحصول على تخليق ميكروبي واسع المدى للاريثروبويتين عن طريق عدة طرق استنساخ مختلفة. وبمعنى آخر، تفيد تتابعات DNA التي يوفرها هذا الاختراع في الحصول على نواقل DNA بلازميدية دائرية وفيروسية مفيدة وجديدة، خلايا عائل حقيقة وأولية النواة ميكروبية متحولة أو مثبتة مفيدة (وتشمل خلايا بكتيريا وخميرة وخلايا ثديية مزروعة)، وطرق جديدة ومفيدة لزرع خلايا العائل الميكروبي هذه القادرة على انتاج EPO ومنتجات EPO. وتتابعات DNA لهذا الاختراع هي أيضا مواد مناسبة بشكل واضح للاستخدام كمجسات مميزة بعلامة في فصل EPO و cDNA يحمل شفرة بروتين متعلق به وتتابعات DNA جينومي من طوائف ثديية بخلاف الطوائف البشرية ومن القرود والموضحة في هذا الوصف بشكل محدد. ولا يمكن حتى الآن حساب مدى استخدام تتابعات DNA لهذا الاختراع في مختلف الطرق البديلة لتخليق البروتين (مثلا؛ في خلايا حشرية) او في العلاج الجيني في الانسان والثدييات الأخرى. ويتوقع ان تفيد تتابعات DNA لهذا الاختراع في تطوير طوائف ثديية عبر - جينية والتي قد تعمل "كعامل" حقيقي النواه لانتاج إريثروبويتين

ومنتجات إريثروبويتين بكميات. انظر بوجه عام؛ Palmiter وزمـلاؤه، Science، ٢٢٢ (٤٦٢٥)، ٨٠٩- ٨١٤ (١٩٨٣).

ولذلك وفي ضوء ما قيل، لا يعتزم الوصف المحدد للأمثلـة التوضـيحية ان يكون محددا لمجال الاختراع ومن المتوقع ان تظهر تعديلات واختلافات عديدة لذوي الخبرة في المجال. وكأحد الأمثلة، بينما يتم توفير تتابعات DNA بواسـطة الأمثلـة التوضيحية وتشمل تتابعات cDNA و DNA جينومي، ونتيجة لأن هذا الطلب يوفر معلومات تتابع حمض أميني أساسي لتصنيع تتابع DNA، يشتمل الاختراع كذلك على تتابعات DNA مصنعة كما يتم تكوينها بناءا على معرفة تتابعات الحمض الأميني من EPO. وهذه قد تحمل شفرة EPO (كما فـي المثـال ١٢) وكـذلك لقطـع EPO ومماثلات عديد ببتيد EPO (أي "منتجات EPO") والتي قد تشترك فـي واحـدة او اكثر من الخصائص البيولوجية لهرمون EPO الطبيعي ولكن لا تشترك في غيرهـا (او لها خصائص أخرى بدرجات مختلفة).

ولذلك فإن تتابعات DNA التي يوفرها هذا الاختراع تشـمل كـل تتابعـات DNA المناسبة في تأمين الإنتاج في خلية عائل حقيقية او أولية النواة لتكوين عديـد ببتيدية على الأقل جزء من التكوين التركيبي الأولي وواحدة او اكثر من الخصـائص البيولوجية للاريثروبويتين، ومختارة من:

(أ) تتابعات DNA الموضحة في الشكل ٥ و ٦؛ (ب) تتابعات DNA التـي تتهجن مع تتابعات DNA الموضحة في (أ) أو قطع منها: و(ج) تتابعات DNA التي باستثناء انحلال الشفرة الجينية، تتهجن مع تتابعات DNA في (أ) و(ب). ومن المهم في هذا الخصوص، ذكر، مثلا، أن تتابعات جين EPO البشري وفي القرود المماثـل وتتابعات جين ثديي في طوائف أخرى من المتوقع ان تتهجن مع تتابعات الموضـحة في الشكل ٥ و ٦ أو قطع منها. وعلاوة على ذلك، وباستثناء انحلال الشفرة الجينية، تتهجن أيضا جينات SCEPO و ECEPO وتتابعات cDNA المصنع او الذي تـم تغييره جينيا او DNA جينوي يحمل شفرة قطع ومماثلات EPO عديدة، مع تتابعات DNA المذكورة سابقا، ويمكن بسهولة إجراء هذه التهجينات فـي ظـروف تهجـين موضحة في هذا الوصف فيما يتعلق بالفصل المبدئي بحمض DNA الذي يحمل شفرة

EPO بشري او من القرود، او ظروف اكثر قسوة، إذا كان المطلوب تقليل التهجين الخلفي.

وبطريقة مماثلة، وبينما توضح الأمثلة السابقة للاختراع منتجات EPO منتجة ميكروبيا ضمن انتاج خلوي ثديي لحمض DNA موجود في ناقل هجين مصدر جينومي من بلازميد بكتيري أو فيروس، تدخل عدة أنظمة انتاج مختلفة في مجال هذا الاختراع. ومن الواضح جليا أنظمة انتاج تتضمن نواقل من مصادر متجانسة تستخدم على مختلف الخلايا الثدييات الخميرة والبكتريا في المزرعة وكذلك أنظمة انتاج لا تتضمن نواقل (مثل تثبيت الخلايا بواسطة فوسفات الكالسيوم calcium phosphate). وفي هذا الخصوص، سيتضح ان انتاج مثلا: DNA من قرود في خلايا عائل من القرود في مزرعة وخلايا عائل ثديية في مزرعة، وفي الواقع يمثل حالات من انتاج DNA "خارجي" في ما يعتقد أن انتاج EPO DNA عالى المستوى ليس له مصادر في جينوم العائل. وتشمل أنظمة انتاج هذا الاختراع كذلك هذه الممارسات التي ينتج عنها معلومات سيتوبلازمية عن منتجات EPO و تراكم منتجات EPO جلايكوزيلية وغير جلايكوزيلية في سيتوبلازم او أغشية خلايا العائل (مثلا التراكم في الفراغات البيريبلازمية البكتيرية periplasmic spaces) او في السوائل الطافية لوسط الزراعة كما سبق التوضيح، او في أنظمة غير مألوفة مثل أنظمة سودوموناس إيروجينوزا P. aeruginosa (التي يصفها Gray وزملاؤه، Biotechnology، ٢، صفحات ١٦١-١٦٥ (١٩٨٤)).

وبينما يتم تطبيق طرق تهجين محسنة في هذا الاختراع على أنظمة مسح تهجين DNA/ DNA فإنها يتم تطبيقها بشكل مساوي على أنظمة مسح RNA/ RNA و RNA/ DNA. وتشمل طرق المجس المختلط الموضحة في هذا الوصف، بوجه عام عدد من التحسينات في طرق التهجين مما يسمح بفصل أسرع وأفضل لعديد النيوكليوتيد. وهذه التحسينات العديدة تشمل: طرق نقل وحفاظ محسنة على المستعمرة؛ استخدام مرشحات معتمدة على النايلون مثل Gene Screen و Gene Screen Plus لتسمح بإعادة استخدام المجسات مع نفس المرشحات والاستخدام المتكرر للمرشح، تطبيق معالجات بروتييز protease جديدة [قارن مثلا

مـــع: Taub وزمـــلاؤه فـــي Anal. Biochem، ١٢٦، صـــفحات ٢٢٢- ٢٣٠ (١٩٨٢)]، استخدام تركيزات منفردة منخفضة جدا (حوالي ٠,٠٢٥ بيكومول) من عدد كبير من المجسات المختلطة (مثلا عدد زائد، وإجراء خطوات تهجين وبعد تهجين في درجات حرارة قياسية متقاربة جدا (أي حوالي ٤°م. ويفضل ٢°م) بعيدا عن حـــرارة الانحلال الدنيا المحسوبة لأي من المجسات المختلطة المستخدمة. وهـــذه التحســـينات تتحد لإعطاء نتاج لا يمكن توقعها عند استخدامها. ويتم توضيح ذلك باســـهاب فـــي ضوء أن طرق المجس المختلط التي تشمل ٤ أصناف عـــدد المجســـات المســـتخدمة دائما، تم استخدامها بنجاح حتى في انظمـــة مســـح cDNA علـــى طوائـــف RNA المراسل ذات التوفر المنخفض نسبيا والتي تم تطبيقها بنجاح على فصل تتـــابع فـــي جيني فريد في مكتبة جينومية من حوالي ١,٥٠٠,٠٠٠ طبقة أكولة. وتـــم الحصـــول بشكل أساسي على هذه الخاصية مع نشر الرأي في Anderson وزملاؤه، الســـابق ذكرها، حيث ان طرق مسح المجس المختلط كانت "غير عملية" لفصل جينات بروتين ثديي عندما لا تتوفر RNA المناظرة.

عناصر الحماية

١ ١- تتابع DNA للاستعمال في تأمين التعبير في خلية مضيفه من كائن
٢ بدائي النواة procaryotic أو كائن حقيقي النواة eucaryotic لناتج
٣ عديد الببتيد polypeptide الذي به جزء على الأقل من التطابق
٤ التركيبي الأولي [sic] لما هو عليه في الاريثروبويتين
٥ erythropoietin لكي يسمح أن يكون له أو يمتلك خاصية بيولوجية
٦ لجعل خلايا مخ العظم bone marrow cells تزيد من إنتاج الخلايا
٧ الشبكية reticulocytes وخلايا الدم الحمراء وزيادة تخليق
٨ الهيموجلوبين hemoglobin [sic] أو امتصاص الحديد، وتتابع DNA
٩ المذكور المختار من المجموعة المتكونة من:
١٠ (أ) تتابعات DNA المذكورة في الجداول ٥، ٦ وشرائطها المكمله.
١١ (ب) تتابعات DNA التي تهجن تحت ظروف صارمه إلى مناطق تشفير
١٢ البروتين لتتابعات DNA المحدده في (أ) أو أجزاء منها؛
١٣ (ج) تتابعات DNA التي ، ولكن لانحراف أو تفسخ الكود الجيني
١٤ degeneracy of the genetic code ، تهجن إلى تتابعات DNA
١٥ المحددة في (أ)، (ب).

١ ٢- تتابع DNA طبقا للعنصر ١ المشفر للاريثروبويتين البشري
٢ human erythropoietin.

١ ٣- تتابع cDNA طبقا للعنصر ١ يكون عبارة عن تتابع DNA مشفر
٢ للاريثروبويتين erythropoietin من أنواع القرود.

١ ٤- تتابع DNA طبقا للعنصر ٣ ويشمل على منطقة تشفير البروتين
٢ protein ذكرت في جدول ٥.

٥- تتابع DNA جينوميه genomic DNA طبقا للعنصر ١ أو ٢.

٦- تتابع DNA مشفر للاريثروبويتين erythropoietin لأنواع بشرية طبقا للعنصر ٥.

٧- تتابع DNA طبقا للعنصر ٦ ويشمل على منطقة تشفير البروتين protein ذكرت في الجدول ٦.

٨- تتابع DNA طبقا للعنصر ١ أو ٢ مترابط تساهميا مع مادة محددة label substance يمكن الكشف عنها.

٩- تتابع DNA طبقا للعنصر ٨، وفيها تكون المادة المحددة label substance التي يمكن كشفها هي مادة محددة مشعة radiolabel .

١٠- تتابع DNA فردية الشريط طبقا للعنصر ٨ أو ٩.

١١- تتابع DNA طبقا للعنصر ١، مشفرة لـ
[Phe^{15}]hEPO, [Phe^{49}]hEPO, [Phe^{145}]hEPO, [His^{7}]hEPO, [Asn^{2}des-Pro^{2} through Ile^{6}]hEPO, [des- Thr^{163} through Arg^{166}]hEPO, or [Δ27-55]hEPO.

١٢- خلية مضيفه لكائن بدائي النواة procaryotic أو حقيقي النواة eucaryotic منقوله أو مصابه مع تتابع DNA طبقا لأي من العناصر ١، ٢، ٣، ٦، ٧ و ٨ بطريقة تجعل الخلية المضيفه تعبر عن ناتج عديد الببتيد polypeptide المذكور.

١٣- خلية مضيفه منقولة أو مصابه طبقا للعنصر ١٢ تكون تلك الخلية قادرة على التحويل الجليكوسيلي glycosylating لعديد الببتيد polypeptide المذكور.

١٤- خلية مضيفه ثدييه منقوله أو مصابه طبقا للعنصر ١٣.

١٥- خلية COS منقوله أو مصابه طبقا للعنصر ١٣.

١٦- خلية CHO منقوله أو مصابه طبقا للعنصر ١٣.

١٧- ناقل DNA بلازميد plasmid أو فيروسي viral دائري ذو وظيفه بيولوجية مشتمل على تتابع DNA طبقا لأي من العناصر ١، ٢، ٣، ٥، ٦، ٧ أو ١١.

١٨- خلية مضيفه لكائن بدائي النواة procaryotic أو حقيقي النواة eucaryotic تنقل أو تصاب بطريقة ثابتة مع ناقل DNA طبقا للعنصر ١٧.

١٩- عديد ببتيد polypeptide معاد اتحاده الجيني recombinant به جزء أو كل التطابق التركيبي الأولي للاريثروبويتين البشري human erythropoietin أو القردي المذكور في الجدول ٦ أو الجدول ٥ أو اي تغير الليلي allelic variant أو مشتق منه له الخاصية البيولوجية التي تجعل خلايا مخ العظم bone marrow cells تزيد من إنتاج الخلايا الشبكية reticulocytes وخلايا الدم الحمراء لزيادة تخليق الهيموجلوبين hemoglobin أو امتصاص الحديد وتتميز بأنها ناتج لتعبير الكائن

حقيقي النواة eucaryotic لتتابع DNA الخارجي ويكون لها وزن جزيئي أكبر بواسطة SDS-PAGE من الاريثروبويتين erythropoietin المعزول من مصادر بوليه.

٢٠- عديد ببتيد الجليكوبروتين glycoprotein polypeptide طبقا للعنصر ١٩ الذي به متوسط تركيب كربوهيدرات Carbohydrate يختلف عن ذلك الخاص بالاريثروبويتين البشري human erythropoietin المعزول من مصادر بوليه.

٢١- عديد ببتيد polypeptide طبقا للعنصر ١٩ أو ٢٠ وفيه يكون التتابع الخارجي هو تتابع cDNA.

٢٢- عديد ببتيد polypeptide طبقا للعنصر ١٩ أو ٢٠ وفيه يكون تتابع DNA الخارجي هو تتابع DNA جينومي genomic.

٢٣- عديد ببتيد polypeptide طبقا للعنصر ١٩ أو ٢٠ وفيه يتم تتابع DNA الخارجي على بلازميد DNA دائري circular DNA plasmid منسوخ بطريقة مستقله أو على ناقل فيروسي viral vector.

٢٤- عديد ببتيد polypeptide طبقا لأي من العناصر ١٩ إلى ٢٣ ويتميز بأنه مترابط تساهميا مع مادة محددة label substance يمكن الكشف عنها.

٢٥- عديد ببتيد polypeptide طبقا للعنصر ٢٤، وفيها تكون المادة المحددة label substance التي يمكن الكشف عنها مادة إشعاعية radiolabel .

٢٦- ناتج عديد ببتيد polypeptide من التعبير في خلية مضيفة لكائن حقيقي النواة eucaryotic لتتابع DNA طبقا لأي من العناصر ١، ٢، ٣، ٥، ٦، ٧.

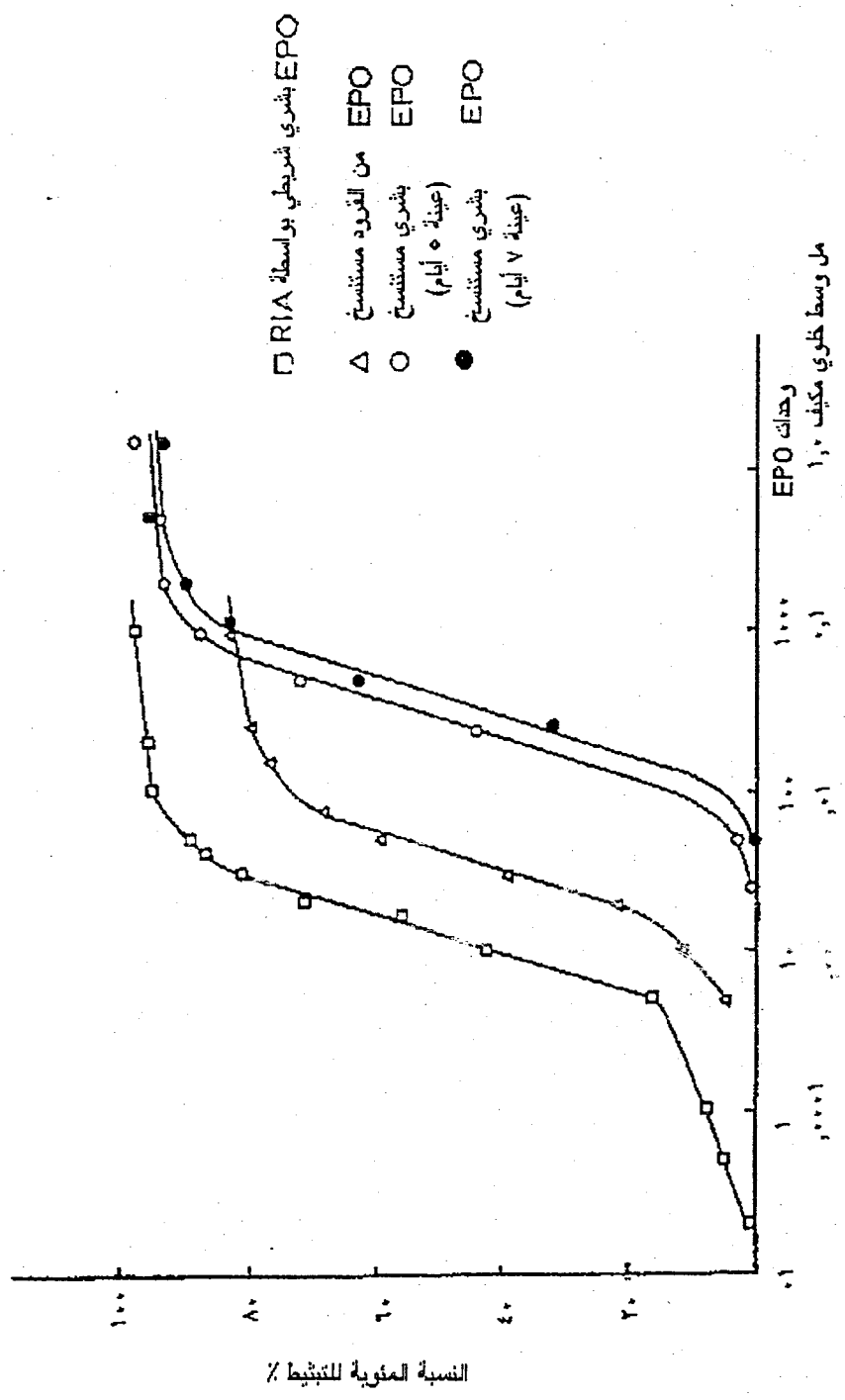
٢٧- طريقة لانتاج عديد ببتيد polypeptide به جزء على الأقل من التطابق التركيبي الأولي للاريثروبويتين erythropoietin للسماح بامتلاك خاصية بيولوجية تجعل خلايا مخ العظام bone marrow cells تزيد من انتاج الخلايا الشبكية reticulocytes وخلايا الدم الحمراء وزيادة تخليق الهيموجلوبين hemoglobin او امتصاص الحديد، وتتميز هذه الطريقة بزرع تحت ظروف تغذية مناسبة لخلية كائن بدائي النواة procaryotic أو حقيقي النواة eucaryotic منقولة أو مصابة بتتابع DNA طبقا للعناصر ١، ٢، ٣، ٥، ٦، ٧. بطريقة تسمح للخلية المضيفة ان تعبر عديد الببتيد polypeptide المذكور، مع عزل اختياري لناتج عديد الببتيد polypeptide المطلوب لتعبيرتتابع DNA.

٢٨- طريقة طبقا للعنصر ٢٧، وتتميز بزراعة خلية مضيفة لأي من العناصر ١٢ إلى ١٦.

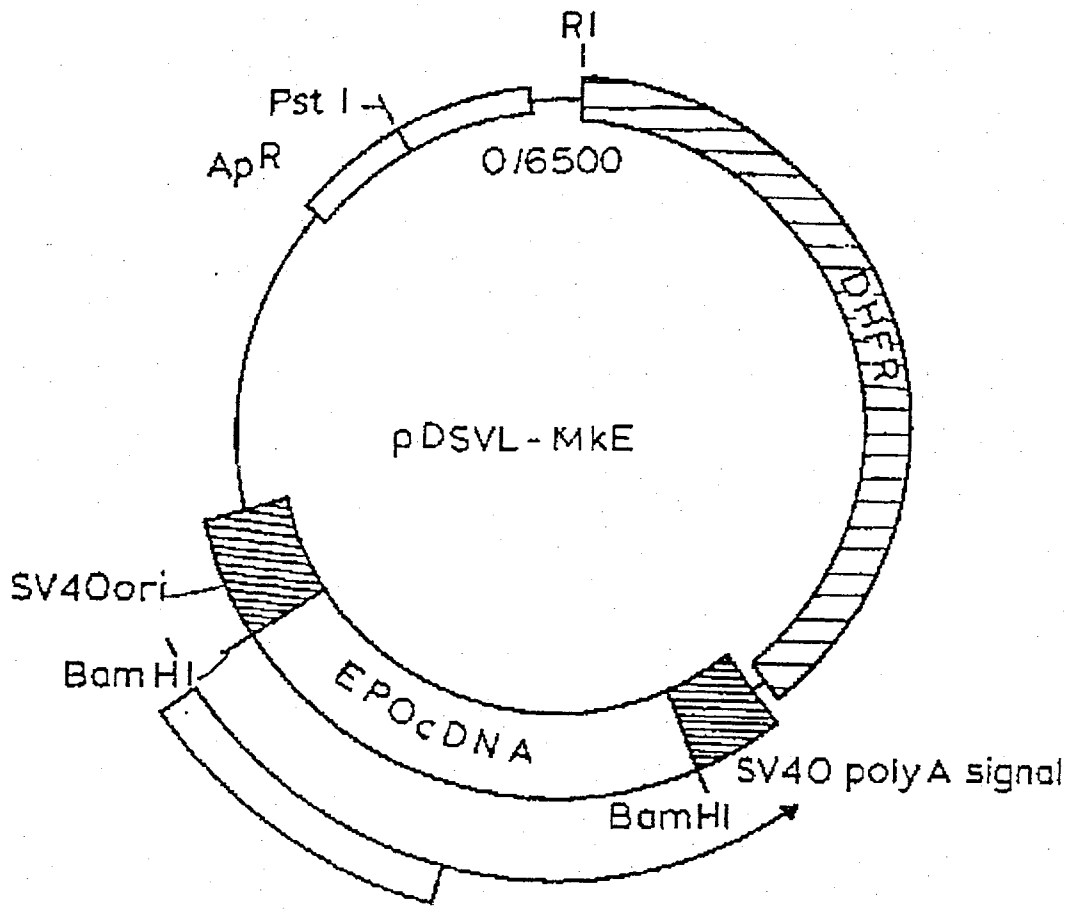
٢٩- طريقة طبقا للعنصر ٢٧ او ٢٨ لانتاج عديد ببتيد polypeptide لأي من العناصر ١٩ إلى ٢٣ و ٢٦.

٣٠- تركيب صيدلي متضمن عديد ببتيد polypeptide طبقا للطريقة المذكورة في العنصر ٢٧، ٢٨ او ٢٩ مع مخفف أو إضافة او حامل مقبول صيدليا.

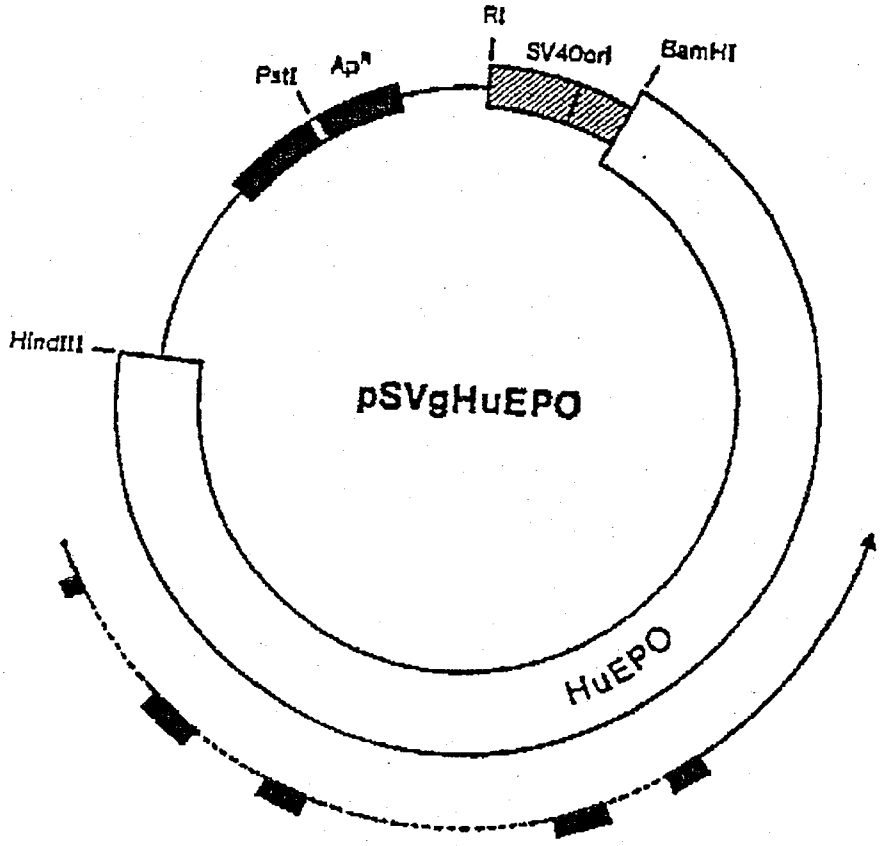
١ ٣١- تركيب صيدلي طبقا للعنصر ٣٠، متضمن على عديد الببتيد
٢ polypeptide المذكور لأي من العناصر ١٩ إلى ٢٣ و ٢٦.


□ RIA بشري شريطي بواسطة EPO
△ من الفرد مستنسخ EPO
○ بشري مستنسخ EPO
(عينة ٥ أيام)
● بشري مستنسخ EPO
(عينة ٧ أيام)
وحدات EPO
مل وسط ظوي مكيف ١,٠
١٠٠٠
١٠٠
١٠
١
٠,١
٠,٠١
٠,٠٠١
١٠٠
٨٠
٦٠
٤٠
٢٠
٠
النسبة المئوية للتبثيط ٪

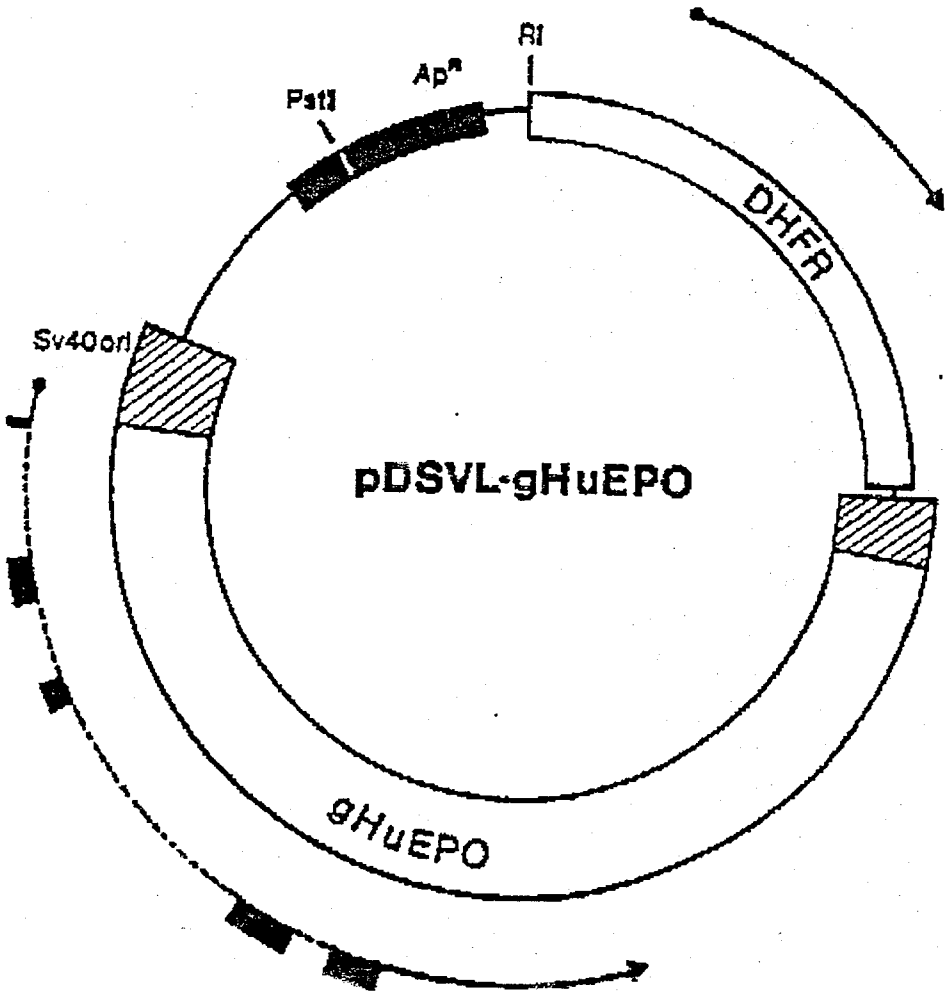
شكل ١


RI
Pst I
ApR
0/6500
DHFR
pDSVL-MkE
SV40ori
BamHI
EPOcDNA
SV40 polyA signal
BamHI

شكل ٢



شكل ٣



شكل ٤