



[19] المملكة العربية السعودية SA

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ١٢٤٣

[45] تاريخ المنح: ١٦/٠٨/١٤٢٧هـ

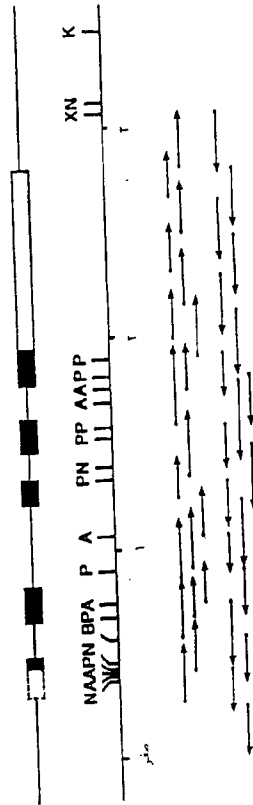
الموافق: ٠٩/٠٩/٢٠٠٦م

[12] براءة اختراع

[30] بيانات الأسبقية:	[72] اسم المخترع: لاري م. سوزا
[51] التصنيف الدولي ^٧ :	[73] مالك البراءة: كيرين أمجين، انك.
[56] المراجع:	عنوانه: ١٨٤٠ ديهافيلاند درايف، ثوساند أوكس،
Int. Cl. ⁷ :C12N 15/00	٩١٣٢٠-١٧٨٩ كاليفورنيا، الولايات المتحدة
براءة أمريكية ٤٣٥٨٥٣٥ ١٩٨٢/١١/٠٩م	الأمريكية
براءة أمريكية ٤٣٩٤٤٤٣ ١٩٨٣/٠٧/١٩م	[74] الوكيل: أحمد نجدت بازارباشي
براءة أوروبية ١٣٦٤٩٠ ١٩٩٠/٠٣/٢١م	[21] رقم الطلب: ٩٢١٣٠١٨٦
اسم الفاحص: أحمد بن محمد السلامة	[22] تاريخ الإيداع: ١٤١٣/٠٤/٢٥ هـ
	الموافق: ١٩٩٢/١٠/٢١ م

الخصائص الكيموحيوية والمناعية biochemical
and immunological لـ hpG-CSF .

٣٠ عنصر حماية، شكل واحد



الشكل (١)

[54] اسم الاختراع: إنتاج عامل حفاز لتكوين الخلية

الحبيبية Granulocyte متعددة الفعالية

[57] الملخص: يتعلق هنا، عديد بيتيدات polypeptides

جديدة لها جزء أو كل التكوين البنائي الأساسي،
وواحد أو أكثر من الصفات الحيوية للتدييات (مثل
الإنسان) كإنتاج عامل حفزي لتكوين الخلية الحبيبية
متعددة الفعالية، والتي تتميز بأفضليتها في إنتاج
الخلايا البكتيرية المستقبلية prokaryotic أو
eukaryotic المعدلة للسلسلة الجينية genomc لـ
DNA. تشفير سلاسل جزء أو كل متبقيات الحمض
الأميني amino acid لـ hpG-CSF أو مشابهتها
في نفس المصدر، يمكن إدخاله في الكروموسوم
الجيني genetic التكراري للجهاز العصبي
التشابكي، أو في نواقل فيروسية تستخدم لتعديل
الخلايا البكتيرية المستقبلية المناسبة، مثل
prokaryotic أو eukaryotic مثل البكتيريا،
الخميرة، أو الخلايا cells الفقارية المزروعة. توضح
المنتجات المعدلة لسلاسل الـ DNA (الحمض
النووي)، الخصائص الطبيعية والمناعية والنشاطات
الحوية لمعزولات hpG-CSF المشتقة من مصادر
طبيعية خارج الجسم الحي (مخبرياً) كما موضح
أيضاً عديد البيتيدات polypeptides المحضرة
كيميائياً chemically والتي لها نصيب في

إنتاج عامل حفاز لتكوين الخلية الحبيبية Granulocyte متعددة الفعالية

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بصفة عامة بعوامل النمو في نظام تكوين الدم لدى الإنسان (hematopoietic) وبعديد النيكلو تيدات (polyuncleotides) المشفرة (encoding) لهذه العوامل. ويتعلق الطلب الحالي بشكل خاص بعوامل حفز لإنتاج خلية متعددة الفعالية (pluripotene) ٥ للثدييات وخصوصاً بعامل حفزي لإنتاج الخلية متعددة الفعالية للإنسان (hpG-CSF) والأجزاء وأشباه عديد الببتيدات (polypeptide) وكذلك عديد النيكلو تيدات (polyuncleotides) لنفس المصدر.

يستبدل نظام تكوين الدم في الإنسان (hematopoietic) مختلف خلايا الدم البيضاء (التي تشمل الخلايا المتعادلة (neutrophils)، والملتهمة (macrophages) المحبة للماء/ الخلايا البدنية (basophils/mast ١٠) وخلايا الدم الحمراء (erythrocytes) والخلايا المكونة للتجلط والصفائح الدموية (megakaryocytes/platelets). قدر أن نظام تكوين الدم (hematopoietic) لذكر الإنسان المتوسط يعمل بمعدل إنتاج $4,5 \times 10^{11}$ خلية حبيبية (granulocytes) وخلايا دم حمراء (erythrocytes) سنوياً والتي تكفي لإحلال الوزن الكلي للجسم سنوياً. ديكستير وزملائه. التحليل الحيوي ١٥٤,٢-

١٥٨ (١٩٨٥). Dexter et al., BioEssays, 2,154-158 (14985).

١٥ ويعتقد أن كمية صغيرة من عوامل النمو المحددة في نظام تكوين الدم (hematopoietic) تقدم تفسيراً لتخليق عدد قليل من الأصل والخلايا الجزعية (stem cells) لخطوط متباينة لخلايا الدم، للتكاثر الهائل لهذه الخطوط وكذلك للتمييز الجوهرى لخلايا الدم الناضجة عن هذه الخطوط. ولأن عوامل النمو في نظام تكوين الدم (hematopoietic) توجد بكميات صغيرة، فإن كشف وتوصيف

عدداً كبيراً من الأسماء تم ابتكاره لترمز إلى عدد أصغر من هذه العوامل . وعلى سبيل المثال،
ناتج دمج المصطلحات ؛

IL-3, BPA, عديد -CSF, HCGF, MCGF و PSF

جميعها كلمات مركبة من الحروف الأولى لكلمات أخرى (acronyms) والتي يعتقد حالياً بأنه
٥ يمكن استخدامها في أحد عوامل نمو تكوين الدم في الفأر .

وكذلك أنظر Metcalf, Scilnce, 229, 116-22 (1985). Burgess, et al. J. Biol. Chem.,
252, 1988 (1977), Das, et al. Blood, 58, 600 (1980), Ihle, et al., J. Immunol., 129, 2431
(1982), Nicola, et al., J. Biol. Chem., 258, 9017 (1983), Metcalf, et al., Int.J. Cancer, 30,
773 (1982) and Burgess, et al. Int. J. cancer, 26, 647 (1980),

١٠ والتي تتعلق بمختلف الجليكوبروتينات (glycoproteins) المنظمة لنمو الجرذ .

إن تطبيق تقنيات إعادة الإتحاد الجيني genetic أخرج بعض الحالات من هذا الاختلاط مثال
الحمض الأميني amino acid وسلاسل DNA لهرمون (erythropoietin) لنظام تكوين خلايا
cells الدم الحمراء للإنسان والتي تحت إنتاج كرات الدم الحمراء المتحصل عليها .

١٥ (أنظر لين (See, lin, PCT published Application No. 85/02610, Published June 20, 1985)
الطلب المنشور PCT رقم ٢٦١٠/٨٥ . المنشورة في ٢٠ يونيو (١٩٨٥) . كذلك استخدمت طريقة

إعادة الإتحاد الجيني genetic لفصل cDNA لعامل الحث لإنتاج الخلية الحبيبية الملتزمة
(granulocyte-macrophage). أنظر . لي وآخرون وونج وآخرون Lee, et al., Proc. Natl.

Acad. Sci- (USA), 82, 4360-4364 (1985) and Wong, et. Al., Scilnce, 228, 810-814
(1985) . أنظر أيضاً يوكوتا وآخرون Yokota, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81,

٢٠ 1070 (1984) . فنج وآخرون Fung, el al., Nature, 307,233 (1984) . وجوف وآخرون

Gouph et al., Natre, 309,763 (1984) المتعلقة بإنتاج جينات الفأر بالإضافة إلى كوازكي

وآخرون (1985) Kawasaki, et al., Science, 230,291 المتعلقة بخلايا الإنسان M-CSF .

وثبت وجود عامل نمو في نظام تكوين الدم يسمى بعامل الحفز (hp CSF) لإنتاج خلايا متعددة الفعالية لدى الإنسان ويمكن رؤية هذا العامل في وسط لاستزراع الخلايا السرطانية لمثانة الإنسان ويشار إليها بالرقم ٥٦٣٧ وهي مرسبة تحت شروط صارمة في وسط تزرع جميعي من النوع الأمريكي

Rockville, Md. As A.T.C.C. Deposit No. HTB-9

- وقد أفادت تقارير بأن هذا العامل (hpCSF) تمت تنقيته من خط هذه الخلايا cells لحفز التكاثر والتمايز بين الخلايا المنتجة متعددة الفعالية والتي تؤدي إلى إنتاج جميع أنواع خلايا cells الدم الرئيسية في تحاليل واختبارات باستخدام نخاع العظام من الخلايا المنتجة لدى الإنسان. ولت وآخرون (1985) Welt, et al., Proc. Natl. Acad. SCI (USA), 82, 1526-1530 . تنقية العامل hpCSF المستخدم : ترسيب $(NH_4)_2 SO_4$ ، التصوير الكروماتوجرافي chromatography لعملية تبادل الأيونات anion (DEAE - سليولوز cellulose ، DES2 وترشيح الهلام gel "الجل") عمود ACA54 ، و C18 الطور العكسي لكروماتوجرافيا السائل liquid chromatography عالي الأداء . البروتين protein المعروف بـ phCSF والذي تم سحبه في الذروة الثانية من ذرتي النشاط في أجزاء الطور العكسي لـ HPLC (الكروماتوجرافيا السائل عال الأداء) ، فقد ورد عنه أن له وزن جزيئي (MW) يبلغ حوالي ١٨٠٠٠ تم تقديره بواسطة دوديسيل كبريتات الصوديوم sodium dodecyl sulphate (SDS) وهلام بولي أكريلاميد (polyacrylamide) (الهجرة الكهربائية) (PAGE) والتي تستخدم صبغة الفضة. وقد ورد أنفاً لدى العامل hpCSF نقطة تعادل كهربية بالإضافة إلى نشاط تقاصلي على أولاً للـ hpCSF تساوي ٥,٥ في خطوط عوامل تكوين نمو الدم لدى الفأر [ولت وآخرون Welt, et al., Proc. Natl. Acad. SCI (USA), 82, 1526-1530

(1985) [وفاعلية عالية لتمييز لخط خلية سرطان الدم للخلية cell النخاعية وحيدة النواة لدى الفأر WEHI-3B D + [Welte, et al., UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology وآخرون] Gale, et al., eds., New Series, 28 (1985) وتشير الدراسات التمهيدية إلى أن العامل المحدد hpCSF يتميز بنشاط وفاعلية في إنتاج الخلايا cells الحبيبية خلال الأيام السبعة الأولى من تحليل CFU-GM للإنسان .

- وثمة عامل آخر، خاص بالإنسان CSF-B، تم فصله أيضاً عن خط الخلايا السرطانية لمثانة الإنسان (٥٦٣٧) وقد ورد وصفه كعامل حفزي لإنتاج الخلايا الحبيبية للفأر والمكتسبة بواسطة إشعاع ^{125}I (G-CSF) لتتحد مع الخلايا WEHL-3BD + cells في علاقة جرعة واستجابة مطابقة لتلك المستخدمة للفأر غير المكتسب للإشعاع (G-CSF) (نيكولا وآخرون ، NATURE ، ٣١٤ و ١٠. ٦٢٥ - ٦٢٨ (١٩٨٥)]. [Nicola, et al., Nature, 314, 625-628 (1985) وقد سبق وأن تم تسجيل العلامة بين الجرعة والاستجابة لتكون محددة خصيصاً وبمفردها للفأر غير المكتسب إشعاع G-CSF ولا تكون ضمن عوامل مثل M-CSF, GM-CSF أو عديد - CSF (نيكولا وآخرون ، proc, Natl. Acad. Sci. (USA), ٨١ ، ٣٧٦٥ - ٣٧٦٩ (١٩٨٤) أو متعددة العوامل . ويشار إلى أن CSF-B, G-CSF تعد أيضاً فريدة بين عوامل CSFS لأنهما تشترك معها بدرجة كبيرة في القدرة على التمييز والحفز التفصيلي لإنتاج الخلايا + WEHI-3BD. نيكولا وآخرون ١٥ Immunology Today ، ٧٦،٥ - ٨٠ (١٩٨٤). وعندما يكون عامل النمو G-CSF تتركيزات عالية، فإنه يكون محفزاً لإنتاج خلايا حبيبية ملتهمة جديدة (نيكولا وآخرون (١٩٨٤) [Nicola, et al., supra (1984) مع النتائج الأولية التي تشير إلى ظهور الخلايا الحبيبية وحيدة النواة وخليط الخلايا cells الحبيبية /وحيدة النواة والمحبة للماء (CFU-GEMM) بعد ١٤ يوماً من تزريع نخاع عظام الإنسان بواسطة hpCSF. وقد ورد أيضاً وصف CSF-B كعامل حفزي لنمو الخلايا ٢٠ والمتعادلة في تحليل خلايا نخاع عظم الفأر وهذه الخاصية أصبحت بمثابة معيار للتعرف على العامل بحسياته G-CSF. وبناءً على أوجه الشبه المتقدم ذكرها تم التعرف على العامل G-CSF

(عامل حفز لإنتاج الحبيبية (نيكولا وآخرون NATURE ٣١٤ و٦٢٥-٦٢٨ (١٩٨٥) Nicola, et al., Nature, 314, 625-628 (1985).

ويبدو من واقع الخواص العامة أن العامل لإنتاج خلايا celss الدم لدى الإنسان CSF-B والتي حددها لنيكولا Nicila وآخرون SUPRA و HPCSF العامل المحدد من قبل ولت وآخرون • Welte, et, al., supra هما نفس العامل الذي يمكن تفضيله ولت كعامل حفزي لإنتاج الخلايا الحبيبية (hpG-CSF). وقد يكون من المرغوب فيه بوجه خاص أن يتم تحديد الصفات والخواص للعامل بالاتحاد بين عناصر مختلفة وذلك عطفاً على (hpG-CSF) وإنتاجه ما ورد عن وزره (G-CSF) لدى الفأر على الكبت التام والمنع الكامل لانتشار الخلايا cells السرطانية + WEHL-3BD بحيث تكون في معدلات تركيز عادية وطبيعية للغاية وكذا القدرة المدونة لمستحضرات G-CSF للفأر في الحقن على الحد من نقل الليوكيما leukemia النخاعية في الخلايا cells المزروعة ١٠ في الفئران. (ميتكالف والعلوم ، ٢٢٩ و ١٦-٢٢ (١٩٨٥) Metcalf, Scilnce, 229, 16-22 (1985). أنظر أيضاً سانشس الأمريكية ٢٨٤ (١) ، ٤٠-٤٧ (١٩٨٦) Sachs, Scientific (1986). American, 284(1), 40- 47 . وإلى الحد الذي يمكن عنده البرهنة على القيمة الدوائية أو الأهمية العلاجية للعامل (hpG-CSF) ومن ثم إثبات ضرورة توفيره بكميات تجارية فإن من غير المرجح أن تقضي عملية فصل الخلايا من وسائط الاستزراع المخبري إلى توفير كميات كافية وأن تكون مصدراً للمادة المطلوبة ومن الجدير بالملاحظة على سبيل المثال أن القيود والمحاذير تظهر ضد الاستخدام التجاري لبنك خلايا أورام الإنسان مثل خط الخلايا cells السرطانية لمثانة الإنسان ٥٦٣٧ (A. T. C. C. HTB9) والمسجلة كمصدر طبيعي hpCSF المفصولة لدى ولت وآخرين ١٩٨٥ ر سوبرا (Welte, et al., Supra (1985).

الوصف العام للاختراع

يقدم الاختراع الحالي وصفاً للتشفير التسلسلي الجزئي أو الكلي لسلسلة متبقيات الحمض

الأميني amino acid لـ hpG-CSF ويشتمل ذلك على ما يلي :

إدماج الشفرات "كخيار مفضل" للتعديل الجيني genetic باختيار مستقبلات من غير الثدييات

٥ وإمداد مواقع التكسير بإنزيمات الأندونوكليز (endonuclease enzymes) وتزويد بسلاسل حمض

نووي إضافية أولية ونهائية ووسيلة مما يسهل من بناء حوامل التعديل الجيني genetic. ويوفر

الاختراع الحالي أيضاً تشفيراً لسلاسل الحمض النووي للتعديل الجيني الميكروبي لعدة

الببتيدات Polypeptide المشابهة أو مشتقات hpG-CSF والتي تختلف عن الأشكال الموجودة في

الطبيعة من حيث التحديد والمطابقة أو من حيث موقع واحد أو أكثر من متبقيات الأحماض

١٠ الأمينية amino acid. (مثل شطب المشابهات المحتوية على عدد يقل عن المتبقيات في hpG-

CSF مثل hpG-CSF [Ser¹⁷] حيث يتم بتعديل واحد أو أكثر من المتبقيات بأخرى. والمشابهات

الإضافية، وحيث يضاف واحد أو أكثر من متبقيات الأحماض الأمينية amino acid إلى الجزء

النهائي أو المتوسط من عديد الببتيدات (Polypeptide) والذي له نصيب في جزء أو جميع خواص

التكوينات الطبيعية .

١٥ وتشتمل التسلسلات الجديدة للحمض النووي بموجب هذا الاختراع على سلاسل مفيدة في

تأمين التعديل الجيني genetic للخلايا البكتيرية المستقبلة (Procaryotic) أو (eukaryotic)

لمنتجات عديد الببتيدات Polypeptide والتي لها على الأقل جزء من التكويني النباتي وواحد أو

أكثر من واحد من الخواص البيولوجية للعوامل الحفزية لإنتاج الخلايا cells الحبيبية متعددة

الفعالية الطبيعية. وتحديداً تشتمل (سلاسل DNA لهذا الاختراع على :

٢٠ أ- سلسلة DNA الموضحة في شكل (٢) و (٣) أو الشرائط المتممة لها.

ب- سلسلة DNA المهجنة hybridizes (تحت ظروف تهجين hybridization على نحو ما ورد شرحه تفصيلاً هنا أو في ظروف وشروط أكثر تحديداً) إلى سلاسل DNA في شكل (٢) أو أجزاء من ذلك المصدر .

ج- سلسلة DNA والتي لانهلال الشفرة الجينية genomic يجب أن تهجن إلى سلاسل DNA في شكل (٢). وتحديداً، يشتمل الجزء (ب) على التشفير التسلسلي لعديد الببتيدات Polypeptides والتي لها نفس ترتيب الحمض الأميني amino acid وهي سلاسل الحمض النووي والمنطوية على عوامل وراثية في أشكال متقاربة التنوع من hpG-CSF والأصناف الأخرى لعامل حفز نمو الخلايا cells الحبيبية متعددة الفعالية للدم في الثدييات وخصوصاً الواردة منها في الجزء (ج) والتي تكون التشفير التسلسلي (encoding) hpG-CSF لمشابها أجزاء من hpG-CSF. حيث ١٠ تريح تشفيرات سلاسل الحمض النووي لتسهيل ترجمة الناقل RNA إلى المستقبلات الميكروبية. ويمكن بناءً على مثل هذه السلاسل المصنعة مخبرياً حسب طريقة ألتون وآخرين PCT طلب النشر WO ٨٣/٤٠٥٣ WO No. 83/04053 Alton, et al., PCT published application

ويشتمل الاختراع الحالي على نوع من عديد الببتيدات polypeptides المضمنة في التشفير التسلسلي للحمض النووي المكمل للشريط العلوي من الحمض النووي CDNA للإنسان أو سلاسل الحمض النووي DNA لعوامل الوراثة الواردة في الجداول ٧ أو ٨ بطريقة أخرى "المتهم المكمل ١٥ للبروتينات proteins المقلوبة" كما وصف بواسطة ترامونتانو وآخرين Tramontano, et al., Nucleic Acids Res., 12, 5049-5059 (1984)

يقدم الاختراع الحالي منتجات تمديد الببتيدات polypeptides في صورة نقية ومنفصلة تمتلك جزء من أو كل التكوينات البنائية الأولية (بطريقة أخرى ترتيب مستمر في متبقيات الأحماض ٢٠ الأمينية amino acid) وواحد أو أكثر من الصفات الحيوية (مثل الخواص المناعية وفي خارج الجسم الحي والفاعلية الحيوية). والخواص الطبيعية الفيزيائية (مثل الوزن الجزيئي) لـ hpG-

CSF الطبيعية والمشتملة على تنوعات متقاربة من ذلك المصدر. وتتميز عديدات الببتيدات polypeptides المذكورة بإنتاج الخلايا البكتيرية bacterial cells المستقبلة (prokaryotic) أو eucaryotic مثل البكتيريا bacterial أو الخميرة أو الخلايا المزروعة وخلايا الحشرات والنباتات بسلاسل الحمض النووي الخارجية التي يتم الحصول عليها بالعوامل الوراثية أو DNA أو بواسطة تخليق الجين exogenous. وإن نواتج الخميرة (مثل سكاروميسيس سرقيسيا Saccaromyces cerevisiae) أو الخلايا البكتيرية المستقبلة (Procaryotic) (مثل ايسشيريثا كولي Escherichia) تكون حرة وغير متحدة مع بروتينات Proteins الثدييات. أما منتجات التعديل الجيني genetic الميكروبي للفقاريات مثل (الطيور - الثدييات غير الإنسان) فتكون حرة وغير متحدة مع أي بروتين Protein آدمي. وبناءً على المستقبل المستخدم ، فإن عديد الببتيدات polypeptides لهذا الاختراع قد تحدث له عملية جليكوزيلين (glycosylated) مع الثدييات أو كربوهيدرات (carbohydrated) أيوكربوتيك (الخلايا البكتيرية المستقبلة الداخلية (eucaryotic) أخرى أو قد تكون غير - جليكوزيلين (glycosylated) . وتحتوي عديدة الببتيدات Polypeptides لهذا الاختراع على متبقيات حمض الأمينو ميثونين الأولي (عند الموضع ١- methionine amino acid) .

يشتمل هذا الاختراع أيضاً على التركيبات الدوائية المشتملة على كميات فعالة من منتجات عديدة الببتيدات polypeptides لهذا الاختراع مع مواد تخفيف مناسبة ومساعدة و/أو حاملات مفيدة في hpG-CSF العلاجي .

ويمكن "تصنيف" منتجات عديدة ببتيدات polypeptides لهذا الاختراع بواسطة المواد المعلمة التي يمكن الكشف عنها بالإشعاع (مثل ذلك ^{125}I المشع) لإعطاء مواد مفيدة في التقدير والتعين الكمي لـ hpC-CSF للإنسان في الأنسجة الصلبة والعينات السائلة مثل الدم أو البول. كذلك، يمكن أن تصنيف منتجات DNA لهذا الاختراع بواسطة علامات كاشفة (مثل المواد المشعة والنظائر غير المشعة مثل البيوتين (biotin) كما تستخدم في عمليات تهجين hybridization

DNA (الحمض النووي) لتحديد موضع جين hpG-CSF (gen) للإنسان أو أي موضع يتعلق بخريطة الكروماتومات chromosomal map . وقد يستخدم هذه المنتجات أيضاً لتحديد الاضطرابات وأوجه الخلل الوراثية المرتبطة بالعامل hpG-CSF عند مستوى DNA ويستخدم كعلامة جينية genomic لتحديد الجينات المجاورة وأوجه الخلل بها .

- ٥ . وقد تكون منتجات عديدة الببتيدات polypeptides للاختراع الحالي مفيدة على أفرادها أو باتحادها مع عوامل نظام تكوين الدم أو أدوية لعلاج حالات عدم الانتظام في تكوين الدم مثل الإنيميا anemia عديمة الحيوية كما أن المنتجات قد تكون مفيدة في علاج العجز في نظام تكوين الدم من خلال المعالجة الكيميائية أو من خلال المعالجة الإشعاعية . وعلى سبيل المثال فإن عملية وزراعة نقل نخاع العظام تزداد احتمالات نجاحها عند استعمال hpG-CSF ، فضلاً عن هذا فإن (التنام جروح الحروق وعلاج الالتهابات البكتيرية) وتطبيق واستعمال hpG-CSF قد يكون مفيداً أيضاً في علاج اللوكيميا leukemias (سرطان الدم) بناءً على القدرة على تمييز خلايا اللوكيميا leukemic cells . ولت وآخرون , Welt, et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 82, 1526-1530 (1985) وساش Sachs, supra .

- ١٥ . ويمكن أن تتضح العديد من المظاهر والمميزات لهذا الاختراع في الوصف التفصيلي الذي يصور ويجسد استعمالات وتطبيقات الاختراع في أمثلة استخدامها المفضلة حالياً .

شرح مختصر للرسومات :

الشكل (١) عبارة عن خريطة إنزيم enzyme تجزئة لحمض جزئياً للمورث hpG-CSF المصحوب بصفوف وفقاً لإستراتيجية الترتيب للحصول على سلسلة العوامل الوراثية .

الأشكال من (٢) إلى (١٠) عبارة عن سلاسل DNA وفقاً للاختراع .

الوصف التفصيلي :

طبقاً للاختراع الحالي فإن التشغير التسلسلي الجزئي أو الكلي لسلسلة عديد ببتيدات polypeptides للـ hpG-CSF قد تم فصلها وتميزها .

وقد يتم تقديم الأمثلة بطريقة من خلال إبقاء الضوء على مصور الاختراع هي مواجهة تحديداً نحو الخطوات والإجراءات التمهيدية المتحددة المترتبة على هذا التعرف والتعيين ونحو ترتيب التسلسل وتطور النظم المعبرة المبينة على cDNA ، ومجموعة العوامل الوراثية أو الجينات المصنعة (مخبرياً) وإثبات التكوينات البنائية للعامل hpG-CSF والنتائج المشابهة في هذا النظام وأمثاله .

وعلى الأخص ، فإن المثال (١) موجه إلى ترتيب الحمض الأميني amino acid للـ hpG-CSF .

مثال (٢) :

موجة نحو تحضير cDNA للفحص الجماعي للتهجين hybridization وإنتاج الخلايا المهجنة.

مثال (٣) :

يتعلق بشكل مجسمات hybridization probes وحدات فحص بنائية التهجين hybridization.

مثال (٤) :

يتعلق بالفحص الجماعي والفرز للتهجين hybridization ومطابقة المجموعات الموجبة وسلسلة الحمض النووي DNA لمجموعة cDNA (clones) المستسخة الموجبة وتوليد التكوينات البنائية الأولية لعديدات ببتيدات polypeptides (ترتيب الأحماض الأمينية amino acid) .

مثال (٥) :

موجه إلى التعرف على التشفير التسلسلي لمجموعة العوامل الوراثية المشفرة hpG-CSF. وتحديد التسلسل لتلك العوامل .

مثال (٦) :

موجه إلى التشفير التسلسلي وتصنيع hpG-CSF حيث تستخدم E.coli .

مثال (٧) :

موجه لخطوات بناء E.coli ناقل مريح مع العامل مع hpG-CSF مع DNA استعمال الناقل في إنتاج الخلايا البكتيرية المستقبلية والقابلة للتعديل مع hpG-CSF وتحليل خواص نواتج الاتحاد الجيني genetic لهذا الاختراع .

مثال (٨) :

موجه إلى خطوات إنتاج مشابهاة للعامل hpG-CSF حيث يتم تبديل متبقيات حمض السيستين cysteine acid بمتبقيات حمض أميني آخر بواسطة الطفرة التي تظهر على تسلسل الحمض النووي DNA في hpG-CSF والتشفير التسلسلي لهذا العامل .

مثال (٩) :

موجه لخطوات بناء مشتقات الناقل المشتملة على العامل hpG-CSF والترميز التناظري في الحمض النووي المشتق من مجموعة خلايا cDNA الموجب واستخدام الناقل لنقل خلايا COS-1 cells بالتزريع .

مثال (١٠) :

يتعلق بالخواص الفيزيائية والبيولوجية physical and biological أو منتجات عديد ببتيدات Polypeptides المتحدة مرة ثانية وفقاً لهذا الاختراع .

مثال ١

أ- ترتيب المادة بأساليب المسح الأدبي .

يتم الحصول على عينة (٣- ٤ ميكرو جرام نقية بنسبة ٨٥-٩٠٪ للـ SDS، صبغة الفضة
(page - من hpG-CSF من معهد سلوان كيتلينج ، نيويورك، نيويورك Sloan Ketering New
(York, N.Y.,) وتفضل وتتقى كما ورد في طريقة ولت وآخرين ، Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 82, 1526-1530 (1985).

١٠ إن تسلسل الحمض الأميني amino acid المنتهي بـ العينة للعامل hpG-CSF يتم تحديده في
عملية تشغيل Run #1 بتحليل ذي تسلسل مصغر باستخدام وحدة تسلسل مراحل الغاز AB407A
gas phase (النظم الحيوية التطبيقية مدينة فوستر ، كاليفورنيا Foster City, Calif) للحصول على
معلومات عن التسلسل على نحو ما ورد في الجدول ١ أدناه. وفي الجداول من ١ إلى ٤، تستخدم
الرموز أحادية الحروف (المكونة من حرف واحد) حيث أن "X" تمثل المتبقيات التي تم تحديدها
بطريقة واضحة (غير غامضة) في حين أن المتبقيات بني الأقواس تم تحديدها وتخصيصها
بطريقة تبادلية أو تقريبية وتجريبية .

جدول ١
1 5 10 15
K-P-L-G-P-A-S-K-L-K-Q-(G,V,S)-G-L-X-X-X

١٥ كانت هنالك خلفية واضحة موجودة في كل حلقة من حلقات التشغيل التعاقبي الذي نجمت
عنه النتائج المسجلة في الجدول (١) والتي تشير إلى أن العينة تحتوي على العديد من الشوائب
والعناصر المفسدة للخلايا cells والتي قد تكون في شكل متبقيات كيميائية من عملية التنقية
والتسلسل محفوظ للاستخدام كمرجع فقط . في التشغيل رقم ٢ Run #2 تم الحصول على العينة
٢٠ الثانية (٥-٦ ميكرو جرام - ٩٥٪ نقاوة) من سلوان كينبرينج على غرار ما تم في Run #1

وخطوات التسلسل أيضاً كما ورد في الشكل ٤ (FIG. 4) لولت ، وآخرين . Welt, et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 82, 1526-1530 (1985). يشتمل جدول ١١ على النتائج .

جدول (٢)

1	5	10	15	20
T-P-L-G-P-A-S-(S)-L-P-Q-(S)-M-(M)-X-K-(R)-X-X-(R)-(L)-X-				

وبرغم أنه تم تحديد المزيد من المتبقيات أكثر فإن التشغيل رقم #2 Run لم يقدم تسلسلات بأطوال كافية وغير غامضة تمكن من بناء العدد الكافي من المجسات ليحث تسلسل الحمض النووي DNA والعامل hpG-CSF وحيث تم حسابه ما تقدم فانضم أنها ينبغي أن لا تقل عن ١٥٣٦ مجسماص (Probes) هي الجديد الأدنى المطلوب لعملية فصل تسلسل الحمض cDNA

١٠ بناءً على الترتيب في الجدول ٢ ومرة أخرى يعتقد أن المشكلة تكمن في تلوث العينة .

وبناءً على ذلك تم الحصول على العينة الثالثة (٣-٥ ميكروجرام نقاوة بنسبة ، ٤٠٪) وذلك من سلوان كبتيرينج Sloan Kettering كما ورد أعلاه. وقد تم هذا الترتيب كهربائياً بعد الفصل عن طريق SDS- PAGE في محاولة لتحقيق المزيد من النقاوة (الحلو من الشوائب) بيدان التحليل التسلسلي لهذا العينة لم يسفر عن أي معلومات .

١٥ ب- ترتيب المواد بواسطة طرق التنقيح/ الأساليب المنقحة

للحصول على كمية كافية من المادة النقية اللازمة لإجراء تحليل صحيح ودقيق لسلسلة الأحماض الأمينية amino acid فقد تم الحصول على خلايا من مثابة مصابة بالسرطان خط الخلية ٥٦٣٧ (مجموعة الخلايا الفرعية 1A6) المنتجة حسب سلوان كبتيرينج Sloan Kettering وذلك من الدكتور/ إي - بلاترين E. Platzer . في البداية تم توزيع الخلايا في وسط Iscove's (GIBCO ، ايسلاندا ر نيويورك Grand Island, N.Y) في دوارق/ زجاجات تحتوي كل واحدة ٢٠

منها على ٢٥٪ من وسط Iscove's المكيف تحت CO_2 ٥٪ تنمو الخلايا طوال الليل عند ٣٧ درجة مئوية عند ٠,٣ لفة في الدقيقة .

تم غسل وتعقيم حبيبات Cytodex-1 (فرمسيا Pharmacia ، أو بسالا Uppsala ، السويد (Sweden) بإتباع الخطوات التالية :-

- ٥ تم وضع ٨ جرام من الحبيبات في زجاجة وأضيف إليها ٤٠٠ مللي لتر من PBS. تحول الحبيبات في محلول عن طريق تدويرها برفق لمدة ٣ ساعات وبعد أن يسمح الحبيبات بالترسيب ويزال PBS وتغسل الحبيبات في PBS ويضاف PBS آخر. تعقم الحبيبات بالبخار لمدة ١٥ دقيقة وقبل الاستعمال تغسل في وسط Iscove's مع ١٠٪ من FCS للحصول على الحبيبات المعالجة.
- بعد إزالة الكل ماعدا ٣٠ مللي لتر من وسط المعالجة بكل زجاجة ، يضاف ٣٠ مللي لتر من الوسط المهجن حديثاً مع ١٠٪ FCS و ٤٠ مللي لتر من الحبيبات المعالجة إلى الزجاجات .
- ١٠ ويتم تمرير الغاز gassed في الزجاجات ٥٪ CO_2 وتزال الفقاعات عن طريق الشفط . توضع الزجاجات في حامل دوار بمعدل ٣ دورات في الدقيقة وذلك لمدة ٢/١ ساعة قبل تقليل السرعة إلى ٠,٣ دورة في الدقيقة .

- وبعد ثلاث ساعات يضاف دورق آخر trypsinized لكل زجاجة مستديرة تحتوي على الحبيبات وعند الوصول على ٤٠٪ إلى ٥٠٪ من الجمع تغسل الخلايا المزروعة داخل الزجاجات بواسطة ٥٠ مللي لتر من PBS ويتم تدويرها بعشر دقائق قبل إزالة PBS. وتزرع الخلايا cells لمدة ٤٨ ساعة في وسط تزرع (Iscove's) المحتوي على ٠,٢٪ FCS ، هيدروكورتيزون hydrocortisone ١٠-٨ مولي ، ٢ ملي مولي جلوتامين glutamine ١٠٠ وحدة/ملي لتر بنسيلين Penicillin و ١٠٠ جرام/ملي لتر سترپتومييسين (streptomycin). ويتم بعد ذلك حصد المزرعة بواسطة القوة الطاردة المركزية عند ٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٥ دقيقة
- ٢٠ ويحفظ عند - ٧٠ مئوية. يعاد تغذية المزارع من خلال الوسط A المحتوي على ١٠٪ من FCS

وتزرع لمدة ٤٨ ساعة في ذات الوسط. وبعد إخلاء الوسط وإزالته تغسل الخلايا بواسطة PBS على نحو ما ورد أعلاه وتزرع لمدة ٤٨ ساعة في الوسط A ثم يعاد حصد الصافي ويعالج كما تم وصفه آنفاً .

يتم تركيز حوالي ٣٠ لتر من الوسط المكيف بواسطة خلايا IAb بحيث يكون التركيز بمعدل ٢ لتر بوحدة الملي بوربليكون Pellicon المجهزة بعدد ٢ كاسيت يبلغ وزنها الجزيئي ١٠٠٠ وحدة عند سرعة ترشيح تصل إلى ٢٠٠ مللي/دقيقة وعند سرعة تجريبية بمعدل ١٠٠٠ مللي لتر/ في الدقيقة الواحدة . ويتم ترشيح المركبات ترشيحاً ثنائياً بواسطة ١٠ لتر من ٥٠ مللي مولر التريس (pH 7.8) باستخدام نفس الجهاز ونفس معدلات السرعة. ويتم تحميل التركيزات المرشحة بمعدل ٤٠ مللي لتر في الدقيقة الواحدة على عمود DE-سيللوز cellulose ١ لتر مضبوط في ٥٠ ملي مولر تريس (pH 7.8) . وبعد التحميل يغسل العمود بنفس السرعة بواسطة ١ لتر من ٥٠ مللي مولر تريس (pH 7.8) ثم بواسطة ٢ لتر من ٥٠ مللي لتر مولر تريس (pH 7.8) وبواسطة ٥٠ مللي مولر من كلوريد البوتاسيوم NaCl. وبعد ذلك يشطف العمود بترتيب تسلسلي بواسطة ست محاليل بمقدار لتر واحد من ٥٠ مللي مولر تريس (pH 7.8) على أن تشمل على التركيزات الآتية من كلوريد البوتاسيوم NaCl: ٧٥ ، ١٠٠ ، ١٢٥ ، ١٥٠ ، ٢٠٠ و ٣٠٠ ملي مولر . ويتم تجميع الأجزاء ٥٠ ملي لتر وتركيز الأجزاء الفعالة إلى معدل ٦٥ مللي لتر على مرشح Amicon مزود بغشاء YM5 . ومن ثم فإن هذه التركيزات تحمل من عمود AcA54 على ٢ لتر مرشح جل معايير في PBS . ويتم تشغيل العمود بمعدل ٨٠ مللي لتر في الساعة. ويجمع ١٠ أجزاء من الملي لتر. أما الأجزاء الفعالة فإنها تجمع وتحمل مباشرة على عمود HPLC C4 الكروماتوغرافي السائل عالي الفعالية .

وتم تحميل عينات ، تتراوح من حيث الحجم بين ١٢٥٤ مللي لتر و ٨٥٠ مللي لتر وتحتوي على ٨-١ مللي جرام من البروتين Protein ، يمثل حوالي ١٠٪ من كل منها hpG-CSF حيث يتم التحميل على عمود بسرعة سريان تتراوح من ١ إلى ٤ مللي لتر في الدقيقة. وبعد التحميل

والغسيل الأولي بواسطة ٠,١ مولر اسيتات الأمونيوم ammonium acetate (pH 6.0-7.0) في ٨٠٪ ٢- بروبانول Propanol-2 عند سرعة سريان ١/ملي لتر/ دقيقة يتم جمع الأجزاء ١ ملي لتر لكل جزء يتم الكشف ومراقبتها بالنسبة للبروتين Protein عند ٢٢٠، ٢٦٠ و ٢٨٠ نانوميتر .

٥ ونتيجة لعملية التنقية يتم الفصل بين جزيئات تحتوي على hpG-CSF (كأجزاء ٧٢ و ٧٣ من ٨٠) وتميزها بوضوح من الأجزاء المحتوية على البروتين Protein . ويتم عزل hpG-CSF (١٥٠-٣٠٠ ميكرو جرام) بدرجة نقاوة تتراوح بين ٨٥-٥٠٪ بناتج يبلغ حوالي ٥٠٪ . من هذه المادة النقية تستخدم ٩ ميكرو جرام في عملية المعالجة Run #4 . عملية تحليل سلسلة متبقيات الأحماض الأمينية amino acid حيث تستخدم عينة البروتين Protein داخل قرص ألياف زجاجية يتم تنشيطها عن طريق TFA - بدون بولي برين Polybrene . ويتم تحليل التسلسل بواسطة وحدة ترتيب متسلسل AB 470A طبقاً لطرق هيويك وآخرين Hewick, et al., J. الحيوية ٢٥٦، ٧٩٩٠-٧٩٩٧ (١٩٨١) ولاي Anal. Chim. Acata ١٦٣، ٢٤٣-٢٤٥ (١٩٨٤) . ناتج Run #4 يظهر في الجدول (٣) .

1	5	10	
Thr - Pro - Leu - Gly - Pro - Ala - Ser - Ser - Leu - Pro-			جدول (٣)
	15	20	
Gln - Ser - Phe - Leu - Leu - Lys -(Lys)- Leu -(Glu)- Glu-			
	25	30	
Val - Arg - Lys - Ile -(Gln)- Gly - Val - Gly - Ala - Ala-			
Leu - x - x -			

١٥ وفي عملية المعالجة Run #4 بعد ٣١ دورة (لما يعادل متبقيات جدول ٣) لا يتم الحصول على أي معلومات ذات أهمية عن الترتيب التسلسلي لسلسلة المتبقيات . وللحصول على ترتيب تسلسلي أطول وغير غامض في عملية المعالجة Run #5 ، يتم تخفيض ١٤ ميكروجرام من pHG-CSF تمت تقنياتها من وسط ملائم ويتم اختزالها بواسطة ١٠ ميكرو لتر من بيتا- ميركبتو إيثانول β- mercaptoethanol لمدة ساعة عند ٤٥/ درجة مئوية وتحت وحدة تجفيف خوائية.

وبعد ذلك تذاب بقايا البروتين Protein مرة أخرى في ٥٪ من حمض الفورميك formic acid قبل الاستعمال في قرص الألياف الزجاجية بولي برينيزيد Polybrenized glass. يتم إجراء تحليل تسلسلي على غرار ما تم في عملية المعالجة Run #4 أعلاه يشتمل الجدول ٤ على نتائج عملية المعالجة Run #5 .

٥ جدول (٤) :

1	5	10
Thr - Pro - Leu - Gly - Pro - Ala - Ser - Ser - Leu - Pro -		
	15	20
Gln - Ser - Phe - Leu - Leu - Lys - Cys - Leu - Glu - Gln -		
	25	30
Val - Arg - Lys - Ile - Gln - Gly - Asp - Gly - Ala - Ala -		
	35	40
Leu - Gln - Phe - Lys - Leu - Gly - Ala - Thr - Tyr - Lys -		
	45	
Val - Phe - Ser - Thr - (Arg) - (Phe) - (Met) -X-		

إن سلسلة متبقيات الحمض الأميني amino acid الواردة في جدول ٤ غير غامضة وذات طول يبلغ (٤٤ متبقية) وهو طول يكفي لبناء مجسمات للحصول على hpG-CSF cDNA كما ورد وصفه .

مثال ٢

تشتمل الخطوات القياسية لعزل سلسلات الحمض cDNA على تحضير مجموعة سلسلات حاملة للبلازميد بورن "libraries" cDNA المشتق من النسخ العكسي للـ mRNA في الخلايا cells المانحة والتي يتم انتخابها على تعبيرها عن الانتقال الجيني genetic المقصود . وعندما تكون الأجزاء الكبرى لسلسلة متبقيات الحمض الأميني amino acid لعدد البيبتيدات Polypeptides معروفة ومصنفة ، يمكن استخدامها تسلسلات فردية ذات شريط واحد لفحص الحمض النووي DNA بمضاعفة السلسلة المستهدفة زوجياً في الحمض النووي ، وقد يستعمل تسلسل الحمض النووي cDNA في عمليات تهجين DNA/ DNA hybridization المطبقة الوحدات المستنسخة من cDNA التي تم تغيير طبيعتها إلى شكل شريط مفرد . ويسمان وآخرون

Weissman, et al., البراءة الأمريكية رقم ٤٣٩٤٤٤٣ ولاسي وآخرون Nucleic Acids Res
Wallace, et al., ٣٥٥٧ - ٣٥٤٣,٦ (١٩٧٩) وريس وآخرون Proc. Natl. Acad. Sci. Reyes,
Jaye, et al., (USA), ٣٢٧٠,٧٩ - ٣٢٧٤ - ٣٢٧٤ (١٩٨٢) وجاي وآخرون
Nucleic Acids Res. ٢٣٣٥ - ٢٣٢٥,١١ al., (١٩٨٣). انظر أيضاً البراءة الأمريكية رقم
٤٣٥٨٥٣٥ لفالكو وآخرون Falkow, et al., بالنسبة لخطوات تهجين (hybridization) فهي فعالة
في التشخيص ودافيس وآخرون Davis, et al., كتيب الهندسة الوراثية ، الجينات البكتيرية
المتقدمة معمل كولد سبرينج هاربر Cold Spring Harbor ، كولد سبرينج هاربر N.Y. Cold
Spring Harbor ، (١٩٨٠) عند صفحة ٥٥ - ٥٨ ، ١٧٤ - ١٧٦ المتعلق بالمستعمرات وتنقية
التهجين hybridization .

١٠ يستخلص كل RNA من حوالي ١ جرام من الخلايا cells في سلسلة خلايا سرطانية بالمئات
٥٦٣٧ (1A6) وذلك باستخدام خطوة الجوانيد بنيم ثيوسينات guanidinium thiocyanate للفصل
الكمي RNA . [شير جوين وآخرون Chirgwin, et al., ، الكيمياء الحيوي ٥٢٩٤,١٨ - ٥٢٩٩].

ويحتوي محلول RNA المائي المعقم على كل RNA من خلايا 1A6 . للحصول على RNA
الناقل فقط من محلول RNA الكلي يتم تمرير المحلول في عمود يحتوي على أوليغود يوكسي -
١٥ ثيميديليت [oligodeoxy-thymidylate (oligo(DT)) (بحث متكامل ، ولثام ، مساثوسيتس Inc.,

Waltham . عديد الأدينيلات (Poly- A+) يتتبع خواص rna إلى الناقل الذي
يلتصق بالعمود بينما يشطف RNA إلى ريبوسوم ribosomal . ونتيجة لهذه الخطوة فإن حوالي
٩٠ ميكرو جرام من البولي ادينيلات RNA Poly-adenylated الناقل يتم فصله (Poly-A+
mRNA) البولي - A+ RNA إلى الناقل المفصول يعالج عن طريق بهيدروكسيد ميثيل الزئبق

٢٠ methylmercury hydrocide (Alpha Ventron, Danvers, Mass.). عند التركيز الأخير ٤ مللي
مولي لمدة ٥ دقائق عند درجة حرارة الغرفة مثل استعمال في تفاعل cDNA المعالجة بواسطة
هيدروكسيد ميثيل الزئبق methylmercury hydrocide تفسد RNA الناقل في نفسه ومع جزيئات

التلوث والتي تثبط عملية النقل. بيبي وآخرون. Payvar, et al., J. Biol. Chem. ٢٨٥ ، ٧٦٣٦-٧٦٤٢ (١٩٧٩).

طبقاً لطريقة أوكاياما (أوكاياما وآخرون Okayama, et al., Molecular and Cellular Biology ٢ ، ١٦١-١٧٣ (١٩٨٢) تم إعداد بنك cDNA باستخدام mRNA الذي تم الحصول عليه من خلايا 1A6 المحمولة cDNAs بالتحضين إلى عائل للكائنات الدقيقة HB101 E. coli K- 12 للتكبير .

مثال (٣) :

إن مجسمات التهجين hybridization المصممة بناءً على ترتيب سلسلة الأحماض الأمينية amino acid النهائية في phG-CSF الواردة في الجدول ٤ تحتوي على ٢٤ أوليجو نيكلوتين oligonucleotides بكل منها ٢٣ قاعدة في الطول وتحتوي على ثلاثة من متبقيات أينوسين inosine . وصنع الأوليجو نيكلوتين oligonucleotides المجسات بطريقة كاثير ، وآخرين Caruthers, et al. الهندسة الوراثية ٤ ، ١-١٨ (١٩٨٢) ويتم تصنيفها بواسطة ^{32}p ATP باستخدام البولي نيكلويتد كينين Polynucleotide kinase . يلقي الجدول رقم ٥ الضوء على (probe) الأوليجو نيكلويتد oligonucleotides المجس المعادل الناقل من ٢٣-٣٠ للسلسلة الواردة في الجدول ٤ .

hpG-CSF Probes

جدول ٥ :

5' GC IGC ICC $\hat{\text{A}}\text{TC}$ ICC $\hat{\text{T}}\text{TG}$ $\hat{\text{A}}\text{AT}$ $\hat{\text{T}}\text{TT}$ 3'

إن عملية التعادل لـ Is تمت بناءً على العمل المنشور (تاكاشي وآخرين Takahashi, et J. al., proc. Natl. Acad. Sci (USA) ٢٦٠ ، ٢٦٠٥-٢٦٨ (١٩٨٥) . ومع ذلك فإن الإينوسين

inosines قد يكون ذا تأثير يفضي إلى عدم الثبات إذا تمت مزواجهته مع G أو T . وفي تاكاشي وآخرون Takahashi, et al., قد يكون كمجموعة مقارنة للتعاادل للإينوسين inosines تأثير متعاادل لأنها تميل إلى التعامل (أي ثلاثة يفضلون المزوجة مع ٢، واثنين لا يفضلون المزوجة مع T) لفحص تأثير الحصول على قاعدة I's متزاوجة مع G's. يتم تصميم تجارب ضابطة محكمة باستخدام التسلسل الجيني N-myc (genetic) والاستساخ . وأن السلسلة التي يتم الحصول عليها من جين N-myc (gen) يكون لها نفس المحتوى G و C في الموضعين الأولين من كل كودون codon كما وصف في مجسات hpG-CSF . ولذلك كانت مجسات الفحص N-mcy كمجسات hp-GCSF سواء بسواء من حيث الطول I's والأماكن الوجود متوسط الجهد Tm (٦٢- ٦٦ مئوية لا تشمل عملية عدد ٣ أو ٤ متبقيات إينوسين inosine) .

١٠ وتم تصميم مجموعتين من مجسات فحص N-myc لطريقة كروثيرس وآخرون سوبرا Caruthers, et al., supra. كما هو موضح في الجدول ٦ والمشمتم على : ١، ٢٣ mer ، ٢ استبدال الموضع الثالث في ٣ C's بواسطة I's يعطي أسوأ احتمال ٣ استبدال الموضع الثالث في ٤ C's بواسطة I's . أما المجموعة الثانية من مجسات الفحص فقد تم تصميمها لتمثل التوزيع الأكثر عشوائية لقاعدة الإينوسين inosines المزوجة والتي قد تعطي قاعدة عامة متعادلة ذات تأثير مزدوج . أن Set 11 كما هو موضح في جدول ٦ .

٤- تحتوي على اثنين I's مزدوجين مع C's وواحد مع G

٥- تشير إلى ٤ مع واحداً I : قاعدة مزدوجة

N-myc Test Probes

جدول ٦

1. 5' CAC AAC TAT GCC GCC CCC TCC CC3'
2. 5' CAC AAC TAT GCI GCC CCI TCI CC3'
3. 5' CAI AAC TAT GCI GCC CCI TCI CC3'
4. 5' AAC GAG CTG TGI GGC AGI CCI GC3'
5. 5' AAI GAG CTG TGI GGC AGI CCI GC3'

٢٠

تم تسخين خمسة مرشحات استنساخ منطوية تحتوي على سلاسل الحمض النووي N-myc DNA وسلاسل الحمض النووي DNA لهرمونات نمو الدجاج (كتحكم سالب) بموضعها في فرن مفرغ من الهواء (خوائي) لمدة ساعتين عند ٨٠ درجة مئوية قبل عملية التهجين hybridization. وتم تهجين hybridization جميع المرشحات على نحو ما ورد في مثال ٤ مجسات hpG-CSF باستثناء مدة التهجين hybridization التي كانت ست ساعات . ويتم غسل (المرشحات) الفلاتر ثلاث مرات عند درجة حرارة الغرفة عند ٤٥ درجة مئوية ١٠ دقائق لكل منها توصل المرشحات بعدد جيجر للمراقبة والرصد .

يلاحظ أن المرشح الذي يمثل N-myc ٣ صدرت عنه إشارة ضعيفة بالنسبة للفلاتر الأربعة الأخرى ولم يتم غسله بعد ذلك . بعد غسيل لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة تبلغ ٥٠ درجة مئوية. أعطى عداد جيجر إشارة بالنسبة المئوية التالية للمجس الأول المعادل بطبيعته إلى نسبة ١٠٠٪ : مجس ٢,٢٠٪ ، مجس ٣ (عند درجة حرارة ٤٥ مئوية) ٢٪ مجس ٤,٩٢٪ ، مجس ٥,٧٥٪ وبعد الغسيل عند ٥٥ درجة مئوية، فإن النسبة المئوية كانت على النحو التالي : ٢,١٦٪ مجس ٤ ، ١٠٠٪ مجس ٥,٨٠٪ أما الغسيل النهائي عند في حرارة تبلغ ٦٠ مئوية فقد أسفر عن النسب التالية : مجس ٢ : ١,٦٪ ، مجس ٤,٩٠٪ ، مجس ٥,٧٥٪ .

وعليه في وجود ثلاثة I's كما في المجسات ٢ و ٤ ، يلاحظ وجود اختلاف في الإشارة يصل إلى نسبة ٦٠- ضعفاً Tm (I's لا يؤخذ في الحساب) يميل إلى [حالة سيئة لازدواج القاعدة ١ (مجس ٢) وحالة الازدواج قاعدة متعادلة ١ (مجس ٤)] .

إن المعلومات التقنية القياسية التي تم الحصول عليها عن طريق تهجينات hybridizations اختبار N-mcy تستخدم في الغسيل كما تستخدم كمرشد لتهجين hpG-CSF hybridization كما هو موصوف أدناه وذلك لحساب درجة الثقة التي يمكن بها تقبل النتائج للغسيل غير المحكم. وعليه في وجود ثلاثة (I's) ، على غرار ما في المجسين ٢ ، ٤ يلاحظ هناك اختلافاً في الإشارة

يصل إلى ما مقداره ٦٠ ضعفاً عند الاقتراب من حد TM النظري (مع مراعاة عدم تضمين I's في عملية الحساب) وذلك [بناء على أسوأ حالة مزواجة للقاعدة ١ (المجس ٢) وحالة مزواجة متعادلة نسبياً (المجس ٤)] .

مثال ٤

- ٥ طبقاً لطريقة هانهان وآخرين Hanahan, et al., J. Mol., Biol., (الأحياء الجزيئية) ٥٥٧, ١٦٦ - ٥٨٠ (١٩٨٣) يتم إدخال بكتريا تحتوي على عناصر متقدم مدخلات cDNA محضرة حسبما ورد في مثال ٢ ويتم توزيعها ونشرها مرشح على ٢٤ نيترو سليولوز nitrocellulose أخرى (Millipore, Bedford, Mass.) محملة على ألواح أجار. وبعد ذلك يتم تحضين الألواح للحصول على نحو ١٥٠,٠٠٠ سلسلة من وتوضع على ألواح لمضاعفتها ٢٤ فلتر آخر من النيترو سليولوز nitrocellulose . تحضن الألواح حتى تظهر السلسلات الجديدة وتتضح معالمها. يتم نقل البكتيريا الموجودة على المرشحات بحيث تضع على ورق الوتمان (Whatman) مقاس ٣ مللي متر المشبع بهيدروكسيد الصوديوم sodium hydroxide (٠,٥ مولر) وذلك لمدة ١٠ دقائق يطف بعدل بواسطة تريس (١ مولر) لمدة دقيقتين ويلطف بعد ذلك بتريس Tris (٠,٥ مولر) يحتوي على كلوريد البوتاسيوم (NaCl) (١,٥ مولر) لمدة ١٠ دقائق أخرى. عندما تصبح المرشحات شبه جافة ، يتم تجميعها لمدة ساعتين عند ٨٠ درجة مئوية في فرن (خوائي) مفرغ من الهواء وذلك قبل تهجين الحمض النووي [وال وآخرون Welt, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) ٧٦ ، ٣٦٨٣ - ٣٦٨٧ (١٩٧٩) ومانياتس وآخرون Maniatis, et al., Cell ٨١ ، ١٦٣ - ١٨٢ (١٩٧٦) .

- ٢٠ وتتم عملية تهجين hybridization أولي للمرشح لمدة ساعتين بحرارة تبلغ ٦٥ درجة مئوية في ٧٥٠ مللي لتر من 10X Denhardt's ، ٢٪ SDS و 6X SSC . ويتم شطف المرشحات في 3 X SSC ثم يوضع كل أربعة منها في حقيبة ويتم تهجينها لمدة ١٤ ساعة في 6X SSC و 10 X

Denhardt's . هنالك حوالي ١٥ مللي لتر من المحلول لكل حقبة تحتوي على 50×10^6 cpm من ^{32}P للمجس (الأوليگو نيكلو تيدات oligonucleotides) .

وبعد التهجين hybridization تغسل المرشحات ثلاث مرات في 6 X SSC (١ لتر لكل غسلة) عند درجة حرارة الغرفة ولمدة ١٠ دقائق لكل منها . بعد ذلك تغسل المرشحات مرتين عند ٥٠ درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة لكل منها مرة عند ٥٠ درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة . المرة الثانية عند ٥٥ درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة باستخدام ١ لتر من 6 X SSC . يتم الكشف آلياً عن المرشح بواسطة تعريضه إلى الإشعاع وفي حرارة تبلغ ٧٠ درجة مئوية باستخدام شاشة تكثيف ضوء قوية وفيلم كوداك XAR-2 وفي هذه الطريقة وهي طريقة المخططات الإشعاعية الآلية الأوتوراد يوجرافي (autoradiograph) هنالك ٤٠-٥٠ إشارة موجبة تسجيل يتم الكشف عنها وتسجيلها وهي تشتمل على ٥ إشارات مكثفة جداً . ١٠

يتم كشف المساحات التي تحتوي على أقوى خمس إشارات وعلى خمس إشارات أخرى إضافية بحيث يتم مسحها من اللوحات الرئيسية ويعاد وضعها على لوحات للفصل الثانوي على شاشة ثانوية وذلك باستخدام نفس مخلوط المجسات وتحت نفس الظروف ووفق ذات الشروط. وتختلف طريقة الغسيل لجهة أن الغسيل عند درجة الحرارة العالية يشتمل على مرتين لواحدة عند ٥٥ درجة مئوية لمدة ١٥ دقيقة لكل منها ثم مرة واحدة عند ٦٠ درجة حرارة مئوية لمدة ١٥ دقيقة . وبناءً على دراسة المجس N-myc الوارد في المثال ٣ . كانت درجة الحرارة مرتفعة للغسيل الأخير في عملية الفرز الثانية ويعود ذلك إلى أن تجمع درجة حرارة الانصهار لكل من ٢٣-٢٤ mers كانت عند ٦٠-٦٨ درجة مئوية وهي مشابهة لدرجات حرارة مجسات . وبعد الغسيل عند درجة حرارة تبلغ ٥٥ درجة مئوية يتم تخفيف المرشحات ومن ثم إجراء الرسم التخطيطي الإشعاعي الآلي (أوتوراديو جرافي) للمرشحات. وبمقارنة هذا الرسم الإشعاعي الآلي مع رسم إشعاعي ثانٍ مأخوذ في نفس الزمن بعد الغسيل الأخير في حرارة تبلغ ٦٠ درجة مئوية اتضح أن اثنين فقط من الوحدات المستسخة العشر المفحوصة أي فقد في الإشارة عند حرارة ٢٠

تتراوح بين ٥٥-٦٠ درجة مئوية. وفيما بعد، أظهرت هاتان الوحدتان المستسختان تطابقاً يكاد يكون تاماً في الطول وفي إنماط الإيندوكليز endoclease التقييدية. وتم اختيار وحدة مستسخة واحدة للترتيب التسلسلي .

إن الترتيب التسلسلي للوحدات المستسخة Ppo2, hpG-CSF cDNA تم تحقيقه طبقاً لطريقة
أعلاه ، وتم انجازه بواسطة طريقة سانجير وآخرين ثنائي دي أوكسي Sanger, et al., Natl.
Acad. Sci. (USA) ٥٤٦٣,٧٤ - ٥٤٦٧ (١٩٧٧) .. وتم استخدام الشريط المفرد من DNA
phage M-13 كعامل نقل لتأمين لوحات الشريط المفرد DNA من الشريط المزدوج لغسيلات
cDNA المستسخة. سانجير وآخرون Sanger, et al., الطريقة المسلسلة في جدول ٧ عن طريق
ترجمة الحمض الأميني amino acid والشريط المكمل في منطقة تشفير عديد ببتيدات
Polypeptides ١٠ .

جدول ٧

تابع جدول

110 Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Gln Gln Leu Gly
 CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA
 GAC GTC GAC CTG CAG CCG CTG AAA CCG TGG TGG TGG TGG ACC GTC GTG TAC CTT CTT GAC CCT
 130 Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln
 ATG GCC CCT GCC CTG CAG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG
 TAC CCG GGA CCG GAC GTC GGG TGG CTC CCA CCG TAC GGC CCG ANG CCG AGA CGA AAG CTC
 150 Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Gln Val Ser Tyr
 CGC CGG GCA GGA GGC GTC CTG GTP GCC WCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC
 GCG GCC GGT CCT CCC CAG GAC CAA CCG AGG AGG GTA GAC GTC TCG AAG GAC CTC CAC AGC ATG
 170 Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro OP 174
 CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC TGA GCC AAG CCC TCC CCA TCC CAT GTA TTT ATC
 CGC CAA GAT GCG GTG GAA CCG GTC GGG ACT
 TCT ATT TAA TAT TTA TGT CTA TTT AAG CCT CAT ATT TAA AGA CAG GGA AGA GCA GAA CCG
 AGC CCC AGG CCT CTG TGT CCF TCC CTG CAT TTC TGA GTT TCA TTC TCC TGC CTG TAC CAG
 190 TGA GAA AAA GCT CCF GTC CTC CCA TCC CCT GGA CTG GGA GGT AGA TAG GTA AAT ACC AAG
 TAT TTA TTA CTA TGA CTG CTC CCC AGC CCF GGC TCT GCA ATG GGC ACT GGG ATG AGC CGC
 TGT GAG CCC CTG GTC CTG AGG GTC CCC ACC TGG GAC CCF TGA GAG TAT CAG GTC TCC CAG

٧
تابع جدول

GTG GGA GAC AAG AAA TCC CTG TTT AAT ATT TAA ACA GCA GTG TTC CCC ATC TGG GTC CTT
GCA CCC CTC ACT CTG GCC TCA GCC GAC TGC ACA GCG GCC CCT GCA TCC CCT TGG CTG TGA
GGC CCC TGG ACA AGC AGA GGT GGC CAG AGC TGG GAG GCA TGG CCC TGG GGT CCC ACG AAT
TTG CTG GGG AAT CTC GTT TTT CTT CTT AAG ACT TTT GGG ACA TGG TTT GAC TCC CGA ACA
TCA CCG ACG TGT CTC CTG TTT TTC TCG CTG GCC TCG GGA CAC CTG CCC TGC CCC CAC GAG
GGT CAG GAC TGT GAC TCT TTT TAG GGC CAG GCA GGT GCC TGG ACA TTT GGC TTG CTG GAC
GGG GAC TGG GGA TGT GGG AGG GAG CAG ACA GGA GGA ATC ATG TCA GGC CTG TGT CTG AAA
GGA AGC TCC ACT GTC ACC CTC CAC CTC TTC ACC CCC CAC TCA CCA GTG TCC CCT CCA CTG
TCA CAT TGT AAC TGA ACT TCA GGA TAA TAA AGT GTT TGC CTC CA

[150-200 base poly A plus 25-30 bases plasmid DNA preceding a PvuII restriction site]-3.

يجدر التطرق للخواص الآتية للتسلسل الوارد في الشكل رقم ٢ على سبيل تستخدم للتركيز في النهاية 5' للسلسلة توجد قواعد موضحة مقابلة لقواعد واصلة عديد cDNA. وبالتالي تظهر حوالي خمسة قواعد (يرمز لها برمز "N") لم يتحدد ترتيب تسلسلها بطريقة سهلة وخالية من الغموض بواسطة سانجير وآخرون Sanger, et al., نتيجة لما سبق من عديد G's. تظهر السلسلة بعد ذلك تشفيراً تسلسلياً قوامه ١٢ كودون codons من سلسلة عديد الببتيدات polypeptide . وبناءً على التماثل مع التسلسل الأجنبي النهائي لمعزولات hpCSF المشتقة من مصادر طبيعية على نحو ما ورد في المثال رقم ١، فإن متبقيات الثريونين threonine الأولية للشكل الناضج hpG-CSF يشار إليه بواسطة +١ وبعد ذلك فإن hpG-CSF الناضجة تتضمن ١٧٤ التشفير التسلسلي لمتبقيات الحمض الأميني amino acid على نحو ما تم وضعه. وبعد شفرة "stop" (شفرة TGA, OP) هنالك حوالي ٨٥٦ قاعدة من تسلسل ٣ غير مترجم وعدد من A's من عديد A "tail". أيضاً اشتمل الشكل رقم ٢ على مواقع التعرف على HgiAi و Apal ايندو نيوكليز وكذا الموقعين StuI (تم بحث infra مع النظام المميز الأيوكاريوتيكي eukaryotic والبروكاريوتيكي Procaryotic) المعتبر عن الخلايا البكتيرية المستقبلية. ونتيجة لنقص متبقيات الأسبارجين asparagines في عديد الببتيدات Polypeptide لا تظهر مواقع للـ جلوكوزيل N-glycosylation أما القواعد الستة المرصودة بالقرب من نهاية ٣ في السلسلة غير المترجمة فهي تمثل موضع عديد دينيليت Polyadenylation محتمل .

ومن الجدير بالملاحظة أن كل من cDNA الإضافين المطابقين بالتهجين حسب الخطوات الموصوفة أعلى من بين ما إجمالية ٤٥٠,٠٠٠ فسيلة قد فشلت في أن تحتوي على التشفير التسلسلي في سلسلة الحمض النووي من خلال استنساخ المواقع الأولية. وفي الواقع فإن الوحدات المستنسخة الثلاث من hpG-CSF قد انتهت في المنطقة 5' في نفس الموقع مما يشير إلى أن البناء الثانوي لنسخ RNA المنقولة يعيق بشدة تكوين سلسلة cDNA خلف هذه المواقع. وعلى هذا، وكأمر عملي تطبيقي، فإن فرز التعبير عن cDNA حسبها هو موصوف لدى أوكاياما

وآخرين Okayama, et al., Mol. And Cell. Biol., ٣، ٢٨٠ - ٢٨٩ (١٩٨٣) وحسبما هو مستخدم فعلاً لفصل GM-CSF لدى ونج وآخرين Wong, et al., العلوم ٢٢٨، ٨١٠-٨١٤ (١٩٨٥) لا يمكن تطبيقه بسهولة وسرعة لفصل hpCSF DNA لأن أنظمة هذا الفصل تعتمد في العادة على وجود سلسلة كاملة من نسخ cDNA في الوحدات المستسخة التي تم تحليلها وتقييمها.

٥ أما التسلسل الوارد أعلاه فإن من غير المحتمل أن ينهض بأعباء للتعبير المباشر عن hpG-CSF في العائل الميكروبي. هذا التعبير ينبغي أن يتم تزويد منطقة تشفير hpG-CSF بشفرة ATG أولي كما ينبغي إدراج الترتيب في وحدة نقل المعلومات إلى الموضع الذي يكون تحت التحكم بواسطة وحدة تنظيم/ وحدة تسريع لسلسلة DNA .

مثال ٥

- ١٠ في هذا المثال يتم استخدام ترميز hpG-CSF على نحو ما تم فصله في المثال السابق لفحص الوحدة المستسخة للعوامل الوراثية. يتم عزل phage lambda من كبد جنين الإنسان human fetal في مكتبة العوامل الوراثية (والمحضر طبقاً لطريقة لاون وآخرين Lawn, et al. Cell، ١٥، ١١٥٧ - ١١٧٤ (١٩٧٨) من ت- ماجنتيز T. Maniatis تفحص بواسطة مجس مترجم يحتوي على جزئين من hpG-CSF المفصولين عن طريق الهضم بواسطة : HgiAI to SuiI, 649 b.p., (HgiAI to SuiI, 639 b.p.) . يتم وضع ما إجمالية حوالي ٥٠٠,٠٠٠ وحدة ملتزمة على أطباق بتري مقاس ١٢ (١٥ سم) وتترك على صفيحة معدنية وتهجن للفحص باستخدام طريقة بنتون /دافيزون Benton/Davison (بنتون وآخرين Benton, et al., Science، ١٩٦، ١٨٠، (١٩٧٧) .
- ١٥ لوحظ وجود ما إجمالية ١٢ وحدة مستسخة موجبة . وتم تزرع ثلاث وحدات مستسخة أعطت أقوى إشارات على الراديوجرافي autoradiography في الفحص الجماعي الثانوي وذلك بحيث
- ٢٠ تنمو تلك الوحدات في لتر واحد ويتم عمل خريطة لها بواسطة الهضم بإنزيم enzyme تقييدي وباستعمال أوليجو نيكلو تيد oligonucleotide مشع ٢٤- مير (كينيز Kinased بواسطة ^{32}P -؟

-10	-1 +1	10	20
euLeuTrpHisSerAlaLeuTrpThrValGlnGluAlaThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysCysLeuGluGlnVa TGCTGTGGCACAGTGCACACTCTGGACAGCTGCAGGAAGCCACCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCCAGAGCTTCTGCTCAAGTGTCTAGAGCAAAGT 800			
30 35			
lArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeu GAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAGAGCTGGTGTAGTGAGTGGGTGAGAGGGCTGTGGAGGGGAAGCCCGGTGGGCAGAGCTAAGGGG 900			
GATGGAACCTGCAGGGCCCAACATCCTCTGGAAGGGACATGGGAGATATTAGGAGCAGCTGGAGCTGGGGAAGGCTGGGAAGGGACTTTGGGGAGGAGGACCT 1000			
TGGTGGGGACACTGCTCGGAGGGCTGGGTGGAGTGGGAGTGCATCACNTTCAGGAGAAAGGGCAAGGGCCCCCTGTGAGATCAGAGAGTGGGGGTG 1100			
CAGGGCAGAGAGGAACAGCCCTGGCAGGACATGGAGGGAGGGGGAAGAACAGAGAGTGGGGAGGACCCGGGAAGGAGCGGACCCCGGCCACUGGC 1200			
36 40 50			
CysAlaThrTyrLysLeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpA GAGTCTCACTCAGCATCCTTCCATCCCCAGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGGAGGAGCTGGTGTCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCCTGGG 1300			

تابع جدول ٨

60

70 71

LaProLeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeu

CTCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCTGCAAGCTGGTGAAGTTCACGAAAGATTAAGCTTAATGAGCAGGGGGAAGAGAGAGAACACCCATGGC

1400

72

AlaGlyCysLeuSerGln

CTCCCCCATGTCTCCAGGTTCCAAAGCTGGGGGCTGACGTAATCTCAGGCAGCAGCCCTTAACCTCTCCGCTGTGTCTCAGAGCAGGCTGTGAGCCAA

1500

80

90

100

110

LeuHisArgGlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGlnGlyIleSerProGlnLeuGlyProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValA
CTCCATAGCGGCTTTCTCTACCAAGGGGCTCTGCAGGCCCTGGAAGGATCTCCCGAGTTGGGTCCCACTTGGACACACTGCAGCTGGAGCTCG

1600

120

LaAspPheAlaThrThrIleTrrpGlnGln

CCGACTTGGCCACCAACCATCTGGCAGCAGGTGAGCCCTTGTGGCCAGGCTGGCCAAAGTCTGCTGGCATTTCTGGGCACACAGCCGGGCTGTGTATGG

1700

121

MetGlnG

GCCCTGTCCATGCTGTACGCCCCCAGCATTTCTCATTTGTAAATAACGCCCACTCAGAAAGGGCCCAACCACTGATCAGAGCTTTTCCCCCAGAGATGGAG

1800

5

10

تاریخ جہول ۲

	130	140	150	
IULeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPheAlaSerAlaPheClnArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerIli AACTGGGAAATGGCCCCCTGCCTGCAGGCCAACCCAGGGGTGCCATGCGGCCCTTCGCTCTCTCTTCACAGCGCCGGCAGAGACGGCTCCTGCTTCCTCCCA				1900

160 170 174

slleuGlnserPheleuGluValserTyrArgValLeuArgGliAlaLeuAlaGlnProOP
TCTGCAGACCTCTGGAGGTGTCGTACCGCGTCTTACGCCACCTTCCAGCCCTGAGGCCAAGCCCTCCCATCCAGTATTATCTCTATTATATAT

2000

TTATGTCFATTTAAGCCCTCATATTTAAAGACAGGAGAGACAGAACGAGCCCGAGCCCTCTGTCTCTCTCCATTTCTAGTTTCATTTCTCTGCC	2100
TGTAGCAGTGAAGAAAAGCTCTGTCTCTCCCATCCCTCTGACCTGGAGAGGTGATAGCTAAATACGAAGTATTTATTAATAAGACTGTCTGCCAGCCCTGG	2200

CTCTGCACATGGGGCAGCTGGGAGTAGACCGCTGTGAGCCCCCTGTGCTCTGAGGGTCCCAACCTGGGACCCCTGAGAGTATCAGGTCTCCACGTTGGAGACAG 2300

AAATCCCTGTTAATATTTAAACAGCAGTGTCTCCCAATCTGGGTCTTGCACCCCTCACTCTGGGCTCAGCCAGCTGCACAGGGGGCCCTGCATCCCCCTT 2400

GGCTGTGAGCCCCCTGGACAAAGCAGAGCTGGCCAGAGAGCTGGAGGCGATGGCCCTGGGGGTCCGACGAATTTGCTGCGGAATCTCGTWTTCCTTAAAC	2500
TTTGGGACATGGTTTGACTCCCGAACAATCACCGAGCTCTCTCTGTTTTCTGCGGTGGCCCTCGGACACACTGCCCCCTGCCCCCAAGAGGCTCAGACTGT	2600

۱۲۴۳

تابع جدول ٨

TABLE VIII (cont'd.)

GACTCTTTTAGGGCCAGAGGTGCTGGACATTGGCTTGCTGCGATGCGGAGTGGAGGAGCAGACAGAGGAAATCATGTCAGGCTGT	2700
GTGTGAAGGAGGCTCCACTGTGACCCCTCCACCTTTGACCCGCCACTCAGCAGTGTGCCCTCCACTGTACATTGTAACTGAACTTCAAGATATAAG	2800
TGTTGGCTCCAGTCAAGTCTCTGCTTCTTGAAGTCCAGCTGGTGGCTGGCCAGGGGCTTGGGAGGTGGTGAAGGGGTGGAGAGGCCAGAGGAGGT	2900
CGGGGAGGAGGTCTGGGGAGGAGTCCAGGGAGGAGGAAAGTTCTCAAGTTCCTGTGACATTCAATCCGTTAGCACATATTATCTGAGCAGCTACT	3000
CTGTGCAGAGGCTGGGCTAAGTGTGCTGGGACACAGCAGAGGAAACAAAGGCAGACATGGAAATCTGCACCTCGAG	3070

ويشتمل الشكل (١) على تفاصيل خريطة الإيندو نيوكليز المقيدة (endonuclease) (حوالي ٣,٤ kb) لمجموعة العوامل الوراثية بالحمض النووي DNA والمحتوية على مورث hpG-CSF. والإيندونيوكليزات endonucleases المقيدة في شكل (١) هي : NcoI, N, PstI, BamHI, B, ApaI, A, XhoI. X, تصف الأسهم الموجودة أسفل الخريطة استراتيجية الترتيب المستخدمة للحصول على تسلسل العوامل الوراثية . أما المناطق الصندوقية (داخل مربعات) فحص المناطق الموجودة في الوحدة المستنسخة من cDNA ذات النهاية المنفصلة المفتوحة التي تمثل التسلسل غير الموجود في سلسلة الحمض النووي cDNA ولكنها تتطابق مع وحدات الرسم بمجس cDNA وقد تم تمييز التشفير التسلسلي للإكسون الأول بواسطة تحليل الرسم الشمالي. ويتم تهجين ٢٤ mer أوليجونيوكلوتيد 'CAGCAGCTGCAGGGCCATCAGCTT3' 5' التي تقوم بربط الوصلات المتوقعة للإكسون ١ و٢ إلى hpG-CSF mRNA في شكل الرسم الشمالي. ويشير الرسم الناتج يبين إلى mRNA (١٦٥٠ bp) بنفس الحجم المحدد بواسطة مجس الأوليجونيوكلوتيد ٢ oligonucleotide إكسون. وهذه المعلومات مقترنة مع القدرة على التعبير المباشر عن hpG-CSF من العامل الوراثي pSVG-M-PpoI (مثال ٩) باستخدام الضفيرة المبدئة الموصوفة في الجدول (٨) هي التي تحدد التشفير التسلسلي الموجود في Exon ١. أما Exons ٢-٥ فهي تحدد عن طريق السلاسل الشفرية التي تم الحصول عليها في الوحدة المستنسخة cDNA (Ppo2) من المورثة hpG-CSF (جدول ٧).

مثال ٦

يتعلق هذا المثال بتحضير تشفير الجينات كيميائياً أو مخبرياً hpG-CSF وتتضمن الشفرات المفضلة للـ E. coli .

وبتحضير مختصر فإن البروتوكول protocol المستخدم هو الموضح بشكل عام في ألتوان وآخرين Alton, et al., PCT رقم الطلب ٠٤٠٥٣/٠٨٣ دبليو (WO83/04053) والمدمجة بواسطة

مرجع مشار إليه بطيه. وقد تم تصميم الموثات للتجميع الأولي لمكونات الأوليجونوكليوتيدات oligonucleotides في وحدات مزدوجة والتي بدورها تتجمع إلى ثلاثة أجزاء منفصلة وقد تم تصميم هذه المقاطع للتكبير النووي وعند إزالة من نظام التكبير. ويمكن أن تتجمع بالتعاقب وعلى الثاني أو من خلال ترابط الجزء المتعدد في العامل الوراثي المناسب تشتمل الجداول ٧ إلى ٩ على توضيح بناء المقاطع ١، في شكل بناء المقطع ١ كما هو موضح في الجدول ٧ والشكل ٤، نجد أن الأوليجونوكليوتيدات oligonucleotides ١-١٤ مجمعة في ٧ أشكال مزدوجة (٨ و ٩، ١٠ و ١١، ١٢ و ١٣، ١٤ و ١٥) وهذه الإزدواجات السبعة تترايط معاً لتكون المقطع ١ كما هو موضح في الشكل ٤. ويلاحظ أيضاً في الشكل ٤ أن المقطع ١ يتضمن ارتفاع لاصقة XBAL وانخفاض نهاية لاصقة BamHI وذلك مفيد لعملية الربط للتكبير وللحوامل المعبرة عن الوراثة ولربط المقطع ١١ .

جدول ٩

EchpG-CSFDNA SECTION I	
CTAGAAAAACCAAGGAGGTAATAAA	1
TAATGACTCCATTAGGTCCTGCTTCTCT	2
CTGCCGCAAGCTTTCTGCTGAAATGCTGG	3
AACAGGTTCTGTAATAATCCAGGGTGACGGT	4
GCTGCACTGCAAGAAAACTGTGCGCTA	5
CTTACAACTGTGCCATCCGGAAGAGC	6
TGGTACTGCTGGGTCATTCTCTTGG	7
CATTATTTATTACCTCCTTGGTTTTTT	8
GCAGAGAAGAAGCAGGACCTAATGGAGT	9
TGTTCCAGACATTTACGACAGAAAGCTTTGCG	10
CAGCACCGTCACCCTGGATTTTACGAACC	11
TAAGTAGCGCACAGTTTTCTTGCAGTG	12
ACCAGCTCTTCCGGATGGCACAGTTTG	13
GATCCCAAGAGAATGACCCAGCAGT	14

١٥

جدول ۱۰

TABLE X

Echpg-CSFDNA SECTION I

CTAGAAAA ACCAAGAGG TAATAAATAA TGACWCCATT AGGTCCCTGT TCTTCTCTGC
TTTTT TGGTCCCTCC ATTATTTTATP ACTGAGGTAA TCCAGGACGA AGAAGAGACG
8 9

XbaI

CGCAAGCTT TCGCTGAA TGTCTGGAAC AGGTTCGTAA AATCCAGGCT GACGGTGTG
GCGTTTCGA AGACGACTTT ACAGACCTTG TCCANGCATT TTAGGTCCCA CTGCCACGAC
10 11

CACTGCAAGA AMACTGTGC GCTACTTACA AACTGTGCCA TCCGGAGAG CTGGTACTGC
GTGACGTTCCT TTTTGACACG CGATGATGT TTGACACGGT AGGCCCTCTG GACCATGACG
12 13

TGGGTCAATC TCTTGG 100
ACCCAGTAAG AGAACCTTAG
14 BamHI

وكما هو موضح في الجدول ٨ وفي الشكل ٥ في بناء المقطع II ، تتجمع الأوليجونوكليوتيدات oligonucleotides ٣٠-١٥ في ٨ وحدات مزدوجة (١٥ و ٢٣ ، ٢٤ و ٢٥ ، ٢٥ و ٢٦ ، ٢٦ و ٢٧ ، ٢٧ و ٢٨ ، ٢٨ و ٢٩ ، ٢٩ و ٣٠). وترتبط هذه الوحدات المزدوجة معاً لتكوين المقطع II كما يظهر في الشكل ٥ . وكما هو موضح أيضاً في هذا الشكل، نجد أن المقطع II له نهاية لاصقة صاعدة BamHI ونهاية لاصقة هابطة وهي EcoRI مفيدة للترابط لتكبير الحامل الوراثي وللترباط بالنسبة للمقطع I . وبالقرب من نهاية الهبوط نجد أن المقطع II يتضمن مواقعاً هابطاً SstI مفيداً في الربط النهائي للمقاطع ٣ و ٢ .

جدول ١١

جدول ١١

EChpG-CSFDNA SECTION II

GATCCCGTGGGCTCCGCTGTCTTCT	15
TGTCCATCTCAAGCTCTTCAGCTGGC	16
TGGTTGTCTGTCTCAACTGCATTCTGGT	17
CTGTTCTGTATCAGGGTCTTCTG	18
CAAGCTCTGGAAGGTATCTCTCCGGA	19
ACTGGGTCCGACTCTGGACACTCTGCA	20
GCTAGATGTAGCTGACTTTGCTACTACT	21
ATTTGGCAACAGATGGAAGAGCTCAAAG	22
GACAAGAAGACAGCGGAGCCACGG	23
ACCAGCCAGCTGAAGAGCTTGAGATG	24
ACAGACCAGAATGCAGTTGAGACAGACA	25
CTTGCAGAAGACCCTGATACAGGA	26
CAGTTCCGGAGAGATACCTTCCAGAG	27
TAGCTGCAGAGTGTCCAGAGTCGGACC	28
AAATAGTAGTAGCAAAGTCAGCTACATC	29
AATTCTTTGAGCTCTTCCATCTGTTGCC	30

جدول ۱۲

TABLE XII

Echpg-CSFDNA SECTION II

10 15 20 30 40 16 50 60
GATCCCGTG GGCCTCCGCTG TCTTCTTGT CATCTCAAGC TCTTCAGCTG GCTGCTTGTG
GGCAG CCGAGGCGAC AGAAGAACAG CTAGAGTTCC AGAAGTCGAC CGACCAACAG
23 24

BamHI

70 17 80 90 18 100 110 19 120
TGCTCAACT GCATTCTGT CTGTTCCTGT ATCAGGGTCT TCTGCAAGCT CTGGAAGTA
ACAGAGTTGA CGTAAGACCA GACAGAGACA TAGTCCGAGA AGACGTTTCA GACCTTCCAT
25 26 27

130 140 20 150 160 170 21 180
TCTCTCCGA ACTGGGTCCG ACTCTGGACA CTCTGCAGCT AGATGTAGCT GACTTTGGCTA
AGAGAGGCCCT TGACCCAGGC TGAGACCTGT GAGACGTCGA TCTACATCGA CTGAACGAT
28 29

190 200 22 210
CTACTATTG GCAACAGATG GAGAGCTCA AG
GATGATAAC CGTTGCTAC CTCTCGAGT TTCTTAA
30

SstI

EcoRI

وأخيراً، نجد أن بناء المقطع ٣ تم كما هو مبين في الجدول ٩ والشكل ٦ وفي هذا البناء يلاحظ أن الأوليجونيوكلوئيدات oligonucleotides ٣١-٤٢ متجمعة في ست وحدات مزدوجة هي (٣٧ و ٣١، ٣٨ و ٣٢، ٣٩ و ٣٣، ٤٠ و ٣٤، ٤١ و ٣٥، ٤٢ و ٣٦). وترتبط هذه الوحدات المزدوجة الست معاً لتكون المقطع ٣ كما هو مبين في الشكل ٦. وكما هو مبين في هذا الشكل أيضاً، يتضمن المقطع ٣ نهاية لاصقة صاعدة bamHI ونهاية لاصقة هابطة EcoRI مفيدة في الربط لتكبير العامل الوراثي وعلى الأقل في حالة النهاية EcoRI في التعبير عن العامل الوراثي المعدل. وبالإضافة إلى ذلك فإن المقطع ٢ له موقع SstI صاعد مفيد في الربط النهائي للمقطعين ٣ و ٢.

جدول ١٣

جدول ١٣

TABLE XIII

EChpG-CSFDNA SECTION III

GATCCAAAGAGCTCGGTATGGCACCAG	31
CTCTGCAACCGACTCAAGGTGCTATGCCG	32
GCATTCGCTTCTGCATTCCAGCGTCGTGC	33
AGGAGGTGTACTGGTTGCTTCTCATCTG	34
CAATCTTTCCCTGGAAGTATCTTACCGTGT	35
TCTGCGTCATCTGGGCTCAGCCGTAATAG	36
AGAGCTGGTGCCATACCGAGCTCTTTG	37
ATGCCGGCATAGCACCTTGAGTCGGTTGC	38
TCCTGCACGACGCTGGAATGCAGAAGCGA	39
ATTGCAGATGAGAAGCAACCAGTACACC	40
CAGAACACGGTAAGATACTTCCAGGAAAG	41
AATTCTATTACGGCTGAGCCAGATGACG	42

۱۴ د ل

EchpG-CSFDNA SECTION III

TABLE XIV

10	31	20	30	40	32	50	60
GATCCAAAG	AGCTCGGTAAT	GUCACGACGCT	CTGCAACCGA	CTCAAGGTGC	TATGCCGCGA		
GTTC	TCGAGCCATA	CCGTGCTCGA	GACGTTGGCT	GAGTTCACG	ATACGGCGCT		
<u>BamHI</u>	<u>SstI</u>	<u>37</u>	<u>38</u>				
70	33	80	90	100	34	110	120
TTCGCTTCTG	CATTCCAGCG	TCCGUCAGGA	GGTCGACGCT	TTCCTTCTCA	TCTGCAATCT		
AMCGAAGAC	GTAGGCTCC	AGCAGCTCC	CCACATGACC	AACGAAGAGT	AGACCTTAGA		
<u>39</u>				<u>40</u>			
35	130	140	150	36	160	170	
TTCCTGGAG	TATCTTACC	TGTTCTGCGT	CATCTGGCTC	AGCCGTATA	G		
AMGACCTTC	ATAGAAATGGC	ACAAGACGCA	GTAGACCGAG	TCGGCATTTAT	CTTAA		
<u>41</u>				<u>42</u>			

EcoRI

أما الأجزاء من X bal إلى BamHI المتكونة بواسطة المقطع ١ فقد تم ربطها إلى M13mp1 1 حامل وراثي ملتهم مفتوح بواسطة BamHI, X bal. ومن ثم أعيد فتح الحامل الوراثي بالهضم بواسطة EcoRI, BamHI مصحوباً بالربط مع قطع BamHI إلى EcoRI المتكونة بواسطة المقطع ٢. وفي هذه المرحلة يتم الربطتين المقطعين ١ و ٢ حسب الإتجاه السليم. وبعد ذلك، يتم فتح حامل وراثي M13mp1 1 آخر بهضم BamHI وتحويله إلى EcoRI ثم ربطه بالقطع BamHI إلى EcoRI المتكونة بواسطة المقطع ٣.

يتم هضم الحامل الوراثي المحتوي على المقطعين ١ و ٢ بواسطة SstI, XbaI وبالمثل، يتم هضم الحامل الوراثي المحتوي على المقطع ٣ بواسطة EcoRI, XbaI. وكلا الجزئين الصغيرين الناتجين من كل عملية هضم يتم ربطه في البلازميد pCFM ١١٥٦ والتي قد فتحت قبل ذلك بواسطة EcoRI, XbaI. وناتج هذا التفاعل هو عبارة عن بلازميد plasmid للتعبير عن تسلسل متصل عن الحمض النووي كما هو مبين في الشكل ٧، لتشفير (conding) عديد الببتيدات hpG-CSF polypeptide الداخلي مع تشفير الأمينو للميثيونين الطرفي amino terminal methionine (ATG) للبدء في ترجمة E. coli.

جدول ١٥

10 61

TABLE XV

C TAG AAA AAA CCA AGG AGG TAA TAA ATA		Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu	
		ATG ACT CCA TTA GGT CCT GCT TCT CTG	
10	CCG CAA AGC TTT CTG CTG AAA TGT CTG GAA CAG GTT CGT AAA ATC CAG GGT GAC GGT GCT	20	
	Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala		
30	Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu	40	
	GCA CTG CAA GAA AAA CTG TGC GCT ACT TAC AAA CTG TGC CAT CCG GAA GAG CTG GTA CTG		
50	Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu	60	
	CTG GGT CAT TCT-CTT GGG ATC CCG TCG GCT CCG CTG TCT TCT TGT CCA TCT CAA GCT CTT		
70	Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu	80	
	CAG CTG GCT GGT TGT CTG TCT CAA CTG CAT TCT GGT CTG TTC CTG TAT CAG GGT CTT CTG		
90	Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp	100	
	CAA GCT CTG GAA GGT ATC TCT CCG GAA CTG GGT CCG ACT CTG GAC ACT CTG CAG CTA GAT		
110	Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala	120	
	GTA GCT GAC TTT GCT ACT ACT ATT TGG CAA CAG ATG GAA GAG CTC GGT ATG GCA CCA GCT		
130	Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly	140	
	CTG CAA CCG ACT CAA GGT GCT ATG CCG GCA TTC GCT TCT GCA TTC CAG CGT CGT GCA GGA		

150 Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg
GGT GTA CTG GTT GCT TCT CAT CTG CAA TCT TTC CTG GAA GTA TCT TAC CGT GTT CTG CGT

160

170 His Leu Ala Gln Pro 174
CAT CTG GCT CAG CCG TAA TAG AAT T

جدول ۱۶

- 1 ATCGATTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACCGGTGGAAATTCGGTACCAT
TAGCTAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCCATGGTA
- 1 Clal, 12 XbaI, 29 NdeI, 35 HincII, HpaI, 39 MluI, 47 EcoRII,
53 HgiCI KpnI, 57 NcoI StyI,
- 51 GGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGATAAATAAGTAAACGATCC
CCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTATTATTCAATTGCTAGG
- 63 HindIII, 70 AvaI XhoI, 75 BamHI Xho2, 79 Sac2,

مثال ٧

يتعلق هذا المثال بالتعديل الوراثي المعبر عنه بواسطة *E. coli* لعديد ببتيدات hpG-CSF polypeptides عن طريق التشفير للحمض النووي الحامل للصفات الوراثية (en⁻¹) hpCSF (Me⁻¹) coding). وتكون السلسلة المستخدمة محضرة صناعياً في جزء منها ومشتقة من الحمض النووي cDNA في جزء آخر.

أما السلسلة المحضرة صناعياً فهي تستخدم الشفرات التفضيلية *E. coli*.

أن البلازميد Ppo2 plasmid المحتوي على المورثة hpG-CSF كما هو مبين في الشكل ٢ يتم هضمه بواسطة HgiAI و StuI مما ينتج عنه حوالي ٦٤٥ جزء قاعدي مزدوج يشتمل على المورثة الخاصة بنضج hpCSF (كما هو مبين في الشكل ٢) عن طريقة سبعة من رموز تشفير متبقيات السلسلة القيادية عند النهاية ٥ وحوالي ١٠٠ جزء قاعدي مزدوج عند المنطقة ٣ غير المشفرة. إن الهضم بواسطة HgiAI يترك- نهاية اللاصقة القاعدية ٥، ٤ مطابقة لنهاية PstI الطرفية وفي حين أن StuI تترك النهاية كليلة (غير حادة). مما يسمح بإدخال القطعة بسهولة في M13 mp 8 (RF) المقطوعة بواسطة PSTL وبواسطة إنزيم التقيد المشكل نهاية الكليلة غير الحادة HincII. وعند التكبير في M13 ، يتم استئصال hpG-CSF عن طريق الهضم بواسطة ١٥ BamHI و ApaL والتي تتقاطع على التوالي عند موقع ApaL الذي يحدد نطاق التشفير للمتبقيات +٣ إلى +٥ من وصلة الربط متعددة التوصيلات المقيدة M13 mPA. لكي يسمح بالتعبير عن التعديل الوراثي *E. coli* لعديد ببتيدات hpG-CSF polypeptide تم تحضير مقطع صناعي على

نحو ما ورد شرحه ووصفه في الجدول ١٠ أدناه .

5' - C TAG AAA AAA CCA AGG AGG TAA TAA ATA
3' - TTT TTT GGT TCC TCC ATT ATT TAT

XbaI

-1 +1

MET THr Pro Leu

ATG ACA CCT CTG GGC C - 5'

ApaI

ومن واقع تحليل النتائج في الجدول ١٠ اتضح أن وحدة الربط متعدد الوصلات تتضمن نهاية لاصقة ApaI ، وشفرات المتبقيات الثلاثة الأولية للأمينو الطرفي amino terminal في M13 DNA- hpG-CST ("restoring") Leu³, Pro², Thr¹ لتحديد الشفرات المحذوفة عند هضم E. coli ببدء ApaI الموصوف أعلاه. وتستخدم شفرات التعديل الوراثي المعبر عنها تفضلياً في ribosome ترجمة ATG ، وهي سلسلة من ٢٤ قاعدة مزدوجة توفر موقع الربط الريبوسومي XbaI .

إن حامل التعديل الوراثي المستخدم للتعبير عن E. coli هو ذلك الذي ورد وصفه على أنه pCFM536 في طلب البراءة الأمريكية رقم ١٣٦٤٩٠ بواسطة موريس المنشورة في ١٠ أبريل ١٩٨٥ ، (أنظر أيضاً E. coli JM103 pcfm536 A. T. C. C. 39934). وباختصار ، يتم هضم بلزميد pCFM536 plasmid بواسطة BamHI, XbaI . ومن ثم فإن قطعة -hpG (ApaI/BamHI) CSF ووحدة الربط (XbaI/ApaI) الموصوفة أعلاه تم ربطها لتكوين البلازميد plasmid المحدد في p536Ppo2 .

ويتحول البلازميد p536Ppo2 plasmid إلى متغير مقاوم الالتهام للسلسلة E. coli AM7 والتي قد تحولت قبل ذلك بواسطة pMW1 (A. T. C. C. رقم ٣٩٩٣٣) لإيواء المورث ٢١٨٥٧. لقد تم التحقيق من عملية التحول على بلزميد plasmid المورث pCFM536. أما الخلايا cells المزروعة في مرق LB (أمبيسلين ampicillin ٥٠ ميكروجرام ١ مللي لتر) فهي وتحفظ في حرارة تبلغ (٢٨) درجة مئوية. وعند نمو الخلايا cells المزروعة بحيث يعبر عنها بما يصل إلى ٥,٥ = A600 ، فإن التعبير عن phCSF قد تم حثه برفع درجة حرارة إلى ٤٢ درجة مئوية لمدة ٣ ساعات . O.D. وأما القطر الخارجي النهائي للمزرعة فهو يساوي ١,٢ = A600 .

أن مستوى التعديل الوراثي المعبر عن pHG-CSF بواسطة الخلايا المتحولة تم تقديره على جل البولي أكريلاميد SDS- Poly acrylamide gel المصبوغ بواسطة الكومازين الأزرق coomassie blue ليكون ٣- ٥٪ من البروتين protein الخلوي الكلي .

تحدد الخلايا cells وتجمع بواسطة القوة الطاردة المركزية عند ٣٥٠٠ جرام لمدة عشرة دقائق في وحدة تدوير ٤,٢ - JS . وتتكرر الخلايا عند ٢٥٪ (W/V) في الماء بتمريرها ثلاث مرات خلال خلية cell ضغط فرنسية عند ١٠,٠٠٠ رطل لكل بوصة مربعة . يتم إخضاع محلول الخلايا cells المنكسرة لعملية طرد مركزي بمقدار ١٠,٠٠٠ جرام ولمدة ١٥ دقيقة في دوار ٢٠ - JA ويعاد تنويب الكريات الصغيرة في الماء بحيث تصبح محلولاً في مقادير ٥ مللي جرام/مللي لتر بروتين protein كلي/إجمالي في ١٪ حمض لوريك lauric acid ، ٥٠ مللي مول تريس Tris ، ٧,٧ = PH . ويتم إجراء عملية طرد مركزي لمادة الكريات المذابة عند ١٥,٠٠٠ جرام لمدة ١٠ دقائق ويضاف إلى المادة الطافية CuSO_4 إلى مقدار ٢٠ مللي مول. وبعد حوالي ١ ساعة يتم تحميل هذه العينة على عمود C_4 HPLC للتقنية طبقاً لخطوات المثال ١ (ب) مع أجزاء بعض التعديلات لضبط الحجم ودرجة التركيز .

وتتم عملية تنقية ثانية لإنتاج كمية كبيرة من hpG-CSF المشكلة في محلول منظم يحتوي على مواد غير عضوية . وهذه المادة مناسبة للدراسة داخل الجسم الحي. يعاد تنويب عجينة من ١٥٠ جرام من الخلايا في حوالي ٦٠٠ مللي لتر من ١ مللي مولر DTT ويتم تمريرها أربع مرات خلال مجانس ماننون جوالين Manton Gualin Homogenizer بمقدار مبلغ حوالي ٧٠٠٠ رطلاً في كل بوصة مربعة . ويتم إجراء طرد مركزي لمحلول الخلايا cells المنكسرة عند ١٠,٠٠٠ جرام لمدة ٣٠ دقيقة وكما يعاد تنويب الكريات في محلول ٤٠٠ مللي لتر من ١٪ من ٢٠ يؤكسبركوليت deoxycholqte ، ٥ مللي مولر EDTA ن ٥ مللي مولر DTT و ٥٠ مللي تريس Tris ، ٩ = pH . ويتم خلط هذا المحلول عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة كما يتم إجراء طرد مركزي عند ١٠,٠٠٠ جرام لمدة ٣٠ دقيقة . ويعاد تنويب الكريات في حوالي ٤٠٠ مللي

- لتر من الماء وكما يتم إجراء طرد مركزي عند ١٠,٠٠٠ جرام لمدة ٣٠ دقيقة. وتذاب الكريات في ١٠٠ مللي لتر من ٢٪ ساركوسيل Sarkosyl و ٥٠ مللي مولر عند pH=8 ويضاف ٢٠ ميكرو مولر يتم تقليب المخلوط لمدة ١٦ ساعة عند درجة حرارة الغرفة كما يتم إجراء طرد مركزي عند ٢٠,٠٠٠ جرام لمدة ٣٠ دقيقة . يضاف إلى المادة الطافية (supernatant) ٣٠٠ مللي لتر من الأسيتون acetone . يوضح هذا المخلوط في التلج لمدة ٢٠ دقيقة ويتم إجراء عملية طرد مركزي عند ٥٠٠٠ جرام لمدة ٣٠ دقيقة تذاب الكريات في ٢٥٠ مللي لتر من ٦ مولر من الجوانيديدين guanidine و ٤٠ مللي مولر من أسيتات الصوديوم sodium acetate عند pH = ٤ ويوضع على عمود متوازن ١,٢٠٠ مللي لتر G-SO ويتم تسييره بواسطة ٢٠ مللي مولر من أسيتات صوديوم sodium acetate عند pH = ٥,٤ . يتم تجميع pHG-CSF (حوالي ٤٠٠ مللي لتر) وتوضع على عمود ١٥ مللي لتر CM - سليولوز cellulose متوازن في ٢٠ مللي مولر أسيتات صوديوم sodium acetate عند pH = ٥,٤ . وبعد التحميل يغسل العمود بواسطة ٦٠ مللي لتر من ٢٠ مللي مولر من أسيتات الصوديوم sodium acetate عند pH = ٥,٤ وكلوريد صوديوم sodium chloride ٢٥ مللي مولر ومن ثم يشطف العمود بواسطة ٢٠٠ مللي لتر من ٢٠ مللي مولر أسيتات صوديوم sodium acetate عند pH = ٥,٤ وكلوريد صوديوم sodium chloride ٣٧ مللي مولر. يتم تركيز ١٥٠ مللي لتر من سائل الشطف إلى ١٠ مللي لتر ويستعمل لعمود ٣٠٠ مللي لتر G-VO متوازن ومسير بمقدار ٢٠ مللي مولر من أسيتات الصوديوم sodium acetate و ١٠٠ مللي مولر من كلوريد صوديوم sodium chloride عند pH = ٥,٤ . يتم تجميع أجزاء القمة المشتملة على ٣٥ مللي لتر كما تم تعقيم المرشح. يساوي التركيز النهائي للـ hpG-CSF ما مقداره ١,٥ مللي جرام/مللي لتر وتزيد النقاوة على ٩٥٪ من نسبة ما تم تحديده بتحليله على الهلام كما أنه يحتوي على أقل من ٠,٥ نانو جرام من بيروجين pyrogen لكل ٠,٥ مللي جرام من hpG-CSF . يتم تعيين مستوى البيروجين pyrogen باستخدام شحنة اختبار (KIT) ليمولوس أميبوسيت ليسييت (M. (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test kit . A. Bioproducts, Walkersville, Md)

مثال ٨

يتعلق هذا الاختراع باستخدام طريقة إعادة الاتحاد الجيني genetic لتوليد مشابهاً hpG-CSF حيث توجد بقايا السيستين cysteine عند المواضع ١٧، ٢٦، ٤٢، ٦٤، ٧٤ والتي يتم تبديلها بمفردها (كل على حدة) ببقية حمض أميني amino acid مناسب .

- ٥ وتحديث خطوات تولد التحول الخلفي (الطفرة) للموقع الموجه طبقاً لما أورده سيوزا وآخرين Souza, et al., رقم الطلب PCT المنشورة دبليو ٨٥/٠٨١٧ . منشورة في ٢٨ فبراير ١٩٨٥ .
- على [Met⁻¹] تشفير (encoding) لبلزيمد p536Ppo2 plasmid الموصوفة infra باستخدام الأوليغو نيكلو تيدات oligonucleotides صناعية تتراوح في الحجم من ٢٠ إلى ٢٣ قاعدة وهي موجودة في الجدول (١١) أدناه . يسمح الأوليغو نيكلو تيدات oligonucleotides رقم (١) بتكوين جين (مورثة مشفرة) مشفر (تشفير الجينات hpG-CSF [Ser¹⁷]) كما يسمح الأوليغو نيكلو تيدات oligonucleotides رقم (٢) بتكوين hpG-CSF [Ser³⁸] وهكذا .

جدول ١١

OLIGONUCLEOTIDE	SEQUENCE
1.	5'-CTG CTC AAG TCC TTA GAG CAA GT-3'
2.	5'-GAG AAG CTG TCT GCC ACC TACA-3'
3.	5'-TAC AAG CTG TCC CAC CCC GAG-3'
4.	5'-TGA GCA GCT CCC CCA GCC AG-3'
5.	5'-CTG GCA GGC TCC TTG AGC CAA-3'

تحديث التقنيات الطفرية لموقع CYS إلى SER الموجه باستخدام M13 mp10 المحتوي على قطعة XbaI-BamHI المفصولة من p536Poo2 كشرية نموذجية. يعالج الحمض النووي DNA

من كل وحدة مستنسخة M13 mp10 محتوية على بديل Cys-Ser وتتم المعالجة بواسطة XbaI و BamHI. تتكاثر القطعة الناتجة لاجنسياً في الحامل المعبر عن التعديل الوراثي pCFM746 ثم فصل نواتج التعديل الوراثي على تمارر ما ورد في مثال ٧ .

ويمكن بناء البلمر pCFM746 plasmid بأحداث إنشقاق في بلمر pCFM736 plasmid (والذي يتكون من المرسب والمواد المتاحة بصفة عامة كما هو موصوف في موريس رقم ٥) الطلب PCT النش دبليو ٨٢٩/٠٨٥ . المنشورة في ٢٨ فبراير ، ١٩٨٥) بواسطة BamHI, ClaI لإزالة عديد الربط الموجود وبتبديل عديد الربط (polylinker) التالي .

جدول ١٢

ClaI
5' CGATTTGATTCTAGAATTCGTTAACGGTACCATGGAA
3' TAAACTAAGATCTTAAGCAATTGCCATGGTACCTT

GCTTACTCGAGGATCCGCGGATAAATAAGTAAC^{3'}
CGAATGAGCTCCTAGGCGCCTATTTATTCATTGCTAG^{5'}
Sau3a

في طريقة التنقية لمتشابهات Cys إلى Ser طبقاً للاختراع الحالي فإنه يتم تحويل ما ينراوح من ١٠ إلى ١٥ جرام من عجينة الخلية إلى محلول في ٤٠ مللي لتر من ١ مللي مولر DTT ويتم تمريره ثلاث مرات خلال خلية ضغط فرنسية بمقدار ١٠,٠٠٠ رطل لكل بوصة مربعة. ويتم إجراء عملية طرد مركزي لمحلول الخلايا cells المتكسرة بمقدار ١٠,٠٠٠ جرام لمدة ٣٠ دقيقة يعاد تحويل الكريات إلى محلول في ١٪ DOC ، ٥ مللي مولر DTT / ٥٠ مللي مولر تريس Tris و pH = ٩ ويسمح بالخلط لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة . ويتم إجراء عملية طرد للمخلوط عند ١٠,٠٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة ثم يعاد تحويله إلى محلول في ٤٠ مللي لتر من الماء ويعاد الطرد المركزي عند ١٠,٠٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة . تذاب الكريات في ١٠ مللي لتر من ٢٪

ساركوسيل Sarkosyl ، ٥٠ مللي مولر DTT ، ٥٠ مللي مولر تريس Tris pH= 8 . بعد الخلط لمدة ساعة يصفى المخلوط بالطرد المركزي عند ٢٠,٠٠٠ لمدة ٣٠ دقيقة ويتم استعماله في عمود ٣٠٠ مللي لتر G-VO متوازن ويتم تسييره في ١٪ ساركوسيل Sarkosyl ، ٥ مللي مولر تريس Tris pH= 8 . تصب الأجزاء المحتوية على المشابة ويتم تجميعها ثم يسمح لها بالأكسدة oxidize بالهواء وذلك بتعريضها للهواء لمدة يوم واحد على الأقل . تبلغ درجة التراكيزات النهائية ما يتراوح من ٠,٥ إلى ٥ مللي جرام/ مللي لتر .

مثال ٩

في هذا المثال تم تصميم نظام التعديل الوراثي للخلية cell الثديية وللتحقيق من ناتج عديد ببتيدات polypeptides من hpG-CSF DNA ومما إذا كان بوسعه التحول الوراثي في الخلايا cells الثديية وما إذا كان بمقدور تلك الخلايا cells إفرازه (COS-1, A. T. C. C. CRL-1650) . وقد تم تصميم هذا النظام ليتيح الفرصة لإفراز لمشابة عديد ببتيدات polypeptides من phGCSF بواسطة التعديل الوراثي وعملية الإفراز الصناعية الجزئية وتشفير بناء cDNA المشتق جزئياً [Ala¹] hpG-CSF والذي يسبقه عدد ببتيدات polypeptides القائد بتسلسل متبقيات منسوبة إلى الإنسان GM-CSF في ونج وآخرون Wong, et al., Science ٢٢٨ / صفحة ٨١٠ - ٨١٥ سنة ١٩٨٥) .

إن حامل التعبير عن التعديل الوراثي المستخدم في الدراسة الأولية لنواتج عديد ببتيدات polypeptides لهذا الاختراع هو عبارة عن ناقل وراثي مكوكي "shuttle" ويشتمل على كل من pBR322 و DNA SV40 المصممة بحيث على أن تسمح بأحداث صدى ذاتي في كل من E.coli والخلايا الثديية يكون التعبير عن التعديل الوراثي للخلية الثديية الداخلة للحمض النووي DNA الخارجي تحت تحكم سلسلة الحمض النووي DNA الفرعي المعجل/ المنظم. وهذا العامل الوراثي المخصص pSVDM-19 أو في المخزون E.coil HB101 تم إيداعه في ٢٣ أغسطس

١٩٨٥ بواسطة وحدة تجميع المواد المستزرعة من النوع الأميركية ١٢٣٠١ Parklawn Drive,

Rockville, Maryland رقم الدخول A. T. C. C. 53241 .

أما المعالجة النوعية المرتبطة ببناء حامل التعديل الوراثي فهي كالاتي : تم تصنيع سلسلة حمض نووي DNA بتشفير رئيسي على نحو ما هو موضح في الجدول ١٣ أدناه .

٥ جدول ١٣

-17									
<u>HindIII</u>					Met Trp				
5'	-	A	GCT	TCC	AAC	ACC	ATG	TGG	
3'	-	AGG	TTG	TGG	TAC	ACC			
-10									
Leu	Gln	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Val
CTG	CAG	AGC	CTG	CTG	CTC	TTG	GGC	ACT	GTG
GAC	GTC	TCG	GAC	GAC	GAG	AAC	CCG	TGA	CAC
-1 +1									
Ala	Cys	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Leu		
GCC	TGC	AGC	ATC	TCT	GCA	CCC	CTG	GGC	G -3'
CGG	ACG	TCG	TAG	AGA	CGT	GGG	GAC	-5'	
<u>ApaI</u>									

١٠

pPo2 plasmid كقطعة كبيرة ثابتة ناتجة من HindIII المهضومة والمهضومة جزئياً

١٥ بواسطة PvuII) لتكوين بلزميد pVS-Ppo1 . وترتبط قطعة سلسلة GM-CSF المصنعة في الشكل

٣ مع pSV-Ppo1 (على أثر انشقاقها بواسطة HindIII وApaI) وذلك لإنتاج بلزميد plasmid

. pSVGM-Ppo1

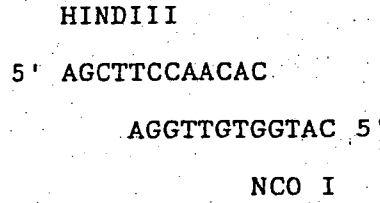
إن رواسب فوسفات الكالسيوم (١-٥ ميكرو جرام) من بلزميد pSVGM-Ppo1 plasmid DNA تتحول إلى ألواح مزدوجة مقاس ٦٠ مللي متر من ألواح خلايا COS-1 بصفة أساسية كما هو مبين في ويجلر وآخرين Cell, Wigler, et al., ١٤، ٧٢٥-٧٣١ (١٩٧٨). وكوحدة ضابطة ، يتحول بلزميد pSVDM-19 plasmid أيضاً إلى خلايا COS-1 . يتم حصد المادة العائمة (الطافية) من الأنسجة المستزرعة لمدة ٥ أيام بعد انتقال العدوى ويتم تحليلها وتقييمها بالنسبة لفعالية hpG-CSF . وكانت نواتج hpG-CSF [A1a¹] من المواد العائمة بالأنسجة المستزرعة في حدود ١ إلى ٢,٥ ميكرو جرام/ مللي لتر على وجه التقريب. وعقب التعبير عن التعديل الوراثي الناجح بخصوص hpG-CSF [A1a¹] الناتج عن تشفير لبلزميد pSVGM-Ppo1 plasmid في خلايا COS-1 . تم بناء حامل وراثي آخر يشتمل على سلسلة GM-CSF للإنسان ولكن مع شفرة لمتبقيات الثريونين threonine (الحادث طبيعياً عند الموضع ١ للـ hpG-CSF) والذي سجل محل شفرة الالانين alanine عند ذلك الموقع .

وباختصار ، يتم تصنيع أوليجو نيكلوثاينيد (5' CAGCATCTCTACACCTCTGGG) للموقع الموجه للطفرة (SDM) (التحول الخلفي). أما قطعة HindIII إلى hpG-CSF BamHI في pSVGM-Ppo1 فحص ترتبط في M13 mp10 للـ SDM . ويتم فصل عامل توريث (جين gen) hpG-CSF المصنع حديثاً والمحتوي على شفرة (Thr) في الموضع -١ وذلك بالانشقاق بواسطة HindIII و EcoRI . وبعد ذلك تتكاثر القطعة المستسخة في pSVDM-19 المحضرة عن طريق التكسير بنفس عاملي التقييد الاثنين من الإندونوكليز endonucleases . ويتم تحويل الحامل الوراثي الناتج (pSVGM-Ppo (Thr) إلى خلايا COS ويقاس الناتج من hpG-CSF في الطبقة الطافية بالأنسجة المزروعة والذي أتضح أنه يتراوح من ١ إلى ٥ ميكرو جرام/ مللي لتر .

وأخيراً ، فإن سلسلة العوامل الوراثية المفصولة الموصوفة في المثال ٥ تستخدم لتكوين حامل وراثي للتعديل الوراثي للخلية الثديية hpG-CSF . وبمزيد من التحديد ، يتم هضم pSVDM-19 بواسطة KpnI و HindIII والقطعة الكبيرة المستخدمة في الربط بأربع طرق من

الرابط الصناعي بواسطة HindIII و NcoI للنهايات اللاصقة كما هو مبين في جدول ٢١. وتم فصل قطعة NcoI-BamHI تحتوي على إكسون ١ عن pBR322 (8500 hpG-CSF) ، وهي وحدة فرعية مستنسخة للعوامل الوراثية ، وتم فصل قطعة BamHI-KpnI تحتوي على أكسونات exons ٢-٥ عن بلزميد pBR322 plasmid (وحدة فرعية مستنسخة للعوامل الوراثية 8500 hpG-CSF) . إن التعبير عن ناتج الحامل الوراثي للثدييات ، pSV/ghG-CSF قد ينتج ما يتراوح من ١ إلى ٢,٥ ميكرو جرام /مللي لتر hpG-CSF من خلايا COS المحولة .

جدول ١٤



مثال ١٠

١٠ يتعلق هذا المثال بالخواص الفزيائية physical and viological أو بمنتجات عديد بيبتيديات polypeptide وإعادة الترتيب التسلسلي الجيني genetic للاختراع .

١- الوزن الجزيئي

أظهرت نواتج الاتحاد الجيني genetic للـ phG-CSF للتعديل الوراثي المعبر عنه في E.coil بالمثال ٧ وجود وزن جزيئي ١٨,٨ KD عندما تم تحديده باختزال SDC-PAGE (كما هو متوقع من تحليل الحمض الأميني amino acid المستخرج في جدول ٧) بينما يتم إجراء عملية فصل طبيعي وتنقية على نحو ما تم وصفه في المثال (١) حيث أظهرت وجود وزن جزيئي بمقدار ١٩,٦ KD . أن وجود N-جليكانات N-glycans متجمعة مع المعزولات الطبيعية يمكن استبعاده بصورة فعالة بناءً على نقص متبقيات الأسبارجين asparagines في الترتيب التسلسلي الأولي لكل من hpG-CSF على نحو ما ورد في الجدول ٧ ولذا تم تصميم طريقة لتقدير ما إذا كان ٢٠ -٥ جليكانات O-glycans مسؤولاً عن اختلاف الوزن الجزيئي بين المعزولات الطبيعية

ومنتجات إعادة الاتحاد غير الجليكوزيلية non-glycosylated . يتم معالجة حوالي ٥ ميكرو جرام من المادة المعزولة م المفصولة بواسطة لوراميديز (Calbiochem, LaJolla, Calif.) neuraminidase وتتم إزالة ميكرو جرام من العينة كما يتم تحضين المادة المتبقية بواسطة ٤ O-جليكاناز (O-Glycanase) (إن-دو - x - n أسيتيل جليكتو سيامينيديز endo-x-
٥ G ، n-acetylgalactoseaminidase ، إنزيم ، Boston, Massachusetts) عند حرارة تبلغ ٣٧ درجة مئوية. ومن ثم تزال الأليكونات (Aliquots) بعد نصف ساعة وساعتين وأربع ساعات من التحضين . يتم تعريض العينات إلى SPS-PAGE جنباً إلى جنب بواسطة مادة إعادة الاتحاد المشتق لـ E. coli. وبعد معالجة النيور أمينيداز neuraminidase ، فإن الوزن الجزيئي الظاهري المفصول مزاح من ١٩,٦ إلى ١٩,٢ KD ويزال بقيمة حمض السيليك salic acid .
١٠ وبعد حوالي ساعتين من المعالجة بـ ٥-جليكاناز O-glycanase يزاح الوزن الجزيئي من ١٨,٨ وهو ما يتطابق مع وزن الجزيئي الظاهري للمادة المشتقة من E. coli . إن حساسية شكل الكربوهيدرات carbohydrate بالنسبة للنيور أمينيداز neuraminidase و ٥-جليكاناز O-glycanase تدل على الشكل الجديد للعنصر الكربوهيدراتي N: carbohydrate - أسيتيل نيورامينيم أسيد N-acetylneuraminic (٦-٢) (جلكتوز β galactose (١-٣) N-أسيتيل جلكتو سيامين N-acetylgalactoseamine-R حيث R تمثل السيرين serine أو الثريونين
١٥ . threonine

٢- امتصاص H^3 -ثيميدين :

تم تحليل التكاثر الحثي لخلايا cells نخاع عظم الإنسان بناءً على زيادة H^3 -ثيميدين thymidine المدمج . وتم تعريض نخاع عظام إنسان من متبرعين أصحاء لقطع مكثف بواسطة فيكول هيباكو Ficoll Hypaque (١,٠٧٧ جرام/ملي لتر ، pharmacia) ويتم تحويل الكثافة المنخفضة إلى محلول في وسط إسكوف (Iscove's) (GIBCO) المحتوي على ١٠٪ من سائل جنين بقرى bovine serum وجلوتامين pen-strep glutamine . وبناءً عليه يتم تحضين 2×10^4

من خلايا نخاع عظام الإنسان أما في وسط تحت التحكم (وسط ضابط) أوفي مواد E.coil التي أعيد اتحادها الجيني genetic وفقاً للمثال ٧ في ٩٦ طبق ذوق قاع مسطح عند ٣٧ درجة مئوية في ٥٪ CO₂ في الهواء لمدة يومين. ثم تحليل وتقييم العينات بالمضاعفة وقد تراوحت درجة التركيز على مدى ١٠,٠٠٠ ضعفاً. بعد ذلك تم تزويد الأنسجة المستزرعة بنبضات لمدة ٤ ساعات بواسطة ٠,٥ ميكرو كوري/ Well من H³-ثيميدين (New England Nuclear, Boston, Mass.) ٥

thymidine وتم قياس H³-ثيميدين المأخوذ كما هو مبين لدى فينتيوا وآخرين Ventua, et al. Blood ٧٨١,٦١ (١٩٨٣). في هذا التحليل التقييمي يمكن لمعزولات hpG-CSF للإنسان أن تقوم باستحثاث H³ ثيميدين thymidine المدمج في خلايا نخاع عظام الإنسان عند مستويات تزيد بما يتراوح بين حوالي ٤ إلى ١٠ مرات عن المواد الطاقية الضابطة (التحكم) Supematots وللمادة hpG-CSF المشتقة من E.coil في المثال (٦) نفس الخواص ١٠ والصفات .

تم إجراء دراسة ثانية لتكاثر خلايا نخاع عظام الإنسان باستخدام وسط تزرع لنقل العدوى COS-1 trans fected من خط السرطانية على غرار ما هو محضر في المثال (٩) وتم التوصل إلى نفس النتائج والتي تشير إلى أن تشفير نواتج عديد ببتيد polypeptide قد تعزز فعلياً في وسط التزرع كموا فعاله . ١٥

٣- استحثاث تميز + WEHI-3B D

إن سعة المواد المشتقة E.coil التي أعيد اتحادها لاستحثاث تميز خط الخلية السرطانية اللوكيمية النخاعية وأحادية الخلية للفأر + WEHI-3B D وقد تم تحليلها في وسط آجار شبه صلب كالموصوف في ميتكالف Metcalf, Int. J. Cancer ٢٢٥,٢٥ (١٩٨٥). وقد تم تحضير نواتج hpG-CSF من إعادة الاتحاد الجيني genetic وضابطات وسط التحكم عن طريق + WEHI-3B D ٢٠

٦٠ خلايا/Well في حرارة بلغت ٣٧ درجة مئوية في ٥٪ CO₂ في الهواء لمدة ٧ أيام. وتم

تحضين العينات في ٢٤ طبق من الأطباق ذات القاع المفلطح بينما تراوحت درجات التركيز على نطاق مداه ٢٠٠٠ ضعفاً. وقد تم تصنيف السلسلة على أنها مميزة جزئياً أو ، مميزة كلياً. وتم عد وإحصاء خلايا cells السلسلة بواسطة المجهر الميكروسكوب microscopically. وقد ثبت أن E.coil الذي أعيد اتحاده جينياً يقوم باستحثاث عملية التميز والتفاضل .

٥ -٤ تحاليل GFU-GM, BFU-E and CFU-GEMM

أتضح أن المعزولات الطبيعية G-CSF (hpG-CSF) و G-CSF (RHPG-CSF) للجينات المتعددة الفعالية لدى الإنسان تسبب في تميز ونكاثر الخلايا النخاعية لعظام الإنسان وتقاس وهذه الفاعلية والأنشطة في CFU-GM (بروكسيمير وآخرين Exp. HematoL Broxmeyer, et al. ٨٧,٥ (١٩٧١) واختبارات تحاليل CFU-GEMM, PFU-E (لو وآخرين Lu, et al., Blood ٢٥٠,٦١ (١٩٨٣) باستخدام خلايا نخاعية للعظام غير اللاصقة ومنخفضة الكثافة لمتطوعين أصحاء من بني الإنسان. ينطوي الجدول ٢٥ أدناه على المقارنة بين الفاعلية والأنشطة البيولوجية لدى PFU-E and CFU-GE و CFU-GEmm باستخدام ٥٠٠ وحدة من hpG-CSF أو rhpG-CSF .

وقد تم إجراء معظم تحاليل سلسلات خلايا النخاع العظام غير لاصقة ومنخفضة الكثافة . وتم تعريض خلايا نخاع عظام الإنسان إلى قطع كثافي بواسطة Ficoll-Hypaque (كثافة ١,٠٧٧ جرام/سم^٣ pharmacina) . وكانت الخلايا منخفضة الكثافة قد أعيد تحويلها محلول وسط Iscove's معدل بوسط Dukbecco's يحتوي على مصل لجنين الحجل للالتصاق على أطباق تزرع أنسجة فالكون (Becton Dickenson, Cockeysville, MD ، رقم ٣٠٠٣) لمدة ساعة إلى ساعة ونصف عند ٣٧ درجة مئوية .

جدول ٢٢

	CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM
MEDIUM	0+0	26+1	0+0
NATURAL			
hPG-CSF	83+5.4	83+6.7	4+0
rhPG-CSF	87+5	81+0.1	6+2

٥

ويتكون وسط التحكم من وسط Dulbecco المعدل Iscove's مع ١٠٪ FCS ، ٠,٢ مللي مولر هيمين hemin ووحدة واحدة من نظام تكوين الكرات الحمراء .

١٠ ولتحليل CFU-GM ، توضع الخلايا المستهدفة عند 1×10^6 في ١ مللي لتر من ٠,٣ وسط تزييع اجار والذي يتضمن وسط McCoy's 5A و ١٠٪ من مصل جنين العجل . تم تسجيل وسائط التزييع بالنسبة للتكاثر (أكثر من ٤٠ خلية لكل تجمع) وتم تقسيم الشكل على مدى سبعة أيام وقد ظهر عدد السلاسل كمتوسط SEM $\pm$ كما في طريقة المقطرة من واقع ألواح المضاعفة الرباعية اللوح quadruplicate .

١٥ ولتحليل BFU-E and CSF-GEMM ، تضاف (1×10^6) من الخلايا إلى مللي لتر واحد من مخلوط وسط Dulbecco المعدل Iscove's (Gibco) و ٠,٨٪ ميثيل سليولوز methyl cellulose ، و ٣٠٪ مصل جنين عجل fetal calf serum ٠,٥ ، نانومولر ٢- ميركتو إيثانول 2- mercaptoethanol ، ٠,٢ مللي مولر هيمين hemin واحدة من عناصر نظام تكوين كرات الدم الحمراء المعاد اتحاده. ويتم تحضين الأطباق في جو رطب من ٥٪ CO_2 و ٥٪ أوكسجين oxygen من أجهزة الكيمياء الحيوية ريمينق (Reming Bioinstruments) (Syracuse, N.Y.). ويتم تسجيل عدد السلاسل بعد ١٤ ساعة من التحضين . ويمكن رؤية عدد السلاسل بطريقة SEM $\pm$ حسب تحديدها من ألواح المضاعفة . ٢٠

ومن واقع تحليل السلاسل المتكونة في CFU-GM واتضح تكون كلورو اسيتيك استيريز chloracetate esterase موجب واستيريز esterase غير نوعي (ألفا- نفتيل اسيتيت استيريز alpha- naphthyl acetate esterase) سالب متكونة من سلاسل للخلايا الحبيبية من حيث النوع . وقد وجد أن لكل من hpG-CSF و rhpG-CSF فاعلية نوعية تبلغ حوالي 1×10^4 وحدة/ميكرو جرام بروتين protein نقي عند تحليلها بسلسلة من التخفيضات في تحليل CFU-GM. وإن بيانات BFU-E and CSF الموجودة في جدول ٢٥ تمثل ثلاث تجارب منفصلة وهي مشابهة للمعلومات الواردة سابقاً عن hpG-CSF الطبيعية. ومن المهم أن نتذكر أن rhpG-CSF يكون نقياً للغاية وخالياً من عوامل النمو لدى الثدييات المحتملة من حيث تأثير إنتاجها في E.coil. وذلك فإن rhpG-CSF القدرة على حمل مخلوط السلاسل (CFU-GEMM) و BFU-E عند إضافته في وجود عنصر من نظام تكوين كرات الدم الحمراء الناتج من إعادة الاتحاد الجيني genetic .

٥- تحليل رباط الخلية :

ورد آنفاً أن خلايا WEHI-3B (D+) والخلايا السرطانية لدى الإنسان والمشتقة من الخلايا السرطانية التي تم تشخيصها متوفرأ ترتبط مع G-CSF غير مكتسب للإشعاع أو CSF-B للإنسان كما أن قدرة hpG-CSF و rhpG-CSF الطبيعية على إتمام الارتباط ^{125}I - hpG-CSF في خلايا cells السرطانية لدى الإنسان وفي الفأر قد تم اختبارها . أضيف أيودين iodinated إلى hpG-CSF الطبيعي عالي النقاوة تزيد نسبة نقاوته على ٩٥٪ ، ١ ميكرو جرام [تجديد و آخري Tejedor, et. Al., Anal. Biochem., ١٤٣, ١٢٧ (١٩٨٢)] وتم عزله من المتفاعلات بواسطة الرسم الكروماتوجرافي جل الترشيح والمبادل الأيوني. وبلغ النشاط والفاعلية النوعية للـ ^{125}I - hpG-CSF حوالي ميكرو كوري/ ميكرو جرام بروتين protein . يتم اختيار تحضيرات خلايا سرطانية ((WEHI-3B (D+) للفأر وخليتين من خلايا الليوكيميا leukeminas النخاعية للدم المحيطي للإنسان) (ANLL فصل واحد كـ ٤ M والآخر MOB) نسبة لقدرتها على الارتباط والاتحاد مع ^{125}I - hpG-CSF .

تغسل خلايا (سرطان الدم) النخاعية المستخرجة حديثاً من الدم المحيطي للإنسان والفأر ٣ مرات بواسطة خلايا WEHI-3B (D+) .BSA %١ / PBS خلايا (١٠ × ٥) أو خلايا سرطان الدم اللبوكيما leukeminas المحضرة حديثاً حيث تحضن على هذا (١٠٠ ميكرو لتر) BSA %١ PBS/ في وجود أو غياب درجات تركيز مختلفة (الحجم: ١٠ ميكرو لتر) من , rhpG-CSF hpG-CSF أو GM-CSF غير المشعة في وجود hpG-CSF-¹²⁵I (حوالي ١٠٠,٠٠٠ cpm أو ١ نانو جرام) عند درجة صفر مئوية لمدة ٩٠ دقيقة (الحجم الكلي : ١٢٠ ميكرو لتر). بعد ذلك يعاد تحويل الخلايا إلى محلول وتفرّد على طبقات مقاس ٢٠٠ ميكرو لتر من الثلج البارد FCS في أنبوب بلاستيكي ٣٥٠ ميكرو لتر للطرّد المركزي، ويتم إجراء الطرد المركزي (١٠٠٠ جرام ، ١ دقيقة). ويتم تجميع الكريات يقطع نهاية الأنبوبة ثم يتم إحصاء عدد الكريات والمادة الطافية كل على حده في عداد الجاما gamma (Packard) . ١٠

يتم تعين الارتباط النوعي (cpm) كارتباط كلي في غياب منافس (متوسط المضاعفات) مطروحاً من الاتحاد (cpm) في وجود زيادة بمقدار ١٠٠ ضعف hpG-CSF بدون إشعاع (ارتباط غير نوعي). إن الحد الأفقي للارتباط غير النوعي هو ٢٥٠٣ cpm لخلايا WEHI-3B (D+) و ١٠٧٢ cpm لخلايا (ANLL (M4) و ١١٢٥ cpm لخلايا (ANLL (MOB). يتم إجراء التجريبتين ١ و ٢ في أيام منفصلة باستخدام نفس تحضير hpG-CSF-¹²⁵I وتظهر التكوين الداخلي المضطرد في نسبة التثبيط المذكورة بخصوص ٢٠٠٠ وحدة من hpG-CSF يشتمل الشكل ٩ على المعلومات التي تم الحصول عليها . ١٥

Competitor	(U/ml)	WEHI-3B(D ⁺) cpm % Inhib.	ANL (M ⁺) cpm % Inhib.	ANL (MSB) cpm % Inhib.
<u>Exp. 1</u>				
none	0	6,608	-	1,218
natural	10,000	685	90	-
hpg-CSF:	2,000	1,692	74	34
	200	2,031	69	97
				-376
				0
rhpg-CSF:	10,000	0	100	0
	2,000	1,185	82	202
	200	2,330	65	83
				0
<u>Exp. 2</u>				
none	0	2,910	0	-
natural	2,000	628	78	-
hpg-CSF:				
GM-CSF:	2,000	3,311	0	-

وكما هو موضح في الشكل ٩ فإن ^{125}I -hpG-CSF أظهر التطور التسلسلي لخلايا سرطان الدم WEHI-3B. يتم تثبيط الارتباط بطريقة تعتمد على الجرعات بواسطة hpG-CSF الطبيعي غير المشبع وليس GM-CSF. بالإضافة إلى ذلك، يلاحظ وجود ارتباط hpG-CSF الطبيعية مع الخلايا سرطان الدم النخاعية وحيدة النواة لدى الإنسان (ANLL, M4). ويلاحظ أن الارتباط بهذه الخلايا متوازي في استجابته مع ^{125}I -hpG-CSF الطبيعي في المستزرعات السائلة بالتمييز إلى ملتهفات ناضجة محكومة بمقتضيات على الشكل والتشكل. وإن غياب ارتباط ^{125}I -hpG-CSF الطبيعي بخلايا اللوكيميا cells leukeminas (سرطان الدم) النخاعية المأخوذة من المريض الآخر (ANLL, M5B) تدل على أن سرطانات دم معينة (leukemias) قد تعبر عن أو تقتصر إلى وحدات استقبال hpG-CSF. كما أن قدرة rhpG-CSF على التنافس لإتمام ارتباط ^{125}I -hpG-CSF الطبيعي على غرار hpG-CSF على التنافس لإتمام ارتباط ^{125}I -hpG-CSF الطبيعي على غرار hpG-CSF الطبيعية، وتدل على أن وحدات الاستقبال تدرك كلا الشكلين .

وأن هذه الدراسات التي توضح أن ارتباط ^{125}I -hpG-CSF الطبيعي مع خلايا سرطان الدم تتوازي مع وسائط الاستزراع من حيث قدرة hpG-CSF الطبيعي على استحثاث الخلايا الحبيبية ووحيدة النواة لتمييز كثافة الضوء لخلايا نخاع العظام التي تم الحصول عليها من مريض مصاب بسرطان دم حاد (M3) ومريض آخر مصاب بسرطان دم myeloblastic (M2). ويتم زراعة من كل مريض لكل ٤ أيام في وسط تزرع بمفردها أو في وجود 1×10^6 وحدة من rhpG-CSF. أن الخلايا المأخوذة من وسائط التزرع الضابطة M3 المحضنة بمفردها لا تزال في سط من نوع promyelocyte في حين أن الخلايا المزروعة في وجود rhpG-CSF أظهرت وجود خلايا ناضجة من نوع النخاعي متضمنة خلية نخاعية متبدلة على شكل شريط كبير وقطع من خلايا وحيدة النواة neutrophils. وأن التميزات الفعلية لهذا المريض تتمثل في مئة (١٠٠) خلية تم تقييمها لأغراض الضبط بنسبة ١٠٠٪ promyelocyte وخلايا rhpG-CSF المعالجة ، و ٢٢٪

جرثومة زائدة promyelocyte ، و٧٪ خلايا نخاعية، و٣٥٪ خلايا نخاعية متبدلة ٢٠٪ شريط زائد كثرات الخلايا cells ، ١٤٪ خلايا وحيدة النواة ، ٢٪ خلايا ملتهمة .

ولعل ما يجدر ملاحظته هو أنه لا تزال واحدة من عديدة الأنوية الحبيبية للخلايا تحتوي على prominent auer rod ونشر على أقل تقدير إلى أن هذه الخلية تمثل خلية متميزة تنتمي لخلايا سرطان الدم. أما الخلايا المأخوذة من المريض الثاني المصاب بسرطان الدم ٥ myeloblastic (M2) فقد تم أيضاً تزريعها لمدة ٤ أيام في وجود أو غياب rhpG-CSF. وأما التحليل الضوئي/المرئي لخلايا M2 المزروعة بمفردها في وسط تزريع فقد أسفر عن وجود خلايا كبرى "شبه جرثومة" ، وبعضها نووي وعند معالجة بعض الخلايا M2 بواسطة rhp-CSG نجد أنها تتميز إلى سلسلة تجمعات خلايا متعادلة بيضاء ناضجة لتظهر متبقيات قُضبان auer rols في مركز (لب) الخلايا المتعادلة البيضاء مما يدل على تميز يحدث في الخلايا بجانب الوحدة المستسخة من سرطان الدم. وأن التمييز الفعلي لحوالي ١٠٠ خلية قد أسفر عن ظهور خلايا ضابطة متحكممة يتكون من قوام جرثومي بنسبة ١٠٠٪ . أما الخلايا المعالجة من rhpG-CSF فهي تتكون من جراثيم بنسبة ٤٣٪ وخلايا نخاعية بنسبة ١٪، وخلايا نخاعية بديلة بنسبة ١٥٪، وأشكال شريطة بنسبة ٢٨٪ مع خلايا متعادلة بيضاء متجمعة ، promonocytes بنسبة ٢٪ وخلايا وحيدة النواة بنسبة ١١٪. تم أيضاً اختبار خلايا سرطان الدم (اللوكيميا leukemias) للتمييز عند أربعة درجات أخرى لتركيز rhpG-CSF وهي (١٠ × ٥ ، ١٠ × ١ ، ١٠ × ٢,٥ ، ١٠ × ٤) وهي ١٠ × ٥ وحدة/ملي لتر (البيانات غير موضحة). حتى أنه عند الاختبار في تركيز — rhpG-CSF بأقل درجة (١٠ × ٥ وحدة/ملي لتر) اتضح أن هناك تميز ملحوظ (الخلايا cells تتميز فيما وراء الخلايا النخاعية) للـ M3 (٥٠٪) و M2 (٣٧٪) لخلايا سرطان الدم .

لتحضير أجسام مضادة عديدة الاستنساخ (polyclonal) للتحليل المناعي يستعمل مولد مضاد (antigen) أنتيجين من G-CSF متعددة الفعالية تتم تنقيته من خط خلية سرطان المثانة للإنسان ٥٦٣٧ (1A6) على نحو ما هو محضر في المثال ١ (ب). ويتم تنقية هذه المادة بنسبة تصل إلى ٨٥٪ بناءً على نترات الفضة الصابغة لجل البولي أكريلاميد (polyacrylamide gels)، يتم تحضين ورفع صناعة فأر Balb/2 يبلغ عمرة ستة أسابيع بحقنه بالأنتيجين antigen في مواقع عديدة تحت الجلد (subcutaneous). يعاد تحويل الأنتيجين antigen إلى معلق في PBS ويتم استحلابه بأحجام متساوية من Freund's المساعد التام. وتتراوح جرعة الأنتيجين antigen من ٥ إلى ٧ ميكرو جرام وتعطي للفأر بالحقن. وتعطي جرعة المنشط المناعي لمدة ١٨ يوماً آخر بكمية متساوية من مستحلب الأنتيجين antigen وبنفس الحجم من المساعد غير التام freunds لمدة ٤ أيام أخرى ثم يؤخذ مصل الفأر للاختبار بالنسبة لـ G-CSF ومتعددة الفعالية لدى الإنسان. ١٠

وتغطي أشرطة Dynatech Lmmulon II Removawell بواسطة ٥ ميكرو جرام/ملي لتر من hpG-CSF في ٥٠ ملي مولر محلول منظم من كربونات أو بيكربونات carbonate-bicarbonate $pH = 9.2$. وتغطي الفتحات بواسطة ٠.٢٥ ميكرو جرام في حجم ٥٠ ميكرو لتر. ويتم تحضين ألواح الأنتيجين antigen المغطاة لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الغرفة وأثناء الليل عند ٤ درجة مئوية. ويصفى المحلول وتحضن الألواح لمدة ٣٠ دقيقة بواسطة PBS المحتوي على ٥٪ BSA لوقف السطح الفعال. يصفى المحلول ثم يضاف preimmune المخفف أو مصل الاختبار إلى الفتحات وتحضن لمدة ساعة عند درجة حرارة الغرفة. تخفف الأمصال بواسطة PBS رقمها الهيدروجيني ٧.٠ pH المحتوية على ١٪ BSA يصفى محلول المصل وتغسل الألواح ٣ مرات بمحلول غسيل (KPL, Gaithersburg, Md) يضاف حوالي ٢٠٠,٠٠٠ cpm من مضاد الفأر IgG الأرنب الأيوديني (NEN, Boston, Mass) في ٥٠ ميكرو لتر PBS عند رقم هيدروجيني ٧.٠ = pH المحتوية على ١٪ BSA إلى كل فتحة (WELL). بعد التحضين لمدة ١١/٢ ساعة عند درجة حرارة الغرفة، يصفى المحلول وتغسل الألواح ٥ مرات بمحلول غسيل. تزال الفتحات

(WELLS) من الحوامل ويتم إحصاء عددها بعدد جاما ٥٥٠٠ Beckman gamma. ويظهر
مصل الفأر عالي العيارية فاعلية عالية أكبر بـ ١٢ جزء من مصـل Preimmune القابل عند
تخفيفه ١: ١٠٠ .

كما يتم تحديد الخواص المناعية للـ hpG-CSF المشتق من E.coil بفاعليتها لمصل الفأر
عالي العيارية وخاصة بالنسبة لـ الخلية النخية المشتقة من hpG-CSF .

وبـ ٠,٢٥ ميكرو جرام من بروتين protein نفي ٩٠٪ ومشتق من E.coil يتم تغطية للـ
Immulon II Removawells في حجم ٥٠ ميكرو لتر مصـل فأر كما هو موصوف أعلاه .
ويظهر مصـل الفأر عالي العيارية ٢٤ جزءاً من الفعالية بالنسبة للمادة المشتقة من E.coil
وبالنسبة لمصل Preimmune المقابل عند تخفيفه ١: ١٠٠ .

١٠ -٧ التحليل الحيوي لنظير السيرين (Serine)

حضرت ، [Ser¹⁷]hpG-CSF ، [Ser³⁶]hpG-CSF ، [Ser⁴²]hpG-CSF ، hpG-
CSF, [Ser⁶⁴] و [Ser⁷⁴]hpG-CSF وفقاً لما في المثال (٩) ويتم فحصها بالنسبة لفاعلية hpG-
CSF في ألتقاط- ثيميدين ³H-thymidine وتحاليل CFU-GM و WEHI3B D+ في كل تحليل
مشابه [Ser¹⁷] له فاعلية مقارنة بالجزيئات الناتجة من إعادة الإتحاد الجيني genetic والتي لها
تركيب طبيعي. المشابهات المتبقية الترتيب لها فاعلية أقل بـ ١٠٠ جزء في ألتقاط ²H- ثيميدين
²H-thymidine ، ٢٥٠- جزءاً أقل فاعلية في تحليل CFU-GM و ٥٠٠- جزءاً أقل فاعلية في
تحليل WEHI3B D+ هذه المعلومات تساند الافتراض الذي يقول أن الأحماض الأمينية amino
acid المتبلورة (Cyteines) عند المواضع ٣٦، ٤٢، ٦٤ و ٧٤ قد تحتاج إلى فاعلية حيوية كاملة.

٨- التحليل الحيوي في داخل جسم الإنسان

توصل مضخات Alzet® الإسموزية (Alzet Corp., Palo Alto, CA , Model 2001) بالوريد الوريحي وبواسطة أنبوبة التفريغ المثانة تحت الجلد في سبعة من ذكور من الهامستر hamster (حيوان شبيه بالجرذ) الذهبي السورية. تحتوي أربع من المضخات على محلول منظم من (٢٠ مللي مولر من أسيتات الصوديوم sodium acetate pH = ٥,٤ و ٣٧ مللي مولر من كلوريد الصوديوم sodium chloride و ١,٥ ملجم/مللي لتر من pHG-CSF المشتق من E.coil بينما ٥ تحتوي الثلاث مضخات الأخرى على المحلول المنظم (Buffer) فقط. معدل الضخ للمضخات الإسموزية يكن ١ ميكرو لتر/ساعة لمدة ٧ أيام. وفي اليوم الثالث بعد إدخال المضخات يكون متوسط عدد الخلايا المحببة للجرذات (الهلمتر) الأربعة المعالجة ٦- أجزاء أعلى من الثلاث المحتوية على (محلول منظم) وهذه الزيادة في عدد الخلايا المحببة تنعكس في زيادة ٤ أجزاء في الخلايا الليمفاوية الإجمالية. لا يتغير عدد خلايا الدم الحمراء بالمعالجة. تشير هذه النتائج إلى أن ١٠ المواد الناتجة من إعادة الاتحاد الجيني genetic تحدث زيادة في الإنتاج و/أو تحرير الخلايا cells في الثدييات .

بالإضافة إلى التواجد الطبيعي لجينات يشتمل hpG-CSF ، فإن الاختراع الحالي يشمل منتجات أخرى لـ hpG-CSF مشابهات البولي ببتيد polypeptide من hpG-CSF وأجزاء من hpG-CSF. في التالي ثاني خطوات الطلب المنشور المذكور أعلاه لـ ألتون وآخرون ١٥ Alton, et al. (WO/83/04053) يمكن بسهولة تصميم وصناعة شفرة جينية genes بتعبير ميكروبي له تكوين أولي يختلف عن الموضح هنا في خواصه موقعه لوحد أو أكثر التي لها من التبقيات (مثل، الاستبدالات والإضافات والوسطية والحذف). وخياراً يمكن تعديل الـ cDNA وجينات العوامل الوراثية بواسطة التقنية المعروفة بالموقع المباشر للجينات الطفرية والذي يستخدم لتوليد مشابهات ومشتقات مماثلة مثل تشارك هذه النواتج على الأقل واحدة من الخواص ٢٠ البيولوجية لـ hpG-CSF ولكنها تختلف في الخواص الأخرى. على سبيل المثال منتجات موضوع الاختراع ، تتضمن التي لها قصور foreshortened بواسطة الشطب أو تلك التي لا

تتحلل بالماء (إثبات نحو التميؤ) (ولذلك فإن تأثيرها يدوم أكثر من تلك ذات الوجود الطبيعي) أو تلك التي تتغير لشطب واحد أو أكثر من المواقع الفاعلة للـ ٢-جليكوسايلاشن 2-glycosylation (والتي تكون لها فاعلية أكثر للمنتجات الناتجة من الخميرة) أو تلك التي لها بقايا سيسيتين (Cysteine) واحدة أو أكثر مشطوبة أو مستبدلة بواسطة بقايا الانين (alanine) أو سيرين (Serine) والتي تكون سهلة الفصل في شكل فعال من النظام الميكروبي أو التي لها بقايا تيروسين (Tyrosine) واحدة أو أكثر مستبدلة بالفينيل الانين (phenylalanine) والتي بسهولة تقريباً ترتبط بمستقبلات hpG-CSF عند الخلايا المستهدفة. وكذلك تشمل أجزاء من البولي ببتيد (Polypeptide) تحمل أجزاء ثنائية مستمرة من سلاسل الحمض الأميني amino acid أو التكوينات الثانوية من خلال hp-CSF ، والتي تكون لأجزائها فاعلية واحدة مثل ؛ (ربط المستقبلات) وليست الأخرى (مثل ؛ فاعلية الضفر الإنتاجي) . والملاحظة المهمة أن الفعالية ليست ضرورية لأي واحدة أو أكثر من منتجات الاختراع لكي يكون لها استخدام علاجي [أنظر ويلاند وزملائه بيلوت ٤٤ ، ١٧٣-١٧٥ (١٩٨٥) (Weiland, et al., Blut, 44, 173-175 (1985) أو الاستخدام في مجالات أخرى كما في تحليل مضادات hpG-CSF ، المضادات المنافسة قد تكون مفيدة في حالات زيادة إنتاج hpG-CSF .

ووفقاً لتصو آخر للاختراع الحالي فإن سلسلة DNA الموصوفة هنا والمشفرة للبولي ببتيدات (polypeptides) hpG-CSF ذات أهمية بالنسبة للمعلومات ذات العلاقة بسلسلة الحمض الأميني amino acid لبروتين protein الثدييات والتي ليست متوفرة حتى الآن بالرغم من عمليات تحليل فصل المنتجات المتاحة في الطبيعة. سلاسل DNA لها أيضاً قيمة واضحة كمنتجات مؤثرة في التشييد الميكروبي على المستوى الصناعي لإنتاج hpG-CSF بمختلف تقنيات إعادة الاتحاد الجيني genetic. ولكن بطريق آخر فإن سلاسل DNA المتوفرة في هذا الاختراع مفيدة في توليد فيروس مفيد جديد وناقل كروموسومات DNA الدائرية ، وخلايا بكتيرية مستقبلة داخلية (eukaryotic) وخلايا بكتيرية مستقبلة (الحاضنة لنواة خلية معززة) (prokaryotic) (يتضمن خلايا

البكتريا bacterial cells والخميرة وخلايا الثدييات المزروعة في مزرعة) وطرق جديدة ومفيدة لزراعة مثل تلك الخلايا البكتيرية المستقبلية القادرة على التعديل الجيني genetic للـ hpG-CSF والمنتجات المتعلقة به. سلاسل DNA للاختراع هي مواد مناسبة بوضوح للاستخدام كمجسات (probes) مشعة لفصل hpG-CSF والبروتين protein المشفرة للجينات genomic الوراثة DNA للإنسان بالإضافة إلى cDNA وسلاسل DNA للعوامل الوراثة للأصناف الأخرى من الثدييات. ٥ وقد تكون سلاسل DNA مفيدة في مختلف طرق تصنيع البروتين protein (خلايا الحشرات) أو في العلاج الجيني genetic للإنسان والثدييات الأخرى. يتوقع أن تكون سلاسل DNA لهذا الاختراع مفيدة في التطوير الجيني genetic لأصناف الثدييات والتي قد تكون مفيدة كعوائل لها نواة حقيقية مستقبلية (eukaryotic) لإنتاج hpG-CSF ومنتجات hpG-CSF بكميات كبيرة. عموماً أنظر ، بالميتير وزملائه (1983) 809-814 (4625), Science, 222, Palmiter, et al., ١٠

لتطبيق أجزاء hpG-CSF ومشابهات البولي ببتيدات Polypeptide يصف الاختراع الفاعلية المناعية للببتيدات peptide المصنعة والتي تحصل سلسلة الحمض الأميني amino acid ثنائية في البروتين protein الموجود في الطبيعة . الجليكوبروتينات glycoproteins ، النيكلوبروتينات nucleoproteins. وقد اتضح بشكل خاص أن البولي ببتيدات polypeptide ذات الوزن الجزيئي المنخفض نسبياً تشارك في تفاعلات المناعة والتي تكون مشابهة في الفترة الزمنية وتمتد إلى تفاعلات المناعة الفسيولوجية physiologically الهامة للبروتينات proteins مثل مضادات الفيروسات هورمونات البولي ببتيد polypeptide hormones وما شابه ذلك. ومن بين تفاعلات المناعة لهذه البولي ببتيدات polypeptide هو إثارة تكوين الأجسام المضادة في حيوانات نشطة مناعياً . See, e.g., Lerner, et al., Cell, 23,309-310 (1981), Ross, et al., Nature, 294,654- ١٥ 656 (1981), Walter, et al., Proc. Natl/Acad. Sci. (USA), 77,5197-5200 (1980), Lerner, et al., Proct. Nati. Acad. Sci. (USA), 78,3403-3407 (1981), Walter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78,4882-4886 (1981), Wong, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78,7412- ٢٠

7416 (1981), Green, et al., Cell, 28,477-487 (1982), Nigg, et al., Proc. Natl. Acad.Sci. (USA), 79,5322-5326 (1982), Baron, et al., Cell, 28,395-404 (1982), Dreesman, et al., Nature, 295,185-160 (1982), and Lerner, Scientific American, 248, No. 2,66-74 (1983).
المتعلق بالفعالية والبيولوجية . See, also, Kaiser, et al., Science, 233,249-255 (1984)
للبنيدات peptide المشيدة والتي تشارك في التركيب الثانوي لهرمونات hormones الببتيد
peptide ولكن قد يكون لها مشاركة في التركيب الأساسي .

بينما يتم وصف الاختراع الحالي في شكل تجسيدات ، يكون معلوماً أن التغيرات والتعديلات
يمكن توفرها بالنسبة للخبراء في هذا المجال. لذلك كان القرض من عناصر الحماية أن تغطي
مثل كل هذه التغيرات المتكافئة والتي جاءت في مجال الاختراع كعناصر محمية .

١٠

١٥

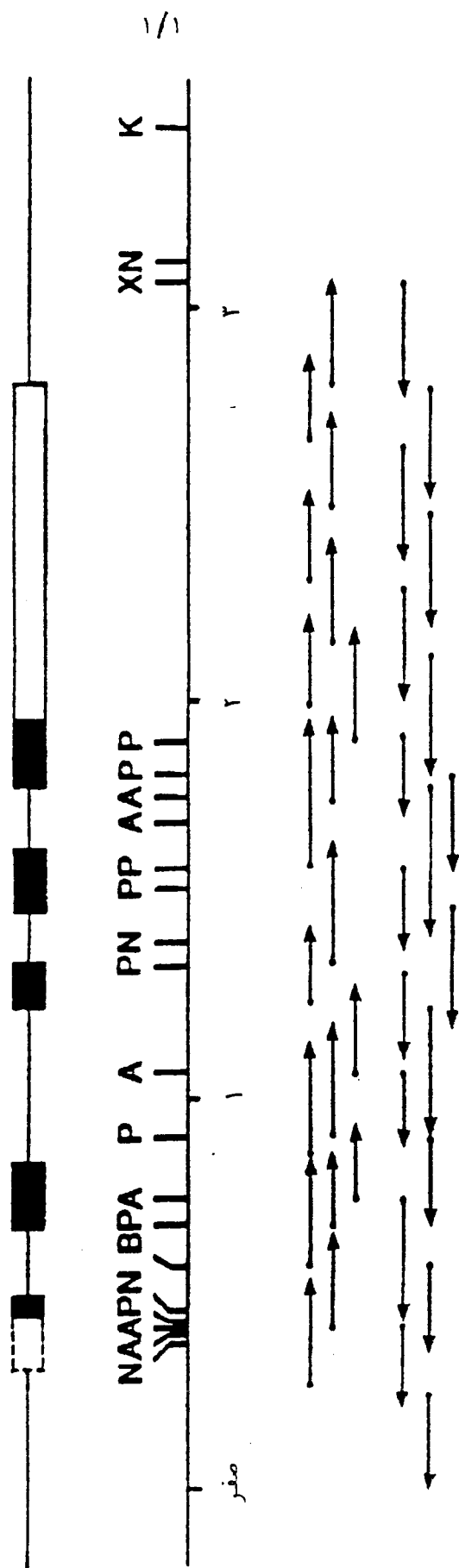
عناصر الحماية

- ١ - جزيئ DNA منقى ومعزول ليستخدم في تأمين التعديل الجيني genetic في ١
- ٢ الخلية البكتيرية المستقبلة prokaryotic (الحاضنة لنواة خلية معززة) أو الخلية ٢
- ٣ البكتيرية المستقبلة الداخلية eukaryotic ولمنتج عديد ببتيدات polypeptide الذي له ٣
- ٤ على الأقل جزء من التكوين البنائي الأساسي ، والنشاط الحيوي لتكوين الدم ٤
- ٥ hematopoietic من مصدر طبيعي لإنتاج عامل حفزي لتكوين الخلية الحبيبية ٥
- ٦ متعددة الفعالية - يتم اختيار DNA المذكورة من بين : ٦
- ٧ (أ) جزيئات DNA الموضحة في الشكل ٢، ٣ أو الأشكال المكملة لها ؛ ٧
- ٨ (ب) جزيئات DNA المهجنة hybridize إلى جزيئات DNA المعروفة في (أ) أو ٨
- ٩ جزيئات من ذلك المصدر . ٩
- ١٠ (ج) جزيئات DNA التي أخذت شفرتها الجينية genomic ، يتم تهجينها hybridize ١٠
- ١١ لجزيئات DNA والمعروفة في (أ) و (ب) . ١١
- ١ - ٢ جزيئ DNA نقي ومعزول والمشفّر للتعديل الجيني genetic في الخلية ١
- ٢ البكتيرية المستقبلة prokaryotic (الحاضنة لنواة خلية معززة) أو الخلية البكتيرية ٢
- ٣ المستقبلة الداخلية (eukaryotic) ولمنتج عديد ببتيدات polypeptide الذي له على ٣
- ٤ الأقل جزء من التكوين البنائي الأساسي ، والنشاط الحيوي لتكوين الدم ٤
- ٥ (hematopoietic) من مصدر طبيعي لإنتاج عامل حفزي لتكوين الخلية الحبيبية ٥
- ٦ متعددة الفعالية . ٦
- ١ - ٣ جزيئ cDNA وفقاً لعنصر الحماية ٢ . ١
- ١ - ٤ جزيئية DNA وفقاً لعنصر الحماية ٣ . ١
- ١ - ٥ جزيئ DNA مصنع وفقاً لعنصر الحماية ٢ . ١
- ١ - ٦ جزيئ DNA مصنع وفقاً لعنصر الحماية ٥، وتشتمل مستعمرة (codons) ١
- ٢ واحدة أو أكثر مفضلة للتعديل الجيني genetic في خلايا E.coli . ٢

- ١ ٧- جزيئ DNA مصنع وفقاً لعنصر الحماية ٥، تشتمل مستعمرة واحدة أو أكثر
- ٢ مفضلة للتعديل الجيني genetic في خلايا الخميرة .
- ١ ٨- جزيئ DNA وفقاً لعنصر الحماية ٢ ، يرتبط بالتكافؤ التساهمي بالمادة الكاشفة
- ٢ المرقمة .
- ١ ٩- جزيئ DNA وفقاً لعنصر الحماية ٨ ، حيث المادة الكاشفة هي مشعة مرقمة
- ٢ . radiolabel
- ١ ١٠- جزيئ DNA ذو تشكيل منفرد وفقاً لعنصر الحماية ٨ .
- ١ ١١- جزيئ DNA نقي ومعزول ومشفّر لجزء من عديد الببتيد polypeptide أو
- ٢ عديد الببتيد polypeptide المشابهة طبيعي المصدر لإنتاج عامل حفزي لتكوين
- ٣ الخلية الحبيبية متعددة الفعالية ولها نشاط حيوي لتكوين الدم من ذلك المصدر .
- ١ ١٢- جزيئ DNA منقى ومعزول وفقاً لعنصر الحماية ١١ لتشفير hpG-
- ٢ . [Ala¹]CSF
- ١ ١٣- بلازميد plasmid وظيفي حيوي أو فيروسي ناقل لـ DNA يشتمل على
- ٢ جزيئ DNA وفقاً لأحد عناصر الحماية ١، ٢ أو ١١ .
- ١ ١٤- خلية بكتيرية مستقبلية prokaryotic أو الخلية البكتيرية المستقبلية الداخلية
- ٢ (eukaryotic) تم تعديلها بواسطة ناقل DNA وفقاً لعنصر الحماية ١٣ بطريقة
- ٣ تسمح التعديل الجيني genetic لجزء من عديد الببتيد polypeptide المذكور أو
- ٤ شبيهة .
- ١ ١٥- طريقة لإنتاج عديد الببتيد polypeptide ، له جزء من التكوين البنائي
- ٢ الأساسي أو كل التكوين الأساسي وله نشاط حيوي لتكوين الدم بواسطة عامل
- ٣ حفزي حث لتكوين الخلية الحبيبية متعددة الفعالية من مصدر طبيعي والطريقة
- ٤ المذكورة تشتمل على :
- ٥ - النمو في ظروف تغذية مناسبة للخلايا البكتيرية المستقبلية (prokaryotic)

- ٦ (الحاضنة لنواة خلية معززة) أو الخلية البكتيرية المستقبلة الداخلية (eukaryotic)
- ٧ المعدلة بواسطة جزيئ DNA وفقاً لعنصر الحماية ١، ٢ أو ١١ ، بطريقة تسمح
- ٨ بالتعديل الجيني genetic لمنتج عديد الببتيد polypeptide المذكور ، وعزل منتج
- ٩ عديد الببتيد polypeptide من التعديل الجيني genetic لجزيئ DNA المذكور .
- ١ ١٦- جزيئ DNA منقى ومعزول وفقاً لعنصر الحماية ١١ ، لتشفير [phG-
- ٢ CSF]¹⁷ Ser .
- ١ ١٧- منتج عديد ببتيد polypeptide للتعديل الجيني genetic في الخلية البكتيرية
- ٢ المستقبلة prokaryotic (حاضنة لنواة خلية معززة) أو الخلية البكتيرية المستقبلة
- ٣ الداخلية (eukaryotic) لـ DNA وفقاً لعنصر الحماية ١٥ .
- ١ ١٨- بلازميد وظيفي حيوي أو ناقل DNA فيروسي viral يشتمل على جزيئ
- ٢ DNA وفقاً لعنصر الحماية ١٦ .
- ١ ١٩- خلية بكتيرية مستقبلة (a prokaryotic) (حاضنة لنواة خلية معززة) أو الخلية
- ٢ البكتيرية المستقبلة الداخلية (eukaryotic) خلية cell عدلت جينياً بواسطة ناقل لـ
- ٣ DNA وفقاً لعنصر الحماية ١٧ .
- ١ ٢٠- جزيئ DNA منقى ومعزول وفقاً بعنصر الحماية ١١ ، لتشفير مشابهاً لـ
- ٢ hpG-CSF تم اختيارها من المجموعة المتكونة من :
- ٣ [Met-¹] hpG-CSF
- ٤ [Met-³⁶] hpG-CSF
- ٥ [Met-⁴²] hpG-CSF
- ٦ [Met-⁶⁴] hpG-CSF
- ٧ [Met-⁷⁴] hpG-CSF
- ٨ [Met-¹, Ser¹⁷] hpG-CSF
- ٩ [Met-¹, Ser³⁶] hpG-CSF

- [Met⁻¹, Ser⁴²] hpG-CSF ١٠
- [Met⁻¹, Ser⁶⁴] hpG-CSF ١١
- [Met⁻¹, Ser⁷⁴] hpG-CSF ١٢
- ٢١- خلية بكتيرية (a prokaryotic) (حاضنة لنواة خلية معززة) أو الخلية ١
- البكتيرية المستقبلية الداخلية (eukaryotic) عدلت جينياً بواسطة جزيئ DNA وفقاً ٢
- لعنصر الحماية ١، بطريقة تسمح لخلية مستقبلية بتعديل منتج عديد الببتيد ٣
- polypeptide المذكور . ٤
- ٢٢- خلية An E.coli مستقبلية وفقاً لعنصر الحماية ٢١ . ١
- ٢٣- خلية خميرة مستقبلية وفقاً لعنصر الحماية ٢١ . ١
- ٢٤- خلية ثديية مستقبلية وفقاً لعنصر الحماية ٢١ . ١
- ٢٥- خلية E.coli مستقبلية وفقاً لعنصر الحماية ١٤ . ١
- ٢٦- خلية خميرة مستخدمة وفقاً لعنصر الحماية ١٤ . ١
- ٢٧- خلية ثديية مستقبلية لعنصر الحماية ١٤ . ١
- ٢٨- طريقة وفقاً لعنصر الحماية ١٥ ، حيث الخلايا المستقبلية المذكورة هي خلايا ١
- E.coli . ٢
- ٢٩- طريقة وفقاً لعنصر الحماية ١٥ ، حيث الخلايا المستقبلية المذكورة هي خلايا ١
- خميرة . ٢
- ٣٠- طريقة وفقاً لعنصر الحماية ١٥ ، حيث الخلايا المذكورة هي خلايا ثديية . ١



شكل (١١).