

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 916067 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **916067**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 15/12
C12N 15/85

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.12.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.12.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **28.06.1992**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

27.12.1990 EP 90811030 30.04.1991 EP 91810327

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • F. Hoffmann - La Roche AG, 124 Grenzacherstrasse, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Devos, Rene, Belgium, BELGIA, (BE)

2 • Fiers, Walter, Belgium, BELGIA, (BE)

3 • Plaetinck, Geert, Belgium, BELGIA, (BE)

4 • Tavernier, Jan, Belgium, BELGIA, (BE)

5 • van der Heyden, Jose, Belgium, BELGIA, (BE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Ihmisen interleukiini 5-reseptori

Receptor för humant interleukin 5

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

6479 DSM

Ihmisen interleukiini 5 -reseptori

Interleukiini 5 (IL-5 tai IL5) on T-solujen ja syöttösolujen erittämä lymfokiini, jolla on biologisia vaikutuksia B-soluihin ja eosinofiileihin. Vaikutus B-soluihin näyttää olevan rajoittunut hiiren järjestelmään. Joukossa määrityksiä, jotka koskevat ihmisen B-solujen aktivoitumista tai erilaistumista, ei voida löytää havaittavissa olevaa aktiivisuutta. [Clutterbuck ym., Eur. J. Immunol. 17, 1743-1750 (1987)].

Hiiren hematopoieesissa IL-5 on selektiivinen signaali eosinofiilisen kehityslinjan lisääntymiselle ja erilaistumiselle [Yamaguchi ym., J. Exp. Med. 167, 43-56 (1988)]. Tässä suhteessa IL-5:n toiminta näyttää olevan samankaltainen kuin niillä "colony stimulating factor" -kasvutekijöillä, jotka vaikuttavat muihin myeloidisiin kehityslinjoihin. Ihmisen (h) IL-5 aktivoi myös hyvin tehokkaasti ihmisen eosinofiileja [Lopez ym. J. Exp. Med. 167, 219-224 (1988); Saito ym., Proc. Natl. Acad. Sci USA 85, 2288-2292)].

Interleukiini 5 välittää vaikutuksensa solumembraanilla sijaitsevan reseptorikompleksin välityksellä. Tämä kompleksi on karakterisoitu fysikaalis-kemiallisesti sekä hiiren että ihmisen järjestelmässä. Luuytimeistä on kehitetty ihmisen esi-B-solulinjoja, joiden kasvu on riippuvainen IL5:stä, ja niitä käytetään IL-5:n reseptorianalyysissä [Rolink ym. J. Exp. Med. 169, 1693-1701 (1989)]. Ihmisen IL5-reseptoria voidaan tutkia promyelosyyttisen solulinjan HL60 subkloonissa, joka on indusoitu eosinofiilista erilaistumista kohti [Plaetinck ym. J. Exp. Med. 172, 683-691 (1990)].

Eosinofiilinen erilaistuminen saadaan alkuun natriumbutyraattia käyttäen. Näistä soluista voidaan löytää vain affiniteetiltään korkeita ($K_d=30$ pM) IL5:ttä sitovia kohtia. Kuitenkin ristisidosten muodostumistutkimukset

paljastavat kahden IL5:n sitomiseen osallistuvan polypeptidiketjun läsnäolon, jotka muistuttavat molekyyllipainoiltaan läheisesti hiiren IL5R- α - ja β -ketjuja.

Liukoista ihmisen IL5R α -ketjua (shIL5R α) voitaisiin
 5 käyttää IL-5:n vastavaikuttajana kroonisessa astmassa tai muissa tautitiloissa, joissa on osoitettu eosinosolurunsaus. Lisäksi shIL5R α :aa, tai itse α -ketjua tai kokonaista korkea-affiniteettista reseptoria, joka koostuu α -ketjusta ja β -ketjusta [Tavernier ym., Cell 66, 1175-1184 (1991)],
 10 voitaisiin käyttää työkaluna IL-5:n vastavaikuttajia seuloittaessa.

Tämän keksinnön tavoite on näin ollen tarjota DNA-sekvenssi, joka koodittaa ihmisen interleukiini-5:n reseptorin (hIL5-R) α -ketjua, tai sen osia, erityisesti
 15 shIL5R α :lle, vektori joka sisältää sellaisen DNA-sekvenssin, sellaisella vektorilla transformoidut eukaryoottisolut, rekombinanttiproteiinit joita tämän keksinnön DNA-sekvenssi koodittaa, erityisesti rekombinantti-shIL5R α , missä ne, jotka sisältävät kuvassa 1 esitetyn kaltaisen
 20 aminohapposekvenssin, ovat erityisen edullisia, ja menetelmä sellaisten proteiinien tuottamiseksi, jossa viljellään tämän keksinnön transformoitunutta isäntää soveliaassa elatusaineessa ja eristetään tämän keksinnön rekombinanttiproteiini.

Tämän keksinnön edullisia DNA-sekvenssejä ovat ne, jotka sisältävät sellaisten cDNA-kloonien cDNA-inserttejä, jotka voidaan saada soveliaista cDNA-kirjastoista, esim. kuten esimerkissä 4 kuvataan, hybridisaatioseulonnalla
 25 kuten esim. esimerkissä 5 kuvataan. Edelleen edullisia ovat sellaiset cDNA-insertit, kuten esimerkissä 5 valmistetut, kuten esim cDNA-kloonin " λ gt11-hIL5R α 12" cDNA-insertit. Edelleen tämän keksinnön edullisia DNA-sekvenssejä ovat sellaiset sekvenssit jotka koodittavat shIL5R α :aa, erityisesti sellaiset sekvenssit jotka sisäl-
 30 tävät sellaisen sekvenssin kuin kuvassa 1 esitetään.
 35

Tämän keksinnön DNA-sekvenssin kloonaus voidaan saada aikaan seuraavalla tavalla. Hiiren solulinjoja, jotka sisältävät hiiren IL-5-reseptorin (mIL5R) membraaniin sitoutuneessa muodossa, voidaan viljellä sinänsä tunnetulla tavalla tai kuten erityisesti kuvataan esim. esimerkiksi 2. Sellaiset solut voidaan sitten kerätä sentrifugomalla, hajottaa ja membraaniekstrakti voidaan valmistaa käyttäen soveliaasta pinta-aktiivista ainetta, esim. Triton-X 100:aa. mIL5R:n α -ketjun eristämiseksi sentrifugomalla selvitetty membraaniekstrakti voidaan kuljettaa immunoaffiniteettimatriisiin läpi. Vastaavia vasta-aineita sellaiselle immunomatriisille, nimittäin ne jotka kohdistuvat mIL5R:n α -ketjuun, voidaan valmistaa ja kytkeä soveliaaseen matriisiin sinänsä tunnetulla tavalla, tai kuten erityisesti kuvataan esim. esimerkeissä 1-3. mIL5-R:n α -ketju voidaan lisäksi puhdistaa natriumdodekyyli-sulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) ja blotata soveliaalle matriisille.

Täten puhdistettua hiiren IL-5-reseptoriketjua voidaan karakterisoida peptidikemian menetelmillä, jotka tunnetaan tekniikan tasolla, kuten esimerkiksi N-päähän kohdistuvalla aminohapposekvensoinnilla tai entsyymaattisella samoin kuin kemiallisella peptidin katkaisulla. Entsyymaattisesta tai kemiallisesta katkaisusta saadut fragmentit voidaan erottaa tavanomaisin menetelmin kuten esim. HPLC:llä ja ne voidaan itse alistaa N-päähän kohdistuvalle jatkosekvensoinnille.

Alkamalla näin saadusta aminohapposekvenssitiedosta oligonukleotideja voidaan tuottaa sinänsä tunnetulla tavalla [katso esim. Sambrook ym. s.a.] ottaen huomioon geneettisen koodin degeneroitumisen.

cDNA- tai genomisia DNA-kirjastoja voidaan tuottaa sinänsä tunnetulla tavalla [Sambrook ym. "Molecular Cloning", 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], jossa ovat edullisia cDNA-kirjastot, jotka perus-

tuvat mRNA-valmisteeeseen, joka on peräisin solulinjoista, jotka ekspressoivat indusoituina tai ilman sitä hiiren tai ihmisen IL5R:ää, esim. kuten erityisesti kuvataan esimerkiksi 4. Sellaisia kirjastoja voidaan sitten seuloa oligonukleotideilla [Sambrook ym. s.a.]. Kun sellaisella tavalla on kerran saatu spesifinen kloonin, voidaan eristää se faagi joka sisältää keksinnön halutun DNA-sekvenssin [Sambrook ym. s.a.] ja vastaavia inserttejä voidaan karakterisoida restriktioentsyymejä käyttävällä pilkkoutumiskuvioanalyysillä tai sekvensoinnilla standardimenetelmien mukaisesti (Sambrook ym. s.a.). On ymmärrettävä että myös ne DNA-sekvenssit, jotka hybridisoituvat vaativissa hybridisaatio-olosuhteissa, (katso esim. Sambrook ym. s.a.) tämän keksinnön DNA-sekvensseihin, ja koodittavat proteiineja jotka edelleen sitovat IL5:ttä ja sellaisia proteiineja, ovat itse tämän keksinnön kohteena. Sellaisia DNA-sekvenssejä voidaan valmistaa esim. alalla tunnetuin mutageneesimenetelmin (katso esim. Sambrook ym.) aloittaen vastaavista luonnon DNA-sekvensseistä.

Täten määriteltyjen sekvenssien ja tietyille reseptoreille jo tunnettujen sekvenssien perusteella ne osoittaiset sekvenssit, jotka koodittavat liukoista reseptorin alayksikköä, voidaan määrittää ja leikata irti täydellisestä sekvenssistä sinänsä tunnetulla tavalla [Sambrook ym., s.a., katso myös Maliszewski ja Fanslow, Tibtech., 8, 324-329 (1990)] siinä tapauksessa, että tämän keksinnön kloonin spesifinen cDNA-insertti ei ennestään koodita sellaista shIL5R α :aa kuten kyse on esimerkiksi cDNA-kloonin " λ gt11-hIL5R α 12" tapauksessa.

Täydellinen sekvenssi tai sellaiset osittaiset sekvenssit voidaan sitten liittää sinänsä tunnetulla tavalla vektoreihin, jotka on kuvattu tekniikan tasolla sen perusteella että ne monistuvat ja/tai ekspressoituvat prokaryooteissa [Sambrook ym., s.a.]. Sovelaita prokaryootisia isäntäorganismeja ovat esimerkiksi gram-negatiiviset

ja gram-positiiviset bakteerit kuten esimerkiksi E. coli -
kannat kuten E. coli HB 101 [ATCC nro 33 694] tai E. coli
W3110 [ATCC nro 27 325] ja E. coli MC1061 [Casadaban ja
Cohen, J. Mol. Biol. 138, 179-207 (1980)], joista kaksi
5 jälkimmäistä sisältävät ennestään plasmidin "p3" (Sambrook
ym. s.a.) siinä tapauksessa, että monistetaan pCDM8-tyyp-
pisiä vektoreita kuten μ VX tai pshIL5R α (katso esimerk-
ki 9), tai B. subtilis -kannat.

Lisäksi keksinnön mukaisesti nukleiinihapposek-
venssejä voidaan liittää sinänsä tunnetulla tavalla sopi-
viin vektoreihin eukaryoottisissa isäntäsoluissa tapahtu-
vaa ekspressiota varten, kuten esimerkiksi hiivassa, hyön-
teissoluissa ja nisäkässoluissa. Sellaiset vektorit kuten
yllä on mainittu ovat myös tämän keksinnön kohteena.

15 Tyypillinen ekspressiovektori nisäkässoluja varten
sisältää tehokkaan promoottorielementin jotta saataisiin
aikaan hyvä transkriptiotaso, ekspressoitavan DNA-sek-
venssin ja signaalit transkriptiotuotteen tehokasta lope-
tusta ja polyadenylaatiota varten. Lisäelementtejä, joita
20 voidaan käyttää, ovat "tehostajat", jotka johtavat edel-
leen tehostuneeseen transkriptioon ja sekvensseihin jotka
voivat esim. pidentää mRNA:n puoliintumisaikaa. Jotta saa-
taisiin ekspressoitua nukleiinihapposekvenssejä joista
puuttuu signaalipeptidiä koodittava endogeeninen sekvens-
25 sifragmentti, voidaan käyttää vektoreita jotka sisältävät
sellaisia soveliaita sekvenssejä jotka koodittavat muiden
tunnettujen proteiinien signaalipeptidejä. Katso esimer-
kiksi vektori pLJ268, jonka on kuvannut Cullen, B.R. (Cell
46, 973-982 (1986)) samoin kuin Sharma, S. ym. teoksessa
30 "Current Communications in Molecular Biology" toim.
Gething M.J. Cold Spring Harbor Lab. (1985), sivut 73-78.

Useimmat näistä vektoreista, joita käytetään tietyn
DNA-sekvenssin lyhytaikaiseen ekspressioon nisäkässoluis-
sa, sisältävät SV40-viruksen replikaation aloituskohdan.
35 Soluissa, jotka ekspressoivat viruksen T-antigeenia (esim.

COS-soluissa), näitä vektoreita tuotetaan runsaasti. Lyhytaikainen ekspressio, esim. esimerkissä 10 kuvatun kaltainen, ei kuitenkaan rajoitu COS-soluihin. Periaatteessa mitä tahansa transfektoitavissa olevaa nisäkässolulinjaa voidaan käyttää tähän tarkoitukseen. Signaaleja, jotka 5 voivat saada aikaan voimakkaan transkription, ovat esim. SV40:n varhaiset ja myöhäiset promoottorit, HCMV:n (ihmisen sytomegaloviruksen) "aivan varhaisen päägeenin" ("major immediate-early" gene) promoottori ja tehostaja, retrovirusten kuten RSV:n, HIV:n ja MMTV:n LTR:t ("pitkät toistopäät"). Voidaan käyttää kuitenkin myös solugeenien signaaleja kuten esim. aktiini- ja kollagenaasigeenien 10 promoottoreita.

Vaihtoehtoisesti voidaan myös hankkia pysyviä solulinjoja, joissa spesifinen DNA-sekvenssi on integroitunut 15 genomiin (kromosomiin). Tätä varten DNA-sekvenssi kotransfektoidaan yhdessä merkkiominaisuuden kanssa, esim. neomysiinin, hygromysiinin, dihydrofolaatireduktaasin (dhfr) tai hypoksantiiniguaaniinifosforibosyyli transferaasin (hgpt) kanssa. DNA-sekvenssiä, joka on stabiilisti mennyt 20 sisään kromosomiin, voidaan myös monistaa runsaasti. Sovelias merkkiominaisuus tätä varten on esimerkiksi dihydrofolaatireduktaasi (dhfr). Nisäkässoluja (esim. CHO-soluja), jotka eivät sisällä koskematonta dhfr-geeniä, inkuboidaan tässä lisääntyvien metotreksoittimäärien kanssa 25 sen jälkeen kun transfektio on saatu aikaan. Tällä tavalla voidaan saada aikaan solulinjoja, jotka sisältävät enemmän kuin tuhat kopiota halutusta DNA-sekvenssistä.

Nisäkässoluja, joita voidaan käyttää ekspressioon, 30 ovat esim. ihmissolulinjojen HeLa [ATCC CCL2] ja 293 [ATCC CRL 1573] solut, samoin kuin 3T3- [ATCC CCL 163] ja L-solut, esim. [ATCC CCL 149], (CHO)-solut [ATCC CCL 61], BHK-solut [ATCC CCL 10] samoin kuin CV 1- [ATCC CCL 70] ja COS-solulinjat [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

Soveliaisiiin ekspressiovektoreihin kuuluvat esimerkiksi vektorit kuten pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 146], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Ruotsi], pRSVcat [ATCC 37 152], pMSG [Pharmacia, Uppsala, Ruotsi] ja pCDM8-tyypin plasmidit kuten esim. pshIL5R α [katso esimerkki 7], joka on sijoitettu E.coli MC1061-kantaan (joka sisältää plasmidin p3) transformoituna Budapestin sopimuksen ehtojen mukaisesti patenttitarkoituksia varten Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) -talletuslaitokseen Braunschweigiin, Saksan liittotasavalta, 17. huhtikuuta 1991 luettelonumerolla DSM 6479. Plasmidi pshIL5R α voidaan eristää talletetusta transformoidusta E. colista sinänsä tunnetulla tavalla ja kuten on kuvattu esim. yksityiskohtaisesti esimerkissä 9. Prokaryoottiset isäntäsolut, jotka on transformoitu sellaisilla plasmideilla, jotka sisältävät tämän keksinnön DNA-sekvenssin, erityisesti transformoidut E. coli -solut, ovat myös tämän keksinnön kohteena samoin kuin sellaiset plasmidit, joita käytetään niiden transformoimiseen.

Tapa, jolla nämä solut transfektoidaan, riippuu valitusta ekspressiosysteemistä ja vektorisysteemistä. Katsaus näihin menetelmiin voidaan löytää Pollardin ym. artikkelista "DNA Transformation of Mammalian Cells" teoksessa "Methods in Molecular Biology" [Nucleic Acids Vol. 2, 1984, Walker. J.M. toim., Humana, Clifton, New Jersey]. Lisää menetelmiä voidaan löytää Chenin ja Okayaman artikkelista ["High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology 7, 2745-2752, 1987] ja Felgnerin artikkelista [Felgner ym. "Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1989]. Eukaryoottiset isäntäsolut, jotka on transfektoitu soveliaalla keksinnön plasmidilla (vektorilla), erityisesti nisäkäsisäntäsolut, joista erityisen edullisia ovat COS-solut, samoin kuin plasmidit joita käytetään nii-

den transfektioon ja vastaavan rekombinanttiproteiinin ekspressioon, ovat myös tämän keksinnön kohteena.

Bakulovirusekspressiojärjestelmää, jota on jo käytetty menestyksekkäästi monien proteiinien ekspressioon (katsauksena katso Luckow ja Summers, Bio/Technology 6, 47-55, 1988), voidaan käyttää ekspressioon hyönteissoluis-
 5 sa. Rekombinanttiproteiineja voidaan tuottaa autenttisessa muodossa tai fuusioproteiineina. Täten tuotettuja proteiineja voidaan myös muokata, kuten esimerkiksi glykosyloida (Smith ym. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 8404-8408, 1987).
 10 Niin sanottua "siirtovektoria" käytetään tuottamaan rekombinanttibakulovirus, joka ekspressoii haluttua proteiinia. Tämän alla on ymmärrettävä plasmidi, joka sisältää heterologisen DNA-sekvenssin vahvan promoottorin kontrolloimana, esim. polyhedronigeenin, missä virussekvenssit ympäröivät
 15 tätä molemmin puolin. Siirtovektori transfektoidaan sitten hyönteissoluihin yhdessä villityypin bakuloviruksen DNA:n kanssa. Rekombinanttivirukset, jotka syntyvät soluihin homologisen rekombinaation tuloksena, voidaan sitten tunnistaa ja eristää sinänsä tunnetulla tavalla. Katsaus
 20 bakulovirusekspressiojärjestelmään ja siinä käytettyihin menetelmiin voidaan löytää Luckowin ja Summersin teoksesta "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental
 25 Station, Texas A & M University, Bulletin nro 1555, 2. painos, 1988.

Ekspressoitu IL-5-reseptoriketju tai sen fragmentit voidaan sitten puhdistaa solumassasta tai viljelmän supernatanteista sinänsä tunnetuilla proteiinikemian menetel-
 30 millä, kuten esimerkiksi esim. ammoniumsulfaattisaostuksella, dialyysillä, ultrasuodatuksella, geelisuodatuksella, ioninvaihtokromatografialla, SDS-PAGE:lla, isoelektrisellä fokuoinnilla, affiniteettikromatografialla kuten immunoaffiniteettikromatografialla, HPLC:llä tai vastaa-
 35 valla.

Lisäksi tämän keksinnön mukaista IL-5-reseptoriketjua tai sen fragmentteja voidaan käyttää IL-5:n agonistien tai antagonistien havaitsemiseen sinänsä tunnetulla tavalla.

5 Tämän keksinnön IL-5-reseptoriketjua tai sen fragmentteja, samoin kuin niiden fysiologisesti soveliaita suoloja, jotka voidaan valmistaa sinänsä tunnetuilla tavoilla, voidaan myös käyttää sairauksien hoitoon, joihin kulkuun IL-5 vaikuttaa, ja/tai vastaavien farmaseuttisten valmisteiden tuotantoon. Tätä tarkoitusta varten yhtä tai useampaa mainittua yhdistettä, haluttaessa tai tarvittaessa yhdistelmänä muiden farmakologisesti vaikuttavien aineiden kanssa, voidaan valmistaa sinänsä tunnetulla tavalla tavanomaisesti käytettyjen kiinteiden tai nestemäisten kantajamateriaalien kanssa. Sellaisten valmisteiden annostus voidaan toteuttaa sen mukaan, mitkä ovat tavanomaisia kriteerejä analogisesti jo käytettävien valmisteiden kanssa, joilla on vastaava aktiivisuus ja rakenne. Sellaiset farmaseuttiset valmisteet ja tämän keksinnön yhdisteiden käyttö terapeuttisiin tarkoituksiin ovat myös tämän keksinnön kohteena.

Sen jälkeen kun täten edellä on kuvattu keksintö yleisesti, seuraavat kuvat ja esimerkit on tarkoitettu havainnollistamaan keksinnön yksityiskohtia, rajoittamatta sitä täten millään tavoin.

Kuva 1

shIL5R α :n nukleiinihapposekvenssi, ja siitä johdettu aminohapposekvenssi, jossa mIL5R α :n vastaava aminohapposekvenssi esitetään alla näyttämällä vain sellaiset aminohapot, jotka eroavat ihmissekvenssin aminohapoista. Sekvenssit esitetään käyttäen standardilyhenteitä nukleotideille ja aminohapoille.

Kuva 2

Kuva 2 luonnehtii shIL5R α :aa. Kaikki yksityiskohdat annetaan esimerkissä 11.

Kuva 3

Kuva 3 esittää hIL5R α :n DNA-sekvenssin ja siitä johdetun aminohapposekvenssin, jossa mIL5R α :n vastaava aminohapposekvenssi esitetään alla näyttämällä vain sellaiset aminohapot, jotka eroavat ihmissekvenssin aminohapoista. Sekvenssit esitetään standardinomaisin lyhen-

Esimerkki 1

Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotto hiiren IL5R:tä vastaan

Immunisaatio suoritettiin perusteiltaan A. Rolinkin ym. (s.a.) kuvaamalla tavalla. Lyhyesti: päivänä 0 2×10^7 B13-solua [Rolink ym. s.a.] pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS-A), sekoitettiin täydellisen Freundin adjuvantin (CFA) kanssa ja ruiskutettiin Wistarrottien takajalan anturaan. Tämä toistettiin ilman Freundin adjuvanttia (FA) päivinä 5 ja 7. Päivänä 8 paikalliset imusolmukkeet poistettiin ja valmistettiin solususpensio. Nämä solut fuusioitiin PEG 1500:aa (Boehringer) käyttäen Sp2/0-Ag14-solujen kanssa [ATCC CRL 1581] suhteessa 5:1,5. Solut maljattiin mikrotiitterilevyille rekombinantti-hIL6:n läsnäollessa (500 pg/ml) [Haegeman ym. Europ. J. Biochem. 159, 625-632 (1986)]. Seuraavana päivänä sama määrä elatusainetta, joka sisälsi $2 \times$ konsentraation aminopteriinia, lisättiin hybridisolujen selektoimiseksi. Soluille annettiin päivänä 8 uutta elatusainetta ilman aminopteriinia. Hybridoomat selektoitiin niiden supernatantin kyvyn perusteella inhiboida mIL5:ttä [Tavernier, J. ym. DNA 8, 491-501 (1989)] tai hiiren interleukiini 3:n (mIL3) aikaansaamaa B13-solujen lisääntymistä (mitattiin ^3H -deoksisytidiini-inkorporaatiomäärityksellä sinänsä tunnetulla tavalla). mIL3:n lähteenä käytettiin muokattua elatusainetta WEHI-3-soluista (ATCC nro TIB68). Supernatantit, jotka osoittivat inhiboivaa vaikutusta, testattiin uudelleen kompetitiivisessä sitomismäärityksessä

[sinänsä tunnetulla tavalla] radioleimatus mIL5:n tai "R52:n" kanssa [monoklonaalinen vasta-aine, joka tunnistaa vain IL-5-R:n β -ketjun (Rolink ym. s.a.)] B13-soluilla. Monoklonaaliset vasta-aineet, jotka olivat suuntautuneet vain m-IL-5-R:n α -ketjua vastaan, tunnistettiin niiden kyvyn perusteella estää lähes täysin mIL5:n sitoutuminen ja vastaavan mIL-5-R-ketjun immunopresipitaatiolla. Valitut hybridoomat kloonattiin uudestaan laimennussarja-

5

menetelmällä.

Esimerkki 2

mIL5R- β -ketjun immunoaffiniteettipuhdistus

B13-soluja kasvatettiin suurissa spinneripulloissa Iscoven muokatussa Dulbeccon elatusaineessa (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y., USA), joka sisälsi 5 % fetaalivasikan seerumia, 2 mM L-glutamiinin, 50 μ g/ml gentamysiiniä ja 100 yksikköä/ml rekombinantista hiiren IL-5:ttä, tiheyteen 2×10^6 solua/ml. Solut konsentroitiin 10 l viljelmistä sentrifugoimalla, pestiin PBS:llä ja hajoitettiin 200 ml:lla PBS:ta, joka sisälsi 1 % Triton-X-100:aa ja proteaasi-inhibiittoriseoksen (1 mM PMSF, 10 mM bentsamidiini-HCl, 100 U/ml aprotiniinia). 10 minuutin jäässäpidon jälkeen lysaattia sentrifugoitiin 10 min 1000 g:ssä ja se kirkastettiin ultrasentrifugaatiolla (100 000 g) 90 minuutin ajan 4°C:ssa. Supernatantti laimennettiin NaCl:lla lopulliseen konsentraatioon 0,5 M ja sitä käytettiin puhdistukseen. "R52" sidottiin kovalenttisesti proteiini G-Sepharose 4 Fast Flow:iin (Pharmacia, LKB Biotechnology AB, Uppsala, Ruotsi) Schneiderin ym. mukaan [J. Biol. Chem. 257, 10766 (1982)] konsentraatiossa 5 mg/ml geeliä. Kaksisataa ml B13-solulysaattia pantiin 4 °C:een lämpötilassa 2 ml proteiini G-Sepharose 4 Fast Flow:in läpi, jota seurasi 2 ml R52-kytketty proteiini G-Sepharose 4 Fast Flow:ia, molemmat pakattuna halkaisijaltaan 1 cm pylvääseen. Pidättymätön fraktio ladattiin sitten molempiin pylväisiin. Geeliä pestiin perusteellisesti (100 ml)

10

puskurilla, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl (pH 8,2), 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 0,5 % NP40, jota seurasi 10 ml 0,1 % NP40. Seuraavaksi jäljelle jääneet proteiinit eluoitiin 4 ml:ssa 50 mM dietyyliamiinia (pH 11), joka sisälsi 0,1 %
 5 Nodinet P40:ia (NP40), neutraloitiin lisäämällä 1 M NaH₂PO₄ ja konsentroitiin lyofilisoimalla. Puhtaus arvioitiin ajamalla 2,5 % eluaatista SDS-PAGE -geeliin ja värjäämällä se Coomasssiella.

Esimerkki 3

10 **Hiiren IL5R:n α -ketjun immunoaffiniteettipuhdistus**
 B13-solulysaatit 2×10^{10} solusta (ajettu "R52"-immunoaffiniteettipylvään fraktioiden läpi, joita käytettiin puhdistamaan β -ketjupari esimerkin 2 mukaisesti) sekoitettiin yli yön 4 °C:een lämpötilassa "hydrazide avidgel
 15 AX:n" (2 ml) (Bioprobe Int., Inc.) kanssa, joka oli varustettu 10 mg:lla monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistivat mIL5R α -ketjun. Geeli kaadettiin sitten pylväeseen ja perusteellisen pesun jälkeen (50 mM Tris-HCl, pH 8,2, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 0,5 % NP40; jota seurasi 0,1 %
 20 NP40 H₂O:ssa) suoritettiin eluutio käyttäen 50 mM dietyyliamiinia, pH 11, 0,01 % NP40. Valikoidut fraktiot lyofilisoitiin välittömästi ja resuspendoitiin $2 \times$ Laemmli-puskuuriin, β -merkaptotoetanolin läsnäollessa. Näytteet ajettiin 1,5 mm 10 % PAGE-SDS-geelin läpi. Geeli fiksoitiin 10 %
 25 HAc-30 % metanolilla ja värjättiin Coomassie Brilliant Blue:lla. Palat, jotka sisälsivät 60 kDa mIL5R α -ketjun, käsiteltiin SDS-puskurilla, leikattiin uudelleen ja ajettiin elektroforeesilla uudessa PAGE-SDS-geelissä.

Sen jälkeen kun se oli siirretty Immobilon-P-membraanille (Millipore Corp.) ja värjätty amido black -väriaineella, 60 kDa juova irrotettiin ja digestoitiin in situ trypsiinillä. Peptidit erotettiin C4-käänteisfaasipylväällä ja alistettiin sekvenssianalyysiin käyttäen 470A-tyypistä kaasufaasisekvenaattoria, johon oli kytketty suoraan
 35 120A-tyypin PTH-aminohappoanalysaattori (Applied Biosys-

tems Inc., Foster City, CA). Aminohapposekvenssit (amino-
happojen standardilyhenteet) ja vastaavien oligonukleoti-
dikoetinsarjojen sekvenssit, jotka syntetoitiin sinänsä
tunnetulla tavalla, esitetään alla:

5

peptidi 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

W G E W S Q P I Y V G K

10

oligonukleotidisarja 1: 32-meerejä

T

5' CC IAC GTA AAT IGG CTG IGA CCA CTC ICC CCA 3'

A G

T

T

15

T

5' CC IAC GTA AAT IGG CTG ACT CCA CTC ICC CCA 3'

A G

T

G

T

peptidi 2

20

1 2 3 4 5 6 7 8

H V D L E Y H V

25

oligonukleotidisarja 2: 23-meerejä

5' AC ATG ATA TTC TAA ATC IAC ATG 3'

G

G

C

C

G

G

30

5' AC ATG ATA TTC IAG ATC IAC ATG 3'

G

G

C

G

G

Esimerkki 4

Yksisuuntaisten λ gt11-cDNA-kirjastojen muodostaminen

1. Hiiren esi-B-solu B13 -cDNA-kirjasto

5 mRNA eristettiin B13-soluista käyttäen "fast-track" mRNA:n eristysjärjestelmää (Invitrogen Corp.). Tätä menetelmää käyttäen poly(A)⁺ mRNA eristettiin suoraan solulysaateista käyttäen oligo(dT)selluloosaa; saannot olivat noin 50 µg per 10⁶ solua. 5 mg poly(A)⁺ mRNA käänteiskopioitiin käyttäen oligo dT-Not I alukeadaptorin (5'-AATTCGCGGCCGC(T)₁₅-3', Promega Corp.) ja kloonattua Moloney Murine Leukemia Virus RNaseH⁻ Reverse Transcriptase -entsyymiä (BRL Life Technologies, Inc.). EcoRI-linkkerillä varustettua kaksijuosteista cDNA:ta tehtiin kuvattuja menetelmiä käyttäen (Sambrook ym. s.a.). NotI-katkaisua käytettiin jotta saataisiin aikaan ainutkertainen 3'-yksi-

10 juosteinen pää, ja cDNA:t valittiin koon perusteella (>1 000 emäsparia) 1 % agarosigeelissä. Sen jälkeen kun oli tehty eluutio "Gene clean" -menetelmää (BIO 101 Inc.) käyttäen, cDNA:t ligoitiin EcoRI-NotI gt11 Sfi-Not -vektorin käsivarsiin (Promega Corp.). In vitro -pakkauksen jälkeen saatiin noin 40 x 10⁶ rekombinanttifaagia.

2. Ihmisen HL60-kloonin (butyraatti-indusoidun) cDNA-kirjasto

25 Ennen kuin mRNA puhdistettiin, butyraatilla indusoidut HL60-klooni 15 -solut [Fischkoff, Leukemia Res. 12, 679-686 (1988); Plaetinck ym. J. Exp. Med. 172, 683-691 (1990); HL60: ATCC-Nro CCL 240] tarkastettiin asianmukaista ¹²⁵I-hIL5:n sitomista silmälläpitäen (noin 2000 sitomiskohtaa per solu). Käytettiin samoja menetelmiä kuin 4.1:lle ja saatiin vertailukelpoinen saalis rekombinanttifaageja.

30

Esimerkki 5

Hiiren ja ihmisen cDNA-kirjastojen seulonta

2 sarjaa oligonukleotidikoettimia "Oligonukleotidi 1" ja "Oligonukleotidi 2", katso esimerkki 3, käytettiin seulontaan erilaisten hybridisaatio-olosuhteiden valitessa (katso alla), riippuen käytetystä koettimesta, joita käytettiin sinänsä tunnetulla tavalla (Sambrook ym. s.a.). Tulokset esitetään alla olevassa järjestelyssä:

1. 2 cDNA-kloonin (λ gt11-mIL5Ra2,3) valittiin osasta hiiren cDNA-kirjastoa ($1,2 \times 10^6$ plakkia seulottiin) hybridisaation perusteella molemmilla oligonukleotidikoettimijoukoilla. Tätä tarkoitusta varten valmistettiin nitroselluloosakopiot kuvatulla tavalla käyttäen Biodyne A -siirtomembraaneja (Pall), (Sambrook ym. s.a.). Oligonukleotidi 1 leimattiin radioaktiivisesti kinasoimalla (Sambrook ym. s.a.), ja hybridisoitiin "vaativuudeltaan keskiluokan" hybridisaatio-olosuhteissa (katso alla). Oligonukleotidi 2 leimattiin radioaktiivisesti kinasoimalla (Sambrook ym. s.a.), ja hybridisoitiin "vähemmän vaativissa" hybridisaatio-olosuhteissa (katso alla).

2. 1 cDNA-kloonin (λ gt11-hIL5Ra8) valittiin osasta ihmisen cDNA-kirjastoa ($2,4 \times 10^6$ plakkia seulottiin) hybridisaation perusteella sekä "oligonukleotidilla 1" että cDNA-insertillä, joka oli johdettu sinänsä tunnetulla tavalla hiiren λ gt11mIL5Ra2:sta.

Oligonukleotidi 1 leimattiin radioaktiivisesti kinasoimalla (Sambrook ym. s.a.), ja hybridisoitiin "vähemmän vaativissa" hybridisaatio-olosuhteissa. cDNA-insertti gt11mIL5Ra2:sta leimattiin radioaktiivisesti satunnaisalukkeita käyttävällä leimauksella (Sambrook ym. s.a.) ja hybridisoitiin "vaativuudeltaan keskiluokan" hybridisaatio-olosuhteissa.

3. 5 muuta cDNA-kloonin (λ gt11-hIL5Ra11->15) valittiin 2:ssa seulotusta ihmisen cDNA-kirjaston puolikkaasta

käyttäen mIL5Ra2-cDNA-koetinta. Hybridisaatio tapahtui "vaativuudeltaan keskiluokan" olosuhteissa.

4. 35 muuta cDNA-kloonin (λ gt11-hIL5Ra16->51) valittiin 2:ssa seulotusta ihmisen cDNA-kirjaston toisesta puolikkaasta käyttäen hIL5Ra8-cDNA-koetinta. Hybridisaatio tapahtui "vaativissa" olosuhteissa (katso alla).

Hybridisaatio-olosuhteet

L) "Vähemmän vaativat" hybridisaatio-olosuhteet:

- esihybridisaatio: 5 x SSC (alalla tunnettu sitraattipuskuroitu suolaliuos, katso esim. Sambrook ym. s.a.), 5 x Denhardtin liuos, 0,1 % SDS, 0,05 % natriumpyrofosfaatti, 100 µg/ml sonikoitua lohen sperman DNA:ta; yli yön 42°C:een lämpötilassa.
- hybridisaatio: prehybridisaatiopuskuri korvattiin samalla puskurilla, mutta mukaan pantiin radioaktiivisesti leimattu koetin.
- pesut: 4 peräkkäistä pesua (noin 30 minuuttia kukin) 2 x SSC:llä, 0,1 % SDS:llä 37°C:een lämpötilassa;

I) "Vaativuudeltaan keskiluokan" hybridisaatio-olosuhteet:

- esihybridisaatio: 20 % formamidi, 5 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 5 mM EDTA, 25 mM natriumfosfaatti (pH 6,5), 0,05 % natriumpyrofosfaatti, 100 µg/ml sonikoitua lohen sperman DNA:ta; yli yön 42°C:een lämpötilassa.
- hybridisaatio: prehybridisaatiopuskuri korvattiin samalla puskurilla, mutta mukaan pantiin radioaktiivisesti leimattu koetin.
- pesut: 4 peräkkäistä pesua (noin 30 minuuttia kukin) 2 x SSC:llä, 0,1 % SDS:llä 37°C:een lämpötilassa.

H) "Vaativat" hybridisaatio-olosuhteet:

- esihybridisaatio: 6 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 0,5 % SDS, 100 µg.ml⁻¹ sonikoitua lohen sperman DNA:ta, yli yön 68°C:een lämpötilassa.

- hybridisaatio: 6 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 0,5 % SDS, 5 mM EDTA, 100 µg.ml⁻¹ sonikoitua lohen sperman DNA:ta, mukaanlukien radioaktiivisesti leimattu koetin.

- pesut: suoritettiin seuraavat peräkkäiset pesut (noin 30 min kukin):

- 2 x SSC, 0,1 % SDS huoneenlämmössä (kahdesti)

- 0,1 x SSC, 0,1 % SDS 68°C:een lämpötilassa (kahdesti).

Esimerkki 6

Sekvensointi

10 Kaikki cDNA:t subkloonattiin pGEM7zf-tyypin vektoreihin (Promega Corp.) ja on saatu aikaan ExoIII-deleetiomutantteja. Sekvensointi suoritettiin automaattisella 370A-DNA-sekvenaattorilla käyttäen menetelmää, joka perustuu Sangerin menetelmään ja jossa on mukana Taq-polymeraasi ja yksijuosteinen DNA.

Esimerkki 7

Plasmidin "pshIL5Ra" muodostaminen

Plasmidien muodostamiset suoritettiin kuten seuraavissa kappaleissa kuvataan. Mikäli mitään erityisiä viitteitä tai valmistuksen yksityiskohtia ei anneta, käytettiin standardinomaisia menetelmiä teoksen Sambrook ym. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2. painos). Cold Spring Harbor. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, mukaisesti.

25 Insertti faagista gtl1-hIL5Ra12 (katso esimerkki 5) irrotettiin käyttäen EcoRI- ja NotI-restriktioentsyymejä. Molemmat yksijuosteiset päät täytettiin käyttäen E. coli DNA-polymeraasin I Klenow-fragmenttia kaikkien neljän deoksinukleotiditrifosfaatin läsnäollessa, ja ei-palindromiset BstXI-linkkerit lisättiin T4-DNA-ligaasia käyttäen. Näiden linkkereiden sekvenssi on seuraava:

5'CTTTAGAGCACAA3'

3'GAAATCTC5'.

35 Seuraavassa vaiheessa muokattu insertti ligoitiin plasmidiin pCDM8 [Seed ja Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84 3365 (1987); Aruffo ja Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8573 (1987); Seed, Nature, 329, 840 (1987)] ja jatkoanalyysiin valittiin konstruktio joka oli orientaatioltaan sopiva CMV-promoottoriin nähden.

5 **Esimerkki 8**

E. coli PC1061(p3) -kannan transformaatio

E. coli PC1061(p3) -kannan transformaatio plasmidilla pshIL5Rα esimerkistä 7 saatiin aikaan elektroporaatiomenetelmällä. Bio-Rad-yhtiön (Richmond, CA, USA) Gene Pulser-konetta käytettiin seuraavilla asetuksilla: 10 25 µF, 2,5 kV ja 200 Ohmia valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Esimerkki 9

Plasmidi-DNA:n eristys

15 Transformoidusta E. coli MC1061 -kannasta, kuten esimerkissä 8 kuvataan, valmistettiin plasmidi-DNA:ta käyttäen standardimenetelmää [Birnboim ja Doly, Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979); Sambrook ym. 1989, s.a.], joka perustuu solujen alkalilyyysiin, jonka jälkeen seurasi kesiumkloridi-ultrasentrifugaatiovaihe. Tällä tavalla 20 plasmidi pshIL5Rα erotettiin plasmidista p3. shIL5Rα:aa koodittava insertti leikattiin irti pshIL5Rα:sta ja sekvensointiin esimerkissä 6 kuvatulla tavalla. Täydellinen nukleinihapposekvenssi ja siitä johdettu shIL5Rα:n aminohapposekvenssi esitetään kuvassa 1. 25

Esimerkki 10

shIL5Rα:n ekspressio COS-1 -soluissa

COS-1 -solut transfektoitiin käyttäen DEAE-dekstraani-menetelmää teoksessa Sambrook ym. 1989, s.a. kuvatulla tavalla. Lyhyesti: subkonfluentit COS-1 -solut 30 kerättiin trypsinoimalla ja maljattiin uudelleen tiheyteen $2,3 \times 10^4$ solua/cm² 24 tuntia ennen transfektiota. Yksikerroksiset viljelmät pestiin kahdesti minimielatusaine (MEM)-HEPES pH 7,2 -liuoksella ja inkuboitiin 30 minuuttia 35 transfektioseoksella [10 µg esimerkissä 9 kuvatulla taval-

la eristettyä pshIL5R α -plasmidia/0,5 mg DEAE-dekstraania ($M_r=2 \times 10^6$; Pharmacia, Uppsala, Ruotsi)/ml MEM-HEPES, pH 7.2]. Seuraavaksi soluille annettiin 8 tilavuutta esilämmitettyä Dulbeccon muokattua Eaglen elatusainetta (DMEM), joka sisälsi 10 % fetaalivasikan seerumia (FCS) ja 100 μ M klorokiinidifosfaattia, ja inkuboitiin 4 tunnin ajan 37°C:een lämpötilassa. Sen jälkeen elatusaine poistettiin imemällä ja yksikerroksiset viljelmät pestiin kerran DMEM-elatusaineella ja inkuboitiin 3 päivää DMEM+10 % FCS -elatusaineessa.

Esimerkki 11

shIL5R α :n karakterisointi

Supernatantti, joka oli peräisin COS-1 -soluista, jotka oli transfektoitu plasmidilla pshIL5R α , joka oli valmistettu esimerkissä 10 kuvatulla tavalla, testattiin eritetyn shIL5R α :n olemassaoloa silmälläpitäen kompetitiivisellä sitoutumisanalyysillä seuraavasti: COS-1 -solut, jotka oli transfektoitu esimerkissä 10 kuvatulla tavalla plasmidilla, joka sisälsi cDNA:n joka koodittaa mIL5R α :ta (katso esimerkistä 1 aminohapposekvenssi), joka oli saatu kloonista esimerkissä 5 kuvatulla tavalla, ja muodostettu esimerkissä 7 kuvatulla tavalla, irrotettiin käsittelemällä fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS), joka sisälsi 0,5 mM EDTA ja 0,02 % natriumatsidia, 30 minuutin ajan 37°C:een lämpötilassa, resuspendoitiin tiheyteen $1,5 \times 10^5$ solua per 0,3 ml sitomisliuosta (DMEM + 10 % FCS + 0,02 % natriumatsidia) ja inkuboitiin 0,8 nM 125 I-mIL5 4°C:een lämpötilassa 1 tunnin ajan 100-kertaisen leimaamattoman mIL5:n ylimäärän ollessa poissa (kuva 2; "-", totaalisitoutuminen) tai mukana (kuva 2; "+kylmä", epäspesifinen sitoutuminen). pshIL5R α :lla (kuva 2, "shIL5R α ") transfektoitujen COS-1 -solujen supernatantti (80 % sitomisliuosta) testattiin silmälläpitäen sen kykyä inhiboida 125 I-mIL5:n sitoutuminen. Sitoutuminen suoritettiin myös ei-transfektoitujen COS-1 -solujen (kuva 2, "kontrolli")

80 % supernatantin ollessa läsnä. Jotta erotettaisiin solumembraaniin sitoutunut 125 I-mIL5 vapaasta radioaktiivisuudesta, COS-1 -solut sedimentoitiin ftalaattiöljytyynyn läpi ja yksilölliset pelletit laskettiin gammalaskurilla
 5 kuten on kuvattu [Plaetinck ym. J. Exp. Med. 172, 683-691 (1990)].

Esimerkki 12

Plasmidin "phIL5R α " muodostaminen

hIL5R α :ta koodittavat cDNA:t eristettiin 3'-jat-
 10 kamis-polymeraasiketjureaktio (PCR) -strategialla [Fritz ym. Nucl. Acid Res. 19, 3747 (1991)]. Koska shIL5R α :ta koodittava mRNA on vain noin 1350 emästä pitkä, cDNA:ista peräisin olevat PCR-tuotteet, jotka koodittavat hIL5R α :ta, voitiin valikoida koon perusteella. Ensimmäisessä vaiheessa
 15 cDNA:t syntetisoitiin käyttämällä alukkeena satunnaista heksameeria, jonka 5'-päähän oli kiinnitetty tunnettu 27 emäksen jakso. Sitten etusuunnan alukkeen, joka oli komplementaarinen shIL5R α -sekvenssille (katso kuva 1) kohdassa 1036-1055, ja käänteisalukkeen joka oli komplementaarinen
 20 satunnaisheksameerin loppupään sekvenssille, välillä suoritettiin PCR-reaktio. Vaikkakin useimmat reaktiotuotteet olivat epäspesifisiä, Southernin blottausanalyysi paljasti IL5R α -sekvenssejä vain silloin kun käytettiin butyraatti-indusoidusta HL60-kloonista 15 peräisin olevaa mRNA:ta.
 25 350 emäsparia suuremmat DNA-fragmentit puhdistettiin ja sen jälkeen kun oli pilkottu NsiI- ja SalI-restriktioentsyymeillä, ne subkloonattiin pUC18-vektoriin (Pharmacia, Freiburg, BRD). hIL5R α :ta koodittavat subkloonit valikoitiin sitten pesäkehybridisaatiovaiheella. Näin teke-
 30 mällä selektoitiin niitä DNA:ita vastaan, jotka vastasivat shIL5R α :ta. DNA-sekvenssianalyysi paljasti tämän jälkeen, että subkloonit, joissa oli 350 emäsparia suuremmat insertit, koodittivat todellakin hIL5R α :ta. Seuraavaksi saatiin aikaan kokopitkä hIL5R α -cDNA irrottamalla insertti NsiI-
 35 XbaI -entsyymeillä (tasaiset päät) ja insertoimalla NsiI-

NotI (tasaiset päät) -kohdista avattuun pshIL5Ra-vektoriin (katso esimerkki 7). hIL5Ra:n täydellinen DNA-sekvenssi ja siitä johdettu aminohapposekvenssi annetaan kuvassa 3. DNA-sekvenssin piirteenä on vaihdos shIL5Ra:n DNA-sekvenssin kohdassa 1243, mikä johtaa 3'-pään osan korvautumiseen uudella sekvenssillä, joka sisältää solukalvon läpäisevän osan. Sytoplasminen osa on 58 aminohappoa pitkä. Tässä lyhyessä sytoplasmisessa hännässä ei voida löytää osaa, joka olisi osallisena signaalin välitysprosesseissa.

Patenttivaatimukset:

5 1. Menetelmä, jolla valmistetaan ihmisen interleukiini 5 -reseptorin α -ketju tai sen osia, jotka osat edelleen sitovat ihmisen interleukiini 5:ttä, joka menetelmä on t u n n e t t u siitä, että viljellään isäntäsolua, joka on transformoitu ekspressiovektorilla joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa ihmisen interleukiini 5-
10 reseptorin α -ketjua tai sen osia, jotka osat edelleen sitovat ihmisen interleukiini 5:ttä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-sekvenssi koodittaa ihmisen interleukiini 5 -reseptorin liukoista osaa, joka
15 liukoinen osa edelleen sitoo ihmisen interleukiini 5:ttä.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-sekvenssi valitaan seuraavasta:

20 a) kuvan 1 mukainen DNA-sekvenssi samoin kuin niiden komplementaariset juosteet, tai ne joihin sisältyvät ^{SEURAJUVAT} nämä sekvenssit:

b) DNA-sekvenssit jotka hybridisoituvat sekvenssien kanssa, jotka on määritetty (a):n alla tai niiden fragmentit; ^{AKTIIV}

25 c) DNA-sekvenssit jotka geneettisen koodin degeneroitumisen vuoksi eivät hybridisoidu (a):n tai (b):n alla määritettyjen sekvenssien kanssa, mutta jotka koodittavat polypeptidejä joilla on täsmälleen sama aminohapposekvenssi. ^{AKTIIV}

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, jossa mainittu isäntäsolu on pro- tai eukaryoottinen isäntäsolu. ^{AKTIIV}

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, jossa mainittu eukaryoottinen isäntäsolu on nisäkäsisäntäsolu.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, jossa mainittu nisäkäsisäntäsolu on CHO- tai COS-solu.

7. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-6 mukainen menetelmä, jossa ekspressiovektori on pSV2-, pRSV-, PBC12MI-, pMSG- tai pCDM8-tyyppiä. *Virtanen*

5 ⑧ Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-7 mukaisen menetelmän mukaisesti valmistetun yhdisteen käyttö patenttivaatimuksen 10 mukaisen farmaseuttisen koostumuksen valmistusta varten. *VAARA VUORI* *LAUREN* *W. V. G. M.* *W. V. G. M.* *W. V. G. M.* *W. V. G. M.*

10 ⑨ DNA-sekvenssi, tunnettu siitä, että se sisältää DNA-sekvenssin joka koodittaa yhdistettä, joka on valmistettu minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-7 mukaisen menetelmän mukaisesti.

⑩ Vektori, erityisesti eukaryoottisessa isäntäsolussa ekspressiota varten, joka vektori sisältää patenttivaatimuksen 9 mukaisen DNA-sekvenssin.

15 ⑪ Isäntäsolu, erityisesti eukaryoottinen isäntäsolu, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 10 mukaisella vektorilla. *LAUREN*

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen isäntäsolu, joka on CHO- tai COS-solu.

68
Fig. 1

```

                                CCGCTGCTTCTC 12
ATCGCATGGCCACCGCATTTCTCAGGCCAGGCACATTGAGCATTGGTCCTGTGCCTGACGCTATGCTAGATGCTGGGGT 91
TGCAGCCACGAGCATAGACACGACAGACACGGTCCTCGCCATCTTCTGTTGAGTACTGGTCGGAACAGAGGATCGTCT 170
GTAGACAGGCTACAGATTGTTTTAGATTGAAGTTTCCTGTCATGTTCACTCATCTTTAAATCCTCATAGTAAAAAGGAT 249

1  ATG ATC ATC GTG GCG CAT GTA TTA CTC ATC CTT TTG GGG GCC ACT GAG ATA CTG CAA GCT 309
   Met Ile Ile Val Ala His Val Leu Leu Ile Leu Leu Gly Ala Thr Glu Ile Leu Gln Ala
   --- --- --- Met Val Pro                               Val               Leu Ala Thr

21  GAC TTA CTT CCT GAT GAA AAG ATT TCA CTT CTC CCA CCT GTC AAT TTC ACC ATT AAA GTT 369
   Asp Leu Leu Pro Asp Glu Lys Ile Ser Leu Leu Pro Pro Val Asn Phe Thr Ile Lys Val
       Asn His Lys           Phe Leu                               Ala

41  ACT GGT TTG GCT CAA GTT CTT TTA CAA TGG AAA CCA AAT CCT GAT CAA GAG CAA AGG AAT 429
   Thr Gly Leu Ala Gln Val Leu Leu Gln Trp Lys Pro Asn Pro Asp Gln Glu Gln Arg Asn
       His               Asp

61  GTT AAT CTA GAA TAT CAA GTG AAA ATA AAC GCT CCA AAA GAA GAT GAC TAT GAA ACC AGA 489
   Val Asn Leu Glu Tyr Gln Val Lys Ile Asn Ala Pro Lys Glu Asp Asp Tyr Glu Thr Arg
       Asp               His                               Gln               Asp

81  ATC ACT GAA AGC AAA TGT GTA ACC ATC CTC CAC AAA GGC TTT TCA GCA AGT GTG CGG ACC 549
   Ile Thr Glu Ser Lys Cys Val Thr Ile Leu His Lys Gly Phe Ser Ala Ser Val Arg Thr
   Lys                               Pro               Glu               Ala

101 ATC CTG CAG AAC GAC CAC TCA CTA CTG GCC AGC AGC TGG GCT TCT GCT GAA CTT CAT GCC 609
   Ile Leu Gln Asn Asp His Ser Leu Leu Ala Ser Ser Trp Ala Ser Ala Glu Leu His Ala
       Lys Ser Ser           Thr Thr                               Val               Lys

121 CCA CCA GGG TCT CCT GGA ACC TCA ATT GTG AAT TTA ACT TGC ACC ACA AAC ACT ACA GAA 669
   Pro Pro Gly Ser Pro Gly Thr Ser Ile Val Asn Leu Thr Cys Thr Thr Asn Thr Thr Glu
       Val Thr                               His               Val Val

141 GAC AAT TAT TCA CGT TTA AGG TCA TAC CAA GTT TCC CTT CAC TGC ACC TGG CTT GTT GGC 729
   Asp Asn Tyr Ser Arg Leu Arg Ser Tyr Gln Val Ser Leu His Cys Thr Trp Leu Val Gly
   Ser Ser His Thr His           Pro               Arg

161 ACA GAT GCC CCT GAG GAC ACG CAG TAT TTT CTC TAC TAT AGG TAT GGC TCT TGG ACT GAA 789
   Thr Asp Ala Pro Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Leu Tyr Tyr Arg Tyr Gly Ser Trp Thr Glu
   Lys                               Phe               Val Leu

181 GAA TGC CAA GAA TAC AGC AAA GAC ACA CTG GGG AGA AAT ATC GCA TGC TGG TTT CCC AGG 849
   Glu Cys Gln Glu Tyr Ser Lys Asp Thr Leu Gly Arg Asn Ile Ala Cys Trp Phe Pro Arg
   Lys                               Arg               Ala               Asn               Thr

201 ACT TTT ATC CTC AGC AAA GGG CGT GAC TGG CTT TCG GTG CTT GTT AAC GGC TCC AGC AAG 909
   Thr Phe Ile Leu Ser Lys Gly Arg Asp Trp Leu Ser Val Leu Val Asn Gly Ser Ser Lys
       Asn           Phe Glu Gln               Ala               His Ile

221 CAC TCT GCT ATC AGG CCC TTT GAT CAG CTG TTT GCC CTT CAC GCC ATT GAT CAA ATA AAT 969
   His Ser Ala Ile Arg Pro Phe Asp Gln Leu Phe Ala Leu His Ala Ile Asp Gln Ile Asn
   Arg Ala               Lys                               Ser Pro Leu               Val

241 CCT CCA CTG AAT GTC ACA GCA GAG ATT GAA GGA ACT CGT CTC TCT ATC CAA TGG GAG AAA 1029
   Pro Pro Leu Asn Val Thr Ala Glu Ile Glu Gly Thr Arg Leu Ser Ile Gln Trp Glu Lys
       Arg           Val               Ser Asn Ser           Tyr

261 CCA GTG TCT GCT TTT CCA ATC CAT TGC TTT GAT TAT GAA GTA AAA ATA CAC AAT ACA AGG 1089
   Pro Val Ser Ala Phe Pro Ile His Cys Phe Asp Tyr Glu Val Lys Ile His Asn Thr Arg
   Leu               Asp               Asn               Leu               Tyr               Lys

281 AAT GGA TAT TTG CAG ATA GAA AAA TTG ATG ACC AAT GCA TTC ATC TCA ATA ATT GAT GAT 1149
   Asn Gly Tyr Leu Gln Ile Glu Lys Leu Met Thr Asn Ala Phe Ile Ser Ile Ile Asp Asp
       His Ile               Lys           Ile Ala               Lys               Lys

301 CTT TCT AAG TAC GAT GTT CAA GTG AGA GCA GCA GTG AGC TCC ATG TGC AGA GAG GCA GGG 1209
   Leu Ser Lys Tyr Asp Val Gln Val Arg Ala Ala Val Ser Ser Met Cys Arg Glu Ala Gly
   Val               Thr           Ser Ile               Pro               Met Pro

321 CTC TGG AGT GAG TGG AGC CAA CCT ATT TAT GTG GGG TTC TCA AGA TAA AGGAGATAACATCCA 1272
   Leu Trp Ser Glu Trp Ser Gln Pro Ile Tyr Val Gly Phe Ser Arg End
   Arg               Gly                               Lys Glu

GCTTTCCTGCCCCACACCGTATCTGAAATAAAAAACAACAGCAGGGATAGCAGATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1351

```

Fig. 2

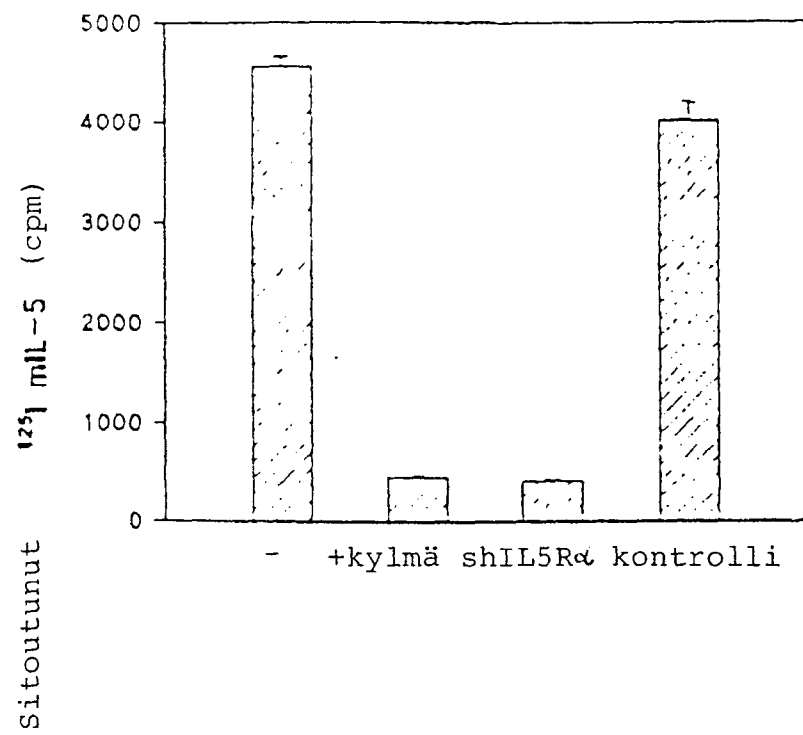


Fig. 3/2

```
AAT GGA TAT TTG CAG ATA GAA AAA TTG ATG ACC AAT GCA TTC ATC TCA ATA ATT GAT GAT 1149
281 Asn Gly Tyr Leu Gln Ile Glu Lys Leu Met Thr Asn Ala Phe Ile Ser Ile Ile Asp Asp
      His Ile      Lys      Ile Ala      Lys      Lys

CTT TCT AAG TAC GAT GTT CAA GTG AGA GCA GCA GTG AGC TCC ATG TGC AGA GAG GCA GGG 1209
301 Leu Ser Lys Tyr Asp Val Gln Val Arg Ala Ala Val Ser Ser Met Cys Arg Glu Ala Gly
      Val      Thr      Ser Ile      Pro      Met Pro

CTC TGG AGT GAG TGG AGC CAA CCT ATT TAT GTG GGA AAT GAT GAA CAC AAG CCC TTG AGA 1269
321 Leu Trp Ser Glu Trp Ser Gln Pro Ile Tyr Val Gly Asn Asp Glu His Lys Pro Leu Arg
      Arg      Gly      Lys ---      Arg      Ser      Val

GAG TGG TTT GTC ATT GTG ATT ATG CCA ACC ATC TGC TTC ATC TTG TTA ATT CTC TCG CTT 1329
341 Glu Trp Phe Val Ile Val Ile Met Ala Thr Ile Cys Phe Ile Leu Leu Ile Leu Ser Leu
      His Leu      Leu Pro Thr Ala Ala      Val      Phe

ATC TGT AAA ATA TGT CAT TTA TGG ATC AAG TTG TTT CCA CCA ATT CCA GCA CCA AAA AGT 1389
361 Ile Cys Lys Ile Cys His Leu Trp Ile Lys Leu Phe Pro Pro Ile Pro Ala Pro Lys Ser
      Arg Val      Thr Arg      Val

AAT ATC AAA GAT CTC TTT GTA ACC ACT AAC TAT GAG AAA GCT GGG TCC AGT GAG ACG GAA 1449
381 Asn Ile Lys Asp Leu Phe Val Thr Thr Asn Tyr Glu Lys Ala Gly Ser Ser Glu Thr Glu
      Pro      Val      Glu      Pro ---      Asn      Lys

ATT GAA GTC ATC TGT TAT ATA GAG AAG CCT GGA GTT GAG ACC CTG GAG GAT TCT GTG TTT 1509
401 Ile Glu Val Ile Cys Tyr Ile Glu Lys Pro Gly Val Glu Thr Leu Glu Asp Ser Val Phe
      Val His Cys Val      Glu Val      Phe      Val Met Gly Asn      Thr

TGA TGACTGTCACTTTGGCATCCTCTGATGAAC TCACACATGCCTCAGTGCCTCAGTGAAAATAACAGGGATGCTGGC 1587
End

TCTTGGCTAAGAGGTGTTCCG
```

Fig. 3/1

[illegible]

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

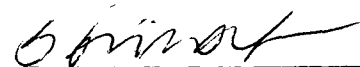
EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

- THE EMBO JOURNAL 9(13)-90, 4367-4374, TAKAKI ET AL.
- J. EXP. MED. 172, -90, 683-691, PLATTINCK ET AL.

24.10.97



Allekirjoitus