(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

FI0001191918

(10) **FI 119191 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **29.08.2008**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **964311**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **25.10.1996**

(24) Alkupäivä - Löpdag **20.04.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **25.10.1996**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/EP95/01494**

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

02.05.1994 EP 94810244 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 •**Groner,Bernd,** Lerchenstrasse 2, 4059 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •**Groner,Bernd,** Lerchenstrasse 2, 4059 Basel, SVEITSI, (CH)
2 •**Moritz,Dirk,** Gundeldingerstrasse 203, 4053 Basel, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab
Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Bifunktionaalinen proteiini, valmistus ja käyttö
Bifunktionellt protein, framställning och användning

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:90112115 ECACC 90112116 ECACC 90112117 ECACC
90112118 ECACC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP 0502812 A1, WO 92/10591 A1, WO 93/19163 A1, STANCOVSKI I. et al. Targeting of T lymphocytes to Neu/HER 2 -expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. The Journal of Immunology, 1993, vol. 151,nro 11, p. 6577-6582, CLASSON B. et al. The hinge region or the CD8alpha chain: structure, antigenicity, and utility in expression of immunoglobulin superfamily domains. International Immunology, 1992, vol.4, nro 2, p. 215-225, ESHHAR Z. et al. Design of cytotoxic T lymphocytes with antibody-type specificity against tumor cells using chimeric TcR. Journal of Cellular Biochemistry, Supplement, 1990, nro 14B, p. 70, abstract CE112, ESHHAR Z. et al. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin ant T-cell receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1993, vol. 90, nro 2, pp.720-724, WELS W. et al. Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2-receptor. Biotechnology,1992, vol. 10, nro 10, pp. 1128-1132, SHALABY M. et al. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. The Journal of Experimental Medicine, 1992, vol. 175, nro 1, pp.217-225.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee bifunktionaalista proteiinia, joka kykenee ohjaamaan mainittua proteiinia tuottavan isäntäsolun spesifisesti tunnistamaan valikoidut kohdesolut. Edelleen keksintö koskee menetelmää mainitun proteiinin tuottamiseksi, mainittua proteiinia koodaavaa DNA-rakennetta, mainittua DNA:ta ilmentävän isäntäsolun sisältävää koostumusta, sekä mainitun proteiinin spesifisesti tunnistavia vasta-aineita. Lisäksi keksintö koskee sellaisen isäntäsolun käyttöä, esim. tuhoamaan valikoivasti kasvainsoluja in vitro tai in vivo.

Uppfinningen avser ett bifunktionelit protein, som förmår styra en värdcell, som producerar det nämnda proteinet, att specifikt i genkänna valda målceller. Uppfinningen avser även ett förfarande för att producera det nämnda proteinet, en DNA-konstruktion, som kodar för det nämnda proteinet, en sammamnsättning, som innehåller en det nämnda DNAt uttryckande värdcell, samt antikroppar, som specifikt igenkänner det nämnda proteinet. Uppfinningen avser ytterligare användning av en sådan värdcell, t.ex. för att selektivt döda tumörceller in vitro eller in vivo.

BIFUNKTIONAALINEN PROTEIINI, VALMISTUS JA KÄYTTÖ

Keksintö koskee bifunktionaalista proteiinia, joka kykenee ohjaamaan mainittua proteiinia tuottavan isäntäsolun tunnistamaan spesifisesti valikoidut kohdesolut. Edelleen keksintö koskee menetelmää mainitun proteiinin valmistamiseksi, mainittua proteiinia koodaavaa DNA-rakennetta, koostumusta, joka sisältää mainittua DNA:ta ilmentävän isäntäsolun, sekä vasta-aineita, jotka tunnistavat spesifisesti mainitun proteiinin. Lisäksi keksintö koskee sellaisen isäntäsolun käyttöä, esim. tuhoamaan valikoivasti kasvainsoluja *in vitro* tai *in vivo*.

Adoptiivisen immuunihoidon, jota kutsutaan myös soluimmuunihoidoksi (cellular immunotherapy), periaatteena on immunologisesti aktiivisten solujen siirto nisäkkääseen vahvistamaan nisäkkään immuunivastetta sairaustilaa kohtaan. Tätä varten esim. ihmispotilaasta tai muusta kohteesta otetaan imusoluja, viljellään niitä valinnaisesti immuunijärjestelmää voimistavien aineiden, kuten interleukiini 2:n, läsnäollessa, minkä jälkeen ne annetaan (uudelleen) potilaalle, tavallisesti immuunijärjestelmää voimistavan aineen läsnäollessa. Potilaassa immunologisesti aktiiviset solut lievittävät sairaustilaa.

Adoptiiviseen immuunihoitoon soveltuviksi ehdotettuja immunologisesti aktiivisia soluja ovat lymfokiinien aktivoimat tappajasolut (LAK-solut), jotka ovat peräisin luonnollisista tappajasoluista (NK-soluista), ja *in vitro* herkistetyt lymfosyytit (IVS), jotka ovat peräisin sytolyyttisistä tai sytotoksisista T-lymfosyyteistä (CTL:-soluista), joita kutsutaan myös tappaja-T-lymfosyyteiksi. LAK-solut ovat sytolyyttisiä soluja, jotka reagoivat monien erilaisten kohdesolujen kanssa. Ne eivät ole MHC- (major histocompatibility complex) -rajoitteisia ja ne kykenevät hajottamaan kasvainsoluja, mutta myös normaaleja soluja *in vitro*. CTL-soluilla on klonaalisia erityispiirteitä, so. kukin klooni on spesifinen tietylle kohdesolun pinnalla

olevalle antigeenirakenteelle. Tietty CTL tunnistaa ja sitoutuu yhteen ainoaan antigeeniin, jolloin se aktivoituu ja voi sitten lisääntyä ja tuhota kohdesoluja. Tunnistusprosessi on MHC-rajoitteinen ja -riippuvainen, koska antigeeni tunnistetaan vain kun se on liittynyt yhteen kohdesolun ilmentämän self-luokka I:n MHC-pintamolekyylin kanssa.

T-solujen suorittama spesifisen antigeenin tunnistus välittyy T-solun antigeenireseptorin (TCR) kautta (A. Weiss, Cell 73, 209-212 (1993)). Ligandin sitoutuminen reseptoriin saattaa laukaista solun efektoriohjelmat, kuten esimerkiksi tyrosiinikinaasien aktivoinnin, solunsisäisen kalsiumionien vapautumisen ja interleukiini 2:n tuotannon (R.T. Abraham *et al.*, Trends Biochem. Sci. 17, 434-438 (1992)).

TCR on multimeerinen pintakompleksi, joka sisältää ainakin kuuden geenin tuotteita, joita kaikkia tarvitaan tehokkaaseen solukalvoilmentymiseen. TCR:n klonotyyppiset alfa- (α) ja beta- (β) ketjut välittävät spesifisen kohdesolun tunnistuksen. Nämä ketjut ovat ei-kovalenttisesti liittyneet CD3-kompleksin ei-polymorfisiin komponentteihin gamma- (γ), delta- (δ) ja epsilon- (ϵ) ja zeta- (ζ) ketju. Disulfidisidoksinen ζ-homodimeeri on solukalvon läpäisevä molekyyli, ja sen soluliman puoleisella osalla on keskeinen merkitys TCR-välitteisessä viestin välityksessä ja solun hajoamisen induktiossa. ζ-ketju kykenee itsenäiseen viestin välitykseen, so. ζ riittää yksin vasteen välittämiseen. ζ-ketjun fuusioituminen solunulkoisen ligandinsitojadomeenin kanssa saattaa johtaa molekyyliin, joka voidaan aktivoida interaktiolla ligandin kanssa (S.J. Frank *et al.*, Science 249, 174-177 (1990); C. Romeo & B. Seed, Cell 64, 1037-1046 (1990); F. Letourneur & R.D. Klausner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8905-8909 (1991)). ζ:n isoformi, eta (η), on ζ-geenin transkriptin vaihtoehtoisesti silmukoitu muoto.

Kasvaimen muodostukseen kuuluu onkogeenien ja syövänestogeenien mutaatio somaattisissa soluissa. Tällaiset mutaatiot saattavat johtaa rakenteellisiin muutoksiin tai proteiinien yli-ilmentymiseen. Molemmat tapaukset saattavat johtaa muutoksiin näiden proteiinien solunsisäisessä prosessoinnissa ja uusien antigeenirakenteiden esiintymiseen yhdessä solujen pinnan MHC-antigeenien kanssa. Onkogeenituotteita kohtaan suunnattujen vasta-aineiden toteaminen kasvainpotilaiden seerumissa viittaa siihen, että onkogeenituotteet saattavat olla antigeenisiä. Lisätodistuksen tästä antigeenisuudesta antaa solun immuunivasteen herääminen. Useissa mallijärjestelmissä on esitetty sellaisen CTL:n esiintyminen, joka tunnistaa ja eliminoi kasvainsoluja (T. Boon, Adv. Cancer Res. 58, 177-210 (1992); M.W. Kast *et al.*, Cell 59, 603-614 (1989); Disis *et al.*, Cancer Res. 54, 16-20 (1994)).

Nykyiset menetelmät, joissa pyritään käyttämään hyväksi T-lymfosyyttien sytolyyttistä aktiivisuutta esim. syövän hoitoon, kärsivät monista puutteista, kuten esimerkiksi luontaisesti esiintyvän CTL:n tunnistusprosessin MHC-rajoitteisuudesta. Sellaiselle lähestymistavalle on tarvetta, jossa voitetaan tällä hetkellä tavatut rajoitukset.

Keksintö koskee sellaista parannettua lähestymistapaa, jossa manipuloidaan CTL-tunnistuksen spesifisyyttä, esimerkiksi muutetaan CTL-tehoa ja selektiivisiä kasvaimen vastaisia aineita. Tämä lähestymistapa perustuu yhdenmukaisten geneettisten muutosten tunnistamiseen hyvänlaatuisissa ja erityisesti pahanlaatuisissa kasvainsoluissa. Kun CTL varustetaan määrätyllä kasvainsoluspesifisyydellä, voidaan keskittyä tiettyihin kasvainsoluihin ja tuhota mainitut kohdesolut MHC:n rajoittamatta ja MHC:stä riippumatta. CTL:n, johon on siirretty uusi, MHC:stä riippumaton tunnistusspesifisyys, aikaansaamaa kasvainsolun hajotusta voidaan käyttää *in vitro* (*ex vivo*) tai *in vivo*, esimerkiksi syövän hoitoon kuuluvassa geenihoidossa.

Kasvainsolut ovat (ennalta) määriteltyjä tai valikoituja kohdesoluja siinä mielessä, että niissä on antigeenirakenne (ligandi), jonka tunnistaa ja sitoo antigeeninsitojadomeeni, joka on keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin osa.

Keksintö koskee kimeeristä proteiinia, joka kykenee ohjaamaan CTL:n spesifisesti tunnistamaan ja tuhoamaan valikoituja kasvainsoluja. Yksityiskohtaisemmin keksintö koskee kimeeristä proteiinia, joka sisältää tunnistustoiminnon, sarana-alueen ja TCR:n ζ-ketjun sekä CTL:n, joka tuottaa yhtä tai useampaa sellaista proteiinimolekyyliä. Soluun sitoutuneen ligandin sitoutuminen keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin tunnistusosaan johtaa ζ-ketjuvälitteiseen viestin välitykseen CTL:n sisällä, ja lopulta tämä johtaa ligandia kantavan solun hajoamiseen.

Keksinnön mukainen kimeerinen proteiini on sellainen proteiini, jota ei esiinny luonnossa. Proteiini on bifunktionaalinen siinä mielessä, että se kykenee sekä spesifisesti tunnistamaan ja sitoutumaan tiettyyn antigeenirakenteeseen (sen tunnistustoimintadomeenin välityksellä) että toimimaan viestinsiirtokomponenttina (sen ζ-ketjuosan välityksellä). Sarana-alue toimii välikkeenä ja varmistaa tunnistustoimintadomeenille tarpeellisen saavutettavuuden ja joustavuuden. Sarana-alueen ymmärretään olevan olennainen keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin toimivuudelle. Kimeerisen proteiinin rakennejärjestys on edullisesti sellainen, että tunnistustoiminto sijaitsee N-terminaalissa ja on kytkeytynyt sarana-alueen välityksellä ζ-ketjuosaan, joka sijaitsee kimeerisen proteiinin C-terminaalissa. Koska keksinnön mukainen kimeerinen proteiini on solunpinnan reseptori, se sisältää solunulkoisen domeenin, solukalvon läpäisevän domeenin ja soluliman domeenin, ja se insertoidaan isäntäsolun, esim. CTL:n, solukalvoon. Keksinnön mukaisen proteiinin toimivuus isäntäsolussa on todettavissa määrityksellä, joka soveltuu mainitun proteii-

nin viestinsiirtokyvyn osoittamiseen tietyn ligandin sitoutumisen jälkeen, esim. määrityksellä, jolla voidaan todeta ligandin sitoutumisen laukaisema viestinsiirron reaktiotie. Sellainen on esimerkiksi määritys, jossa mitataan kalsiumionien vapautumisen lisääntyminen, solunsisäinen tyrosiinin fosforylaatio, inositolifosfaatin saanto (turnover) tai näin aikaansaatu interleukiini (IL) 2:n, γ-interferonin, GM-CSF:n, IL-3:n tai IL-4:n tuotanto. (R.T. Abraham *et al.*, Trend Biochem. Sci. 17, 434-438 (1992)). Tällaiset määritykset ovat alan asiantuntijalle helposti saatavilla. Viitataan esimerkeissä käytettyihin määrityksiin. On selvää, että näitä määrityksiä voidaan modifioida, esim. käyttämällä muita sopivia solulinjoja.

Tunnistustoiminnosta vastaa vasta-aineen, erityisesti yksiketjuisen vasta-aineen (scFv), antigeeninsitojadomeeni. Yksiketjuiset vasta-aineet ovat geenifuusioita, jotka sisältävät monoklonaalisten vasta-aineiden raskaan ja kevyen ketjun muuntelevat domeenit. Mainittu tunnistus- ja sitoutumistoiminto on annettu TCR-kompleksin ζ-ketjulle, jolloin kierretään TCR:n α/β-ketjujen kautta tapahtuva MHC-rajoitteinen antigeenin tunnistus.

Antigeeninsitojadomeeni saadaan monoklonaalisesta vasta-aineesta, joka on spesifisesti suunnattu soveltuvaa kasvainsolulla olevaa antigeenia vastaan.

Sellainen antigeeni on sopiva, jolla on normaalisoluun verrattuna kohonnut tai spesifinen ilmentyminen kasvainsolun pinnalla, esim. antigeeni, joka muodostuu yhdenmukaisista (consistent) geenimuutoksista kasvainsoluissa. Esimerkkejä sopivista antigeeneista ovat tiehytepiteelin musiini, gp 36, TAG-72, kasvutekijän reseptorit ja glykosfingolipidit sekä muut hiilihydraattiantigeenit, joita ilmennetään etupäässä kasvainsoluissa. Tiehytepiteelin musiinia ilmennetään voimistuneesti rinta-, munasarja- ja haimakarsinoomasoluissa, ja sen tunnistaa esim. monoklo-

naalinen vasta-aine SM3 (Zotter *et al.*, Cancer Rev. 11, 55-101 (1988)). Glykoproteiinia gp 36 esiintyy ihmisen leukemia- ja lymfoomasolujen pinnalla. Mainitun antigeenin tunnistaa esimerkiksi vasta-aine SN 10. TAG-72 on pankarsinooma-antigeeni, jonka tunnistaa monoklonaalinen vasta-aine CC49 (Longenecker, Sem. Cancer Biol. 2, 355-356). Kasvutekijäreseptoreita ovat esimerkiksi ihmisen epidermaalisen kasvutekijän (EGF) reseptori (Khazaie *et al.*, Cancer and Metastasis Rev. 12, 255-274 (1993)) ja HER2, jota kutsutaan myös erbB-2:ksi tai gp 185:ksi (A. Ullrich ja J. Schlessinger, Cell 61, 203-212 (1990)). ErbB-2-reseptori on solukalvon läpäisevä molekyyli, jota yli-ilmennetään suuressa prosenttiosuudessa ihmisen karsinoomia (N.E. Hynes, Sem. in Cancer Biol. 4, 19-26 (1993)). Normaalissa aikuisen kudoksessa erbB-2:ta ilmennetään vähän. Tämä ero ilmentymisessä todistaa erbB-2-reseptorin olevan "kasvaimen voimistama".

Antigeeninsitojadomeeni saadaan edullisesti monoklonaalisesta vasta-aineesta, joka on valmistettu käyttämällä immunogeeninä eläviä ihmisen kasvainsoluja, joissa antigeeni esiintyy luonnollisessa muodossaan. Keksinnön edullisessa suoritustavassa kimeerisen proteiinin tunnistusosa sitoutuu spesifisesti kasvutekijän reseptorin, erityisesti HER 2:n, solunulkoisessa domeenissa olevaan antigeeniseen determinanttiin. HER2 kasvutekijän reseptoria vastaan suunnatut monoklonaaliset vasta-aineet ovat tunnettuja, ja niitä on kuvattu esimerkiksi julkaisuissa S.J. McKenzie *et al.*, Oncogene 4, 543-548 (1990), R.M. Hudziak *et al.*, Molecular and Cellular Biology 9, 1165-1172 (1989), kansainvälisessä patenttihakemuksessa WO 89/06692 (Genentech) ja japanilaisessa patenttihakemuksessa Kokai 02-150 293 (Ajinomoto KK). Monoklonaalisia vasta-aineita, jotka on muodostettu sellaisia eläviä ihmisen kasvainsoluja vastaan, joissa on natiivissa muodossaan olevaa HER2:ta, kuten esimerkiksi SKBR3-soluissa, kuvataan esimerkiksi EP-patenttihakemuksessa 502 812 (Ciba-Geigy), joka sisällyte-

tään tähän viitteenä, ja tähän sisältyvät vasta-aineet FRP5, FSP16, FSP77 ja FWP51. Näitä vasta-aineita tuottavat hybridoomasolulinjat on talletettu talletuslaitokseen European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, PHLS Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, UK) 21. marraskuuta, 1990 talletusnumeroilla 90112115, 90112116, 90112117 ja vastaavasti 90112118.

Keksinnön mukaisessa kimeerisessä proteiinissa edullinen antigeeninsitojadomeeni on yksiketjuinen yhdistelmävasta-aine (scFv), joka sisältää kevyen ketjun muuntelevan domeenin (V_L), joka on silloitettu raskaan ketjun muuntelevaan domeeniin (V_H) joustavan kytkijäalueen (välikkeen) välityksellä, joka on edullisesti peptidi. Peptidi koostuu edullisesti noin 10-30 aminohaposta, erityisesti luontaisesti esiintyvistä aminohapoista, esim. noin 15:stä luontaisesti esiintyvästä aminohaposta. Sellainen peptidi on edullinen, joka koostuu L-glysiinistä tai L-seriinistä, erityisesti 15 aminohapon peptidi, joka koostuu kolmesta toistoyksiköstä Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. Sellainen yksiketjuinen vasta-aine on edullinen, jossa V_H sijaitsee yhdistelmävasta-aineen N-terminaalissa. Sellainen kimeerinen proteiini on edullinen, jossa yksiketjuisella yhdistelmävasta-aineella on edellä määritelty edullinen spesifisyys, esim. kimeerinen proteiini, jonka sisältämässä yksiketjuisessa yhdistelmävasta-aineessa raskaan ketjun muunteleva domeeni ja kevyen ketjun muunteleva domeeni ovat peräisin monoklonaalisesta vasta-aineesta, esim. muriinin (hiiri tai rotta) monoklonaalisesta vasta-aineesta, joka on suunnattu ihmisen kasvutekijäreseptoria HER2 vastaan, sellainen muriinin monoklonaalinen vasta-aine voi olla esimerkiksi FSP16, FSP77, FRP5 tai FWP51.

Vasta-aineen raskaan tai kevyen ketjun muunteleva domeeni koostuu niin kutsutuista kehysalueista (FR:istä, framework regions), jotka ovat melko säilyneitä vasta-aineissa, joilla on erilainen spesifisyys, ja tietylle spesifisyy-

delle tyypillisistä hypervariaabelialueista, joita kutsutaan myös komplementaarisuuden määräysalueiksi (CDR, complementarity determining regions). Keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin antigeeninsitojadomeenissa FR:t on edullisesti saatu nisäkkään, esim. muriinin tai erityisesti ihmisen, vasta-aineesta. Monoklonaalisen vasta-aineen scFv-johdannainen siirretään TCR/CD3-kompleksin ζ-ketjuun.

Erityisen edullinen kimeerinen proteiini sisältää yksiketjuisen yhdistelmävasta-aineen, jossa raskaan ketjun muunteleva domeeni sisältää polypeptidin, jolla on kaava

$$FR_1\text{-}CDR_{1H}\text{-}FR_2\text{-}CDR_{2H}\text{-}FR_3\text{-}CDR_{3H}\text{-}FR_4 \qquad (I)$$

jossa polypeptidiketju kuvataan niin, että se alkaa uloimmasta N-terminaalisesta päästä ja päättyy uloimpaan C-terminaaliseen päähän, ja FR_1 on peptiditähde, joka sisältää vähintään 25-29, edullisesti 25-33, luontaisesti esiintyvää aminohappoa, FR_2 on peptiditähde, joka sisältää 12-16 luontaisesti esiintyvää aminohappoa, FR_3 on peptiditähde, joka sisältää 30-34 luontaisesti esiintyvää aminohappoa, FR_4 on peptiditähde, joka sisältää vähintään 6-10, edullisesti 6-13, luontaisesti esiintyvää aminohappoa, CDR_{1H} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssistä 31-35; CDR_{2H} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssistä 50-66; ja CDR_{3H} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssistä 99-108, tai CDR_{1H} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssistä 31-35; CDR_{2H} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssistä 50-66; ja CDR_{3H} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssistä 99-109, ja jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja. Nämä erityiset komplementaarisuuden määräävät alueet ovat Asn-Tyr-Gly-Met-Asn (CDR_{1H}), Trp-Ile-Asn-Thr-Ser-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-Phe-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly (CDR_{2H}) ja Trp-Glu-Val-Tyr-His-Gly-Tyr-Val-Pro-Tyr

(CDR_{3H}) SEKV. ID NO:2:n mukaan, tai Ser-Tyr-Trp-Met-Asn (CDR_{1H}), Met-Ile-Asp-Pro-Ser-Asp-Ser-Glu-Thr-Gln-Tyr-Asn-Gln-Met-Phe-Lys-Asp (CDR_{2H}) ja Gly-Gly-Ala-Ser-Gly-Asp-Trp-Tyr-Phe-Asp-Val (CDR_{3H}) SEKV. ID NO:4:n mukaan.

Erityisen edullinen on kimeerinen proteiini, jossa yksiketjuinen yhdistelmävasta-aine sisältää kaavan I mukaisen raskaan ketjun muuntelevan domeenin, jossa kehysalueet FR_1, FR_2, FR_3 ja FR_4 ovat edullisesti peräisin nisäkkään, erityisesti muriinin tai ihmisen, vasta-aineesta.

Keksinnön ensimmäisessä suoritustavassa edullisin on sellainen kimeerinen proteiini, jossa yksiketjuisen yhdistelmävasta-aineen raskaan ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssin 2-120 muodostaman polypeptidin, jossa valinnaisesti yksi tai useampi, esim. 1, 2, 3 tai 4 yksittäistä aminohappoa aminohapposekvenssissä 2-30 (FR_1), 36-49 (FR_2), 67-98 (FR_3), ja/tai 110-120 (FR_4) korvataan muilla aminohapoilla tai poistetaan, ja jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja, erityisesti kimeerinen proteiini, jossa raskaan ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssin 6-119 muodostaman polypeptidin, jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja.

Keksinnön toisessa suoritustavassa edullisin on sellainen kimeerinen proteiini, jossa yksiketjuisen yhdistelmävasta-aineen raskaan ketjun muunteleva osa sisältää SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssin 2-120 muodostaman polypeptidin, jossa valinnaisesti yksi tai useampi, esim. 1, 2, 3 tai 4 aminohappoa aminohapposekvenssissä 2-30 (FR_1), 36-49 (FR_2), 67-98 (FR_3), ja/tai 110-120 (FR_4) korvataan muilla aminohapoilla tai poistetaan, ja jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja, erityisesti yhdistelmävasta-aineet, joiden raskaan ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:4:n aminohapposek-

venssin 6-120 muodostaman polypeptidin, jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja.

Esimerkiksi kehysalueella oleva hydrofobinen aminohappo voidaan korvata toisella aminohapolla, edullisesti myös hydrofobisella aminohapolla, esim. homologisella aminohapolla, se voidaan korvata kahdella aminohapolla (mikä johtaa aminohapon insertioon) tai poistaa. Samoin kehysalueella oleva hydrofiilinen aminohappo voidaan korvata toisella aminohapolla, kahdella aminohapolla tai poistaa, jolloin korvaavat aminohapot edullisesti säilyttävät vastaavan kehysalueen vetysidosrakenteen. Kaikissa yhden tai useamman aminohapon korvauksissa otetaan edullisesti huomioon ne ohjeistot, joita alalla tunnetaan vasta-aineen uudelleen muotoilua tai ihmiselle soveltuvaksi tekemistä (humanize) varten. Erityisen huomionarvoisia ovat ohjeistot, joilla pyritään vähentämään uudelleen muotoillun vasta-aineen immunogeenisuutta ("alkuperäiseen" monoklonaaliseen vasta-aineeseen verrattuna) ja/tai suunnittelemaan vasta-aine, jonka sidosaffiniteetti suunnilleen vastaa tai ylittää "alkuperäisen" vasta-aineen. Aminohappojen modifikaatio voidaan rajoittaa yhteen FR-alueeseen, so. FR_1:een, FR_2:een, FR_3:een tai FR_4:ään, tai se voidaan ulottaa kahteen, kolmeen tai kaikkiin neljään FR:ään.

Samalla tavalla keksinnön mukainen edullinen kimeerinen proteiini sisältää yksiketjuisen yhdistelmävasta-aineen, jossa kevyen ketjun muunteleva domeeni sisältää polypeptidin, jolla on kaava

$$FR_6\text{-}CDR_{1L}\text{-}FR_7\text{-}CDR_{2L}\text{-}FR_8\text{-}CDR_{3L}\text{-}FR_9 \qquad (II)$$

jossa polypeptidiketju kuvataan niin, että se alkaa uloimmasta N-terminaalisesta päästä ja päättyy uloimpaan C-terminaaliseen päähän, ja FR_6 on peptiditähde, joka sisältää luontaisesti esiintyviä aminohappoja, edullisesti 19-25,

erityisesti 19-23, luontaisesti esiintyvää aminohappoa, FR_7 on peptiditähde, joka sisältää 13-17 luontaisesti esiintyvää aminohappoa, FR_8 on peptiditähde, joka sisältää 30-34 luontaisesti esiintyvää aminohappoa, FR_9 on peptiditähde, joka sisältää luontaisesti esiintyviä aminohappoja, erityisesti 7-11 luontaisesti esiintyvää aminohappoa, ja CDR_{1L} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssistä 158-168, CDR_{2L} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssistä 184-190, ja CDR_{3L} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssistä 223-231, tai CDR_{1L} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssistä 159-164, CDR_{2L} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssistä 185-191, ja CDR_{3L} on peptiditähde, joka koostuu SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssistä 224-231, ja jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja. Nämä erityiset komplementaarisuuden määräävät alueet ovat Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Tyr-Asn-Ala-Val-Ala (CDR_{1L}), Ser-Ala-Ser-Ser-Arg-Tyr-Thr (CDR_{2L}) ja Gln-Gln-His-Phe-Arg-Thr-Pro-Phe-Thr (CDR_{3L}) SEKV. ID NO 2:n mukaan, tai Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Ile-Lys-Lys-Tyr-Ile-Ala (CDR_{1L}), Tyr-Thr-Ser-Val-Leu-Gln-Pro (CDR_{2L}) ja Leu-His-Tyr-Asp-Tyr-Leu-Tyr-Thr (CDR_{3L}) SEKV. ID NO:4:n mukaan.

Erityisen edullinen on kimeerinen proteiini, jossa yhdistelmävasta-aine sisältää kaavan II mukaisen kevyen ketjun muuntelevan domeenin, jossa peptiditähteet kehysalueista FR_5, FR_6, FR_7 ja FR_8 ovat edullisesti peräisin nisäkkään, erityisesti muriinin tai ihmisen, vasta-aineesta.

Keksinnön eräässä suoritustavassa edullisin on sellainen kimeerinen proteiini, jossa yhdistelmävasta-aineen kevyen ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssin 135-240 muodostaman polypeptidin, jossa valinnaisesti yksi tai useampi, esim. 1, 2, 3 tai 4 aminohappoa aminohapposekvensseissä 135-157 (FR_6), 169-183

(FR_7), 191-222 (FR_8), ja/tai 232-240 (FR_9) korvataan muilla aminohapoilla tai poistetaan, ja jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja, erityisesti kevyen ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:2:n aminohapposekvenssin 135-240 muodostaman polypeptidin, jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja.

Keksinnön toisessa suoritustavassa edullisin on sellainen kimeerinen proteiini, jossa yhdistelmävasta-aineen kevyen ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssin 136-240 muodostaman polypeptidin, jossa valinnaisesti yksi tai useampi, esim. 1, 2, 3 tai 4 yksittäistä aminohappoa aminohapposekvensseissä 136-158 (FR_6), 170-184 (FR_7), 192-223 (FR_8), ja/tai 232-240 (FR_9) korvataan muilla aminohapoilla tai poistetaan, ja jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja, erityisesti kevyen ketjun muunteleva domeeni sisältää SEKV. ID NO:4:n aminohapposekvenssin 136-240 muodostaman polypeptidin, jossa aminohappo Cys saattaa olla hapettuneessa tilassa muodostaen S-S-siltoja.

Esimerkiksi kehysalueiden aminohapot voidaan korvata muilla aminohapoilla tai poistaa siten kuin edellä raskaan ketjun kohdalla on yksityiskohtaisesti selostettu.

Erityisen edullinen on sellainen kimeerinen proteiini, joka sisältää yksiketjuisen yhdistelmävasta-aineen, jossa raskaan ketjun muunteleva domeeni ja kevyen ketjun muunteleva domeeni on kytketty toisiinsa välikeryhmällä, joka koostuu 10-30:stä, esim. noin 15:stä, aminohaposta, erityisesti sellainen yksiketjuinen yhdistelmävasta-aine, joka sisältää polypeptidin, jolla on kaava

$$FR_1\text{-}CDR_{1H}\text{-}FR_2\text{-}CDR_{2H}\text{-}FR_3\text{-}CDR_{3H}\text{-}FR_4\text{-}Sp\text{-}FR_6\text{-}CDR_{1L}\text{-}FR_7\text{-}CDR_{2L}\text{-}FR_8\text{-}CDR_{3L}\text{-}FR_9 \qquad (III)$$

jossa polypeptidiketju kuvataan niin, että se alkaa uloimmasta N-terminaalisesta päästä ja päättyy uloimpaan C-terminaaliseen päähän, ja FR_1, CDR_{1H}, FR_2, CDR_{2H}, FR_3, CDR_{3H}, FR_4, FR_6, CDR_{1L}, FR_7, CDR_{2L}, FR_8, CDR_{3L} ja FR_9 ovat, kuten edellä on mainittu, ja Sp on edellä esitetty peptidiväli-ke.

Antigeeninsitojadomeenista voidaan tutkia sen spesifisyys ennalta määrättyä kasvainsoluantigeenia kohtaan alalla tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi sellaisten solujen immunofluoresenssivärjäyksellä, jotka ilmentävät suuria määriä antigeenia, immunoblottaamalla joko suoraan tai immuunisaostamalla ja proteiiniblottaamalla immunokompleksit, tai muulla immunologisella määritysmenetelmällä, kuten sitoutumis-, risti-inhibitio- tai kompetitiivisella radio- tai entsyymi-immuunimäärityksellä. Antigeeninsitojadomeenin sidosaffiniteetti voidaan määrittää käyttämällä sopivaa kvantitatiivista määritystä, jonka alan asiantuntija voi helposti aikaansaada tunnettujen tekniikoiden ja periaatteiden nojalla. Haluttaessa antigeeninsitojadomeenin affiniteettia voidaan verrata sopivaan vertailuvasta-aineeseen, esim. "parentaaliseen" hiiren monoklonaaliseen vasta-aineeseen, josta se on peräisin.

Keksinnön mukainen kimeerinen proteiini sisältää antigeeninsitojadomeenin lisäksi sarana-alueen, joka insertoidaan lyhyenä, joustavana "liekanaruna" antigeeninsitojadomeenin ja ζ-domeenin väliin. Sarana-alue on peptidi, joka sisältää noin 40-200 luontaisesti esiintyvää aminohappoa, edullisesti noin 60-190 aminohappoa. Keksinnön mukaisessa kimeerisessä proteiinissa oleva sarana-alue on edullisesti immunoglobuliinin sarana-alueen kaltainen, esim. CD4-molekyylistä peräisin oleva sarana-alue, kuten esimerkiksi D3D4-immunoglobuliinidomeenit (P.J. Maddon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9155-9159 (1987), tai CD8α-molekyylistä peräisin oleva sarana-alue, esim. Lyt-2 (R. Zomoyska *et al.*, Cell 43, 153-163 (1985); B.J. Classon *et al.*,

Int. Immunol. 4, 2, 215-225 (1992)). SEKV. ID NO:7:ssä esitetyssä aminohapposekvenssissä sarana-alue (Lyt-2) ulottuu aminohaposta asemassa 245 aminohappoon asemassa 304.

Keksinnön mukainen kimeerinen proteiini sisältää antigeeninsitojadomeenin ja sarana-alueen lisäksi toiminnallisen ζ-domeenin, joka antaa kimeeriselle proteiinille solukalvon läpäisevän ja viestinvälittäjädomeenin. Toiminnallinen ζ-domeeni sisältää pääosin ζ-ketjun solukalvon läpäisevän ja soluliman puoleisen domeenin. Keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin antigeeninsitojadomeenin ja spesifisen antigeenin välisen vuorovaikutuksen aikaansaama TCR:n ζ-domeenivälitteinen aktivaatio laukaisee monia viestinsiirtoreaktioteitä, esim. edellä mainitut. Keksinnön mukaan ζ-ketju on peräisin nisäkkäästä, erityisesti muriinista tai ihmisestä. TCR:ssä ζ esiintyy ζζ-disulfidihomodimeerinä. Toiminnallinen ζ-domeeni on proteiini, joka ilmennyttyään sellaisissa T-soluhybridoomissa, joissa ei ole endogeenistä ζ-ilmentymistä, kykenee palauttamaan mainituille hybridoomille toiminnallisesti aktiivisen TCR:n, esim. siten, että antigeenin indusoima interleukiini 2:n eritys ja kasvun stimulointi palautuvat (S. Frank *et al.*, Science 249, 174-177 (1990)). Esimerkkejä toiminnallisesta ζ-domeenista ovat molekyylit, jotka sisältävät muriinin aminohapot 28-164 (A.M. Weissman, Science 239, 1018-1021 (1988)) ja aminohapot 28-163 ihmisen ζ-ketjusta (numerointi A.M. Weissmanin ym. mukaan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9709-9713 (1988), kuva 2, joka sisällytetään tähän viitteellä). Otetaan huomioon, että tämän keksinnön tarkoitukseen käytettynä ζ-proteiiniin tarkoitetaan sisältyvän variantit sillä edellytyksellä, että nämä variantit ovat toiminnallisia. Edulliset variantit ovat peräisin nisäkkäästä, erityisesti muriinista tai ihmisestä.

Variantti on esimerkiksi ζ-molekyylin luontaisesti esiintyvä variantti, jota tavataan tietyissä lajeissa. Tällai-

nen variantti saattaa olla saman geeniperheen sukuisen geenin tai tietyn geenin alleelivariantin koodaama. Termiin "variantti" sisältyy myös modifioitu ζ-molekyyli, joka voidaan valmistaa *in vitro* -mutageneesille altistetusta DNA:sta sillä edellytyksellä, että DNA:n koodaamalla proteiinilla on alkuperäisen ζ-molekyylin toiminnallinen aktiivisuus. Tällaiset modifikaatiot voivat koostua additiosta, vaihdosta ja/tai deleetiosta, joista jälkimmäisen tuloksena saadaan lyhennettyjä variantteja.

Keksinnön mukainen edullinen kimeerinen proteiini sisältää proteiinin, jolla on SEKV. ID NO:7:ssä kuvattu aminohapposekvenssi.

Edelleen keksintö koskee polyklonaalista ja monoklonaalista vasta-ainetta, joka sitoutuu spesifisesti keksinnön mukaiseen proteiiniin. Sellainen vasta-aine valmistetaan alalla hyvin tunnettujen tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

Keksinnön mukainen kimeerinen proteiini voidaan valmistaa menetelmällä, joka tunnetaan *per se*, menetelmälle on tunnusomaista, että jäljempänä lähemmin kuvatut sopivat, keksinnön mukaista proteiinia tuottavia isäntäsoluja lisätään *in vitro* tai *in vivo*, ja haluttaessa proteiini eristetään. Edullisesti keksinnön mukainen proteiini tuotetaan menetelmällä, jossa viljellään sopivaa transdusoitua CTL-solua olosuhteissa, jotka mahdollistavat proteiinia koodaavan DNA-rakenteen ilmentämisen, ja valinnaisesti suoritetaan määritys, jolla todetaan proteiinin toiminnallisuus. Vielä keksintö koskee sellaista menetelmää keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin valmistamiseksi, jossa viljellään sopivaa isäntäsolua, erityisesti CTL:ää, joka on transdusoitu sellaisen ekspressiokasetin sisältävällä vektorilla, joka sisältää promoottorin ja mainittua proteiinia koodaavan DNA:n, jota mainittu promoottori säätelee, olosuhteissa, joissa mainittua DNA:ta voidaan ilmentää. Keksinnön

mukainen edullinen kimeerinen proteiini rakennetaan siten, että se sisältää scFV:n, sarana-alueen ja toiminnallisen ζ-molekyylin. Keksinnön mukaisen proteiinin valmistusmenetelmän tulisi tuottaa proteiinia sellaisen määrän, joka riittää transdusoidulle isäntäsolulle kohdesolun hajottamiseen.

Sopivia isäntäsoluja ovat esim. primaariset sytotoksiset T-lymfosyytit ($CD8^+$), $CD4^+$ T-auttajasolut ja luontaiset tappajasolut (NK-solut). Nisäkässolut ovat edullisia, erityisesti nisäkkäästä, etenkin ihmisestä, peräisin oleva CTL.

In vitro tarkoittaa edellä ja jäljempänä *ex vivo*, jolloin siihen kuuluvat soluviljelyolosuhteet.

Esimerkiksi nisäkässolujen lisääminen *in vitro* suoritetaan sopivilla elatusaineilla, jotka ovat tavanomaisia yleisiä viljelyelatusaineita, kuten esimerkiksi Dulbeccon modifioitu Eaglen elatusaine (DMEM) tai RPMI 1640 -elatusaine, joita on valinnaisesti täydennetty nisäkässeerumilla, esim. vasikan sikiön seerumilla, tai hivenaineilla ja kasvua ylläpitävillä täydennysaineilla, esim. hoitajasoluilla (feeder cells).

Keksintö koskee myös yhdistelmä-DNA:ta tai DNA-rakennetta, joka sopii T-lymfosyyttien tunnistusspesifisyyden käsittelyyn. Yksityiskohtaisemmin keksintö koskee DNA-rakennetta, joka pystyy ohjaamaan sellaisen kimeerisen proteiinin synteesiä, joka sisältää tunnistustoiminnon, sarana-alueen ja ζ-ketjun TCR:n viestinsiirtokomponenttina. Erityisesti keksintö koskee DNA-rakennetta, joka koodaa sellaista kimeeristä proteiinia, joka sisältää antigeeninsitojadomeenin, sarana-alueen ja ζ-domeenin, erityisesti DNA-rakennetta, joka sisältää vähintään yhden polynukleotidin, joka koodaa edellä ja jäljempänä edulliseksi määriteltyä proteiiniosaa. Edullisessa järjestyksessä antigeeninsitojado-

meeni on suunniteltu ensimmäiseksi osaksi, sarana-alue toiseksi osaksi ja ζ-ketju kolmanneksi osaksi.

Määritelmän mukaan keksinnön mukaisiin DNA-molekyyleihin kuuluvat yksijuosteiset DNA:t, kaksijuosteiset DNA:t, jotka koostuvat mainituista koodaavista DNA-molekyyleistä ja niiden kanssa komplementaarisista DNA-molekyyleistä, tai itse näistä komplementaarisista (yksijuosteisista) DNA-molekyyleistä.

Edullisesti keksinnön mukainen DNA-rakenne sisältää neljännen osan, joka sijaitsee ylävirtaan ensimmäisestä osasta (antigeeninsitojadomeenista) ja joka koodaa johtopeptidiä. Edullisesti keksinnön mukaisen DNA-rakenteen neljäs osa koodaa immunoglobuliini- (Ig) -geenin johtopeptidiä, esim. Ig:n raskaan ketjun johtopeptidiä. Ig:n raskaan ketjun johtopeptidi edistää muodostuvien polypeptidien kohdistamista solulimakalvoston onteloon; tämän jälkeen se lohkotaan irti ja proteiini järjestetään Golgin ja solukalvon läpi sen solukalvon läpäisevään sijaintikohtaan. Erityisen edullinen on johtopeptidi, jolla on sekvenssi: Met-Ala-Trp-Val-Trp-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Met-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-Pro-Lys.

Sellainen DNA on edullinen, joka sisältää DNA:n, joka koodaa SEKV. ID NO:7:ssä esitetyn aminohapposekvenssin muodostamaa proteiinia, esim. DNA:n, jolla on SEKV. ID NO:5:ssä esitetty nukleotidisekvenssi. SEKV. ID NO:7:ssä esitetyllä DNA-sekvenssillä on seuraavat ominaispiirteet: sekvenssin kuvaus: 5'-EcoRI-IgH-ketjun johto-D6/12-scFv-(FRP5):Lyt-2-sarana:-CD3-zeta-(kalvon läpäisevä (TM)) ja soluliman (Cyt))-EcoRI-3'

5'EcoRI-kohta:	sijainti 1
3'RcoRI-kohta:	sijainti 1474
ATG-aloitus	sijainti 40
TAA-lopetus	sijainti 1423
IGH-ketjun johto	sijainti 40-93

scFv(FRP5)	sijainti 94-819
lyt-2 saranainsertti	XbaI (sijainti 819) - XbaI (sijainti 1005)
zeta-insertti	XbaI (sijainti 1005) - EcoRI (sijainti 1474)

Nykyisen tekniikan tasolla alan asiantuntija kykenee syntetisoimaan keksinnön mukaisen DNA-molekyylin, kun tunnetaan tässä annetut kirjalliset tiedot. Sopivia menetelmiä keksinnön mukaisen DNA-rakenteen saamiseksi ovat alalla hyvin tunnetut menetelmät, joissa esim. syntetisoidaan useita oligonukleotideja, monistetaan spesifisiä geenisekvenssejä, esim. PCR:ää (polymeraasiketjureaktiota) käyttämällä, silmukoidaan ne halutun DNA-sekvenssin saamiseksi ja/tai käytetään DNA-restriktioentsyymejä ja ligaaseja. Keksinnön mukainen DNA voidaan syntetisoida yhdistämällä kemialliset ja yhdistelmämenetelmät.

Edelleen keksintö koskee vektoria, kuten retrovirusvektoria, joka sisältää keksinnön mukaisen DNA-rakenteen.

Lisäksi keksintö koskee geneettisesti muokattua transdusoitua CTL:ää, joka kykenee tuhoamaan kohteena olevia kasvainsoluja MHC:stä riippumatta ja MHC:n rajoittamatta. Keksinnön mukaan CTL tuottaa edellä identifioidun keksinnön mukaisen kimeerisen proteiinin. CTL transdusoidaan keksinnön mukaisella DNA:lla, minkä vuoksi se kykenee ilmentämään mainittua DNA:ta ja tuottamaan mainitun DNA:n koodaamaa proteiinia. Kohteena olevien kasvainsolujen tuhoamisen edellytyksenä on, että näin tuotettu proteiini on toiminnallinen, so. mainitun proteiinin antigeeninsitojadomeenin on kyettävä tunnistamaan ja sitoutumaan kohteena oleviin kasvainsoluihin ja ζ-domeenin on kyettävä laukaisemaan haluttu viesti CTL:ssä. Keksinnön mukaista CTL:ää viljellään olosuhteissa, jotka mahdollistavat (suosivat) sisään viedyn DNA:n ilmentämistä, ja haluttaessa sen tuo-

tanto määritetään. Mainitun DNA:n pitkäaikainen ja kohonnut ilmentyminen on edullista.

Lisäksi keksintö koskee menetelmää CTL:n varustamiseksi tarkasti määrätyllä kasvainsoluspesifisyydellä, joka on MHC:stä riippumatonta ja jota MHC ei rajoita, viemällä sisään mainittuun T-lymfosyyttiin DNA-rakenne, joka sisältää tunnistustoiminnon, välikedomeenin ja ζ-ketjun TCR:n viestinsiirtokomponenttina. DNA-rakenne voidaan panna CTL-soluun DNA:n siirtomenetelmillä, jotka ovat alan asiantuntijalle selviä, esim. vektorijärjestelmällä, kuten virus- tai muulla kuin virusvektorijärjestelmällä. Sopivia virusvektoreita ovat retrovirus-, adenovirus- ja adenovirukseen liittyvät virusvektorit. Menetelmä soveltuu sekä *in vivo* että *in vitro* -tilanteisiin. *In vitro* -sovellus on edullinen.

T-lymfosyyttiä viljellään tavanomaisissa olosuhteissa, joissa mainitun DNA-rakenteen ilmentyminen on mahdollista, ja sen tuotanto määritetään. Mainitun DNA:n pitkäaikainen ja kohonnut ilmentyminen on edullista. Edullisesti CTL:ää viljellään IL-2:n läsnäollessa. Keksinnön mukainen transdusoitu CTL voidaan valikoida sopivan markkerin suhteen. Esimerkiksi transdusoitu CTL voidaan valikoida yhdessä transdusoidun neoresistenssimarkkerin perusteella, jos keksinnön mukainen DNA-rakenne siirretään retrovirusvektorin kautta.

Lisäksi keksintö koskee sellaista ainekoostumusta, joka sisältää keksinnön mukaisen transdusoidun CTL:n. Sellainen koostumus sisältää esim. transdusoituja CTL-soluja, jotka tuottavat keksinnön mukaista proteiinia yhdessä tai seoksena sopivan, esim. farmaseuttisesti hyväksyttävän, kantajan kanssa. Sellainen kantaja voi olla kiinteä tai nestemäinen kantaja. Koostumusta voidaan käyttää *ex vivo*, esim. tuhoamaan potilaan kehosta otetussa koostumuksessa (esimerkiksi ruumiinnesteessä tai kudoksessa) olevia ennalta

valikoituja kohdesoluja. Kohdesolujen tuhoamisen jälkeen (mikä on tarkastettava) koostumus pannaan uudelleen potilaan kehoon. Keksinnön mukaista koostumusta voidaan näin ollen käyttää kasvainten hoitoon tai apuaineena kasvainten hoitoon.

Lisäksi keksintö koskee menetelmää valikoitujen kasvainsolujen hajottamiseksi, jossa menetelmässä mainitut kasvainsolut saatetaan yhteyteen keksinnön mukaista kimeeristä proteiinia tuottavien CTL-solujen kanssa. Sekä *in vitro* että *in vivo* -tilanteisiin käyttökelpoisessa menetelmässä kasvainsolu on antigeeninsitojadomeenin, joka on osa keksinnön mukaista kimeeristä proteiinia, kohteena.

On edullista käyttää isännän omia CTL-soluja, erityisesti silloin kun altistus ja interaktio tapahtuvat *in vivo*, mutta tarpeen mukaan CTL voi olla peräisin myös muista lähteistä. Muita lähteitä ovat esim. kudosviljelmä tai saman tai eri lajin toinen nisäkäsyksilö.

CTL-soluja esiintyy kaikkialla nisäkkään ruumiissa: kudoksissa, lymfaattisessa järjestelmässä ja veressä. Nisäkkäästä valikoidaan ja otetaan sopivat CTL:t. Esimerkiksi CTL:ien valikoidaan olevan $CD8^+$ periferaalisia lymfosyyttejä, joita on viljelty *in vitro* IL-2:n läsnäollessa. Vaihtoehtoisesti geenin transduktioon käytetään valikoimattomia periferaalisia lymfosyyttejä. Haluttaessa isäntää voidaan käsitellä siten, että stimuloitujen CTL:ien määrä lisääntyy.

Vielä keksintö koskee keksinnön mukaisten geenimuokattujen CTL-solujen käyttöä syövän hoitamiseksi tarkoitettujen lääkkeiden valmistamiseksi. Menetelmässä altistetaan valikoidut kasvainsolut CTL-soluille, jotka tuottavat keksinnön mukaista kimeeristä proteiinia. Tämän menetelmän *in vitro* (tarkoittaa *ex vivo*) -sovellus CTL-välitteisen solunhajotuksen edistämiseksi voi olla sellaisten kasvainsolujen valikoiva käsittely, jotka ovat peräisin syöpä-

hoitoa tarvitsevasta nisäkkäästä, erityisesti ihmisestä. Esimerkki olisi keksinnön mukaisen CTL:n käyttö kasvainsolujen eliminoimiseen luuytimestä, joka on otettu potilaasta, esimerkiksi sädehoitoa saavasta potilaasta, ennen kuin luuydin pannaan takaisin. Kasvainsolut hajoavat kasvainsolujen ja keksinnön mukaisten CTL-solujen vuorovaikutuksen seurauksena. Otetaan myös huomioon, että keksinnön mukaista DNA:ta ilmentävät CTL:t tuotetaan DNA:n transduktiolla *in vivo*, esim. syövän hoitoa tarvitsevaan nisäkkääseen.

Erityisesti keksintö koskee esimerkeissä kuvattuja spesifisiä suoritustapoja (esim. proteiinia, DNA:ta, CTL:ää ja niiden valmistusmenetelmiä). Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä, mutta eivät missään määrin rajoita sitä.

Lyhenteet: FCS: vasikan sikiön seerumi; LDH: laktaattidehydrogenaasi; mAb: monoklonaalinen vasta-aine; MoMLV: Moloneyn muriinin leukemiavirus; MoMLV-LTR: Moloneyn muriinin leukemiaviruksen pitkä terminaalinen toisto, scFv: yksiketjuinen vasta-aine; SDS-PAGE: natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi.

Aineisto ja menetelmät

Solulinjat ja viljelyolosuhteet

Klooni 96 (Cl96) on H-2K^d-rajoitteinen sytotoksinen T-solulinja, joka on peräisin C57BL/6-hiiristä (K. Eichmann *et al.*, J. Immunol. 147, 2075-2081 (1991)). Cl96:tta ja infektantteja ylläpidetään Dulbeccon modifioidussa Eaglen elatusaineessa (DMEM, Gibco), johon on lisätty 10 % FCS:ää (Boehringer), 5 x 10^{-5} M 2-merkaptoetanolia, 10 mM HEPES-reagenssia, 2 mM L-glutamiinia ja 3 % vakioitua supernatanttia, joka on saatu X63Ag8-653-plastosytoomasoluista, jotka on transfektoitu muriinin Il-2:n cDNA:lla (H. Karasuyama ja F. Melchers, Eur. J. Immunol. 18, 97-104 (1988)). Ihmisen leukeemista T-solulinjaa Jurkat, retroviruksen pakkauskykyisiä solulinjoja ΩE (J.P. Morgenstern ja

H. Land, Nuc. Acids Res. 18, 3587-3596 (1990)) ja P317:ää (A.D. Miller ja G.J. Rosman, Biotechniques 7, 980-990 (1989)) sekä infektantteja ja aktivoidulla ihmisen erbB-2-reseptorilla transfektoitua muriinin fibroblastisolulinjaa, NIH3T3#3.7:ää, viljellään DMEM:ssä, johon on lisätty 10 % FCS-reagenssia. HC11R1#11 on hiiren nisäepiteelisolulinja, joka on transfektoitu ihmisen erbB-2-proto-onkogeenillä (N. E. Hynes *et al.*, Mol. Cell. Biol. 10, 4027-4034 (1990)). Tätä solulinjaa kasvatetaan RPMI 1640:ssä (Gibco), johon on lisätty 10 % FCS:ää, 10 ng/ml epidermaalista kasvutekijää ja 5 µg/ml insuliinia.

Esimerkki 1: scFv(FRP5):sarana:zeta(ζ):n cDNA:n konstruointi

Konstruoidaan DNA, joka koostuu tunnistustoiminnosta, välikedomeenista ja ζ-ketjusta, joka toimii TCR/CD3-reseptorikompleksin viestityskomponenttina. Tunnistustoiminnosta vastaa scFv-domeeni. Tämä domeeni on peräisin monoklonaalisesta vasta-aineesta FRP5 (EP-patenttihakemus 502 812). FRP5 on spesifinen erbB-2-reseptorin solunulkoiselle domeenille. scFv (FRP5) sisältää monoklonaalisen vasta-aineen (mAb) raskaan ja kevyen ketjun muuntelevat domeenit (V_H ja V_L), jotka 15 aminohapon kytkysekvenssi (SEKV. ID NO:2) liittää yhteen. Tämä scFv-domeeni kykenee tunnistamaan erbB-2-reseptorin solunulkoisen domeenin (W. Wels *et al.*, Biotechnology 10, 1128-1132 (1992); W Wels *et al.*, Cancer Res. 15, 6310-6317 (1992)). Immunoglobuliinin raskaasta ketjusta oleva johtosekvenssi lisätään scFv-domeenin N-terminaaliin. scFv(FRP5):n cDNA liitetään lyhyeeseen kytkytsekvenssiin, joka koodaa 59 aminohappoa CD8α-geenin immunoglobuliinin kaltaisesta sarana-alueesta (R. Zomoyska *et al.*, Cell 43, 153-163 (1985)). Solukalvon läpäisevä ja viestitysdomeeni kuuluvat TCR:n ζ-ketjulle. Tämä ketju vastaa TCR:n aktivoinnin jälkeisestä viestin välityksestä.

Sellaista yksiketjuista vasta-ainetta FRP5 koodaava cDNA, joka on spesifinen erbB-2-molekyylin solunulkoiselle do-

meenille (SEKV. ID NO:1), subkloonataan plasmidiin, joka sisältää immunoglobuliinin raskaan ketjun johtoalueen (L_{IgH}). Sekä ζ:n cDNA että CD8α-sarana:n cDNA on saatu sytotoksisen T-solulinjan Cl96 kokonais-RNA:sta käyttämällä käänteisen transkription ja polymeraasiketjureaktion yhdistelmää (RT-PCR). MoMLV-käänteistranskriptaasia käytetään ensimmäisen juosteen cDNA-synteesiin. Reaktioissa ovat alukkeina 3' ζ-spesifinen oligonukleotidi 5813 (SEKV. ID NO:6) tai vastaavasti 3' CD8α-spesifinen oligonukleotidi 8764 (SEKV. ID NO:7). Näitä cDNA-molekyylejä käytetään PCR-templaatteina ζ-alukeparilla 5812/5813 (SEKV. ID NO:t 8 ja 6), jotka tuovat käyttöön 5'XbaI- ja 3'HindIII/BglII-kohdan, ja CD8α-sarana-alukeparilla 8763/8764 (SEKV. ID NO:t 10 ja 8), jotka tuovat XbaI-kohdan molempiin päihin. L_{IGH}-scFv(FRP5):n DNA liitetään ζ:n cDNA:han aloittamalla aminohappotähteestä 28 (numerointi on A.M. Weissmanin ym. mukainen, Science 239, 1018-1021 (1988)) käyttämällä fuusioon XbaI-kohtaa. Tämän jälkeen CD8α-saranan cDNA, joka koodaa aminohappotähteitä 105-164 (numerointi R. Zomoyskan ym. mukaan, Cell 43, 153-163 (1985)), insertoidaan XbaI-kohtaan ja sen oikea orientaatio tarkastetaan. Tuloksena saatu scFv:sarana:ζ:n cDNA-rakenne (SEKV. ID NO:7) varmistetaan täydellisellä DNA-sekvensoinnilla ja lopuksi se subkloonataan pLXSN-retrovirusvektorin ainoaan EcoRI-kohtaan (A.D. Miller ja G.J. Rosman, *supra*), jolloin saadaan pL(scFv(FRP5):sarana:ζ)SN-rakenne. DNA:n ilmentymistä säätelee 5' MoMLV-LTR. Plasmidissa on lisäksi neomysiiniresistenssin valintamarkkeri, jota ohjaa SV40:n aikainen promoottori (SN).

pL(scFv:D3/D4:ζ)SN:n kloonaus

Kun ensimmäinen molekyylirakenne sisältää välikkeenä suhteellisen lyhyen ja joustavan muriinin Lyt-2:n tai CD8α-molekyylin immunoglobuliinin kaltaisen sarana-alueen, toinen rakenne sisältää pidempänä ja jäykempänä välikkeenä kaksi kalvoproksimaalista immunoglobuliinin kaltaista muriinin L3T4- tai CD4-molekyylin domeenia, joita kutsutaan

D3:ksi ja D4:ksi (S.J. Clark *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1649-1653 (1987)). D3/D4:ää koodaava cDNA saadaan PCR:llä käyttämällä pcd-L3T4 4,25 -plasmidi-DNA:ta (D.R. Littman ja S.N. Gettner, Nature 325, 453-455 (1987)-). Spesifinen alukepari #8761/#8762 monistaa CD4-molekyylin aminohappotähteitä 184-370 koodaavat sekvenssit (P.J. Maddon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9155-9159 (1987)) tuoden molempiin cDNA-päihin XbaI-restriktiokohdat. Tuote subkloonataan pL(FZ)SN-vektorin XbaI-kohtaan. Sen jälkeen, kun insertin oikea orientaatio on tarkastettu, tuloksena saadun sekvenssin identiteetti varmistetaan DNA-sekvensoinnilla. pL(F4Z)SN:n rakenne esitetään kuvassa 1.

Alukkeet L3T4/CD4D3/D4:n cDNA:n monistamiseen:
'Ylävirtaan' -5'Lyt-2/CD8-spesifinen oligonukleotidi #8761[1)]:
#8761: 5'-AGCTTCTAGAGTTTCAGAGCACAGCTCTCACGGCC-3'

'Alavirtaan' -3'Lyt-2/CD8-spesifinen oligonukleotidi #8762[1)]:
#8762: 5'-TCGATCTAGAGTCTGGTTCACCCCTCTGG-3'

[1)]XbaI-restriktiokohdat on alleviivattu.

Esimerkki 2: scFv(FRP5):sarana:ζ:n DNA:n ilmentäminen retrovirusgeenisiirron jälkeen

pLXSN-vektorijärjestelmä kykenee ohjaamaan scFv(FRP5):sarana:ζ:n DNA:n tehokasta synteesiä sen jälkeen, kun se on transduktiolla siirretty sytotoksisiin T-soluihin, ja se mahdollistaa infektoitujen solujen G418-valikoinnin. Pysyvä muriinin CTL-linja, C196, tartutetaan esimerkin 1 pL-(scFv(FRP5):sarana:ζ)SN-rakenteella.

Ekotrooppinen pakkauskykyinen solulinja ΩE transfektoidaan kalsiumfosfaattisaostuksella pL(scFv(FRP5):sarana:ζ)SN-plasmidi-DNA:lla. Transfektoidut solut valikoidaan pysyvästi neomysiinianalogin G418 (Geniticin, 1 mg/ml, Gibco) läsnäollessa. Virussupernatantit otetaan talteen 48 tunnin kuluttua G418-resistenttien auttajasolujen yhteenkasautumasta ja niitä käytetään infektoimaan amfotrooppinen pakkauskykyinen solulinja PA317 8 mg/ml:n polybreeniä läsnäollessa. Klonaaliset, korkean titterin tuottajalinjat saadaan valikoimalla elatusaineessa, joka sisältää 1,0 mg/ml G418:aa. Näiden tuottajalinjojen supernatantteja käytetään infektoimaan C196-solut. Infektoitujen solujen kloonit, jotka on valittu scFv(FRP5):sarana:ζ:n DNA:n runsaan ilmentymisen perusteella, otetaan ja määritetään kimeeristen solun pintaproteiinien tuotantoa varten (esimerkki 3). Klooni CFYZ.1 saadaan kasvun perusteella 1,0 mg/ml:ssa G418:aa. Jurkat-solut infektoidaan käyttämällä samaa menetelmää, klooni JFYZ.4 saadaan kasvun perusteella G418:n pitoisuudessa 2,0 mg/ml.

Esimerkki 3: Solun pintaproteiinien biokemiallinen karakterisointi

a) Transdusoidulla CTL:llä tuotettujen kimeeristen scFv-(FRP5):sarana:ζ-proteiinien SDS-PAGE-analyysi

Esimerkin 2 valikoitujen kloonien solunpinta biotinoidaan, ne hajotetaan ja immunosaostetaan anti-ζ-mAb:llä. Pinnan

biotinointia varten 3 x 10^7 elävää solua pestään kolme kertaa biwa-puskurissa (PBS, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $CaCl_2$) ja resuspendoidaan 1,5 ml:aan Sulfo-NHS-biotiinia biwa-puskurissa (Pierce, 0,5 mg/ml). Sen jälkeen, kun on inkuboitu 15 minuutin ajan 4 °C:ssa, reaktio sammutetaan lisäämällä 25 mM L-lysiiniä biwa-puskurissa. Solut pestään kolme kertaa sammutuspuskurissa (25 mM L-lysiiniä biwa-puskurissa) ja hajotetaan puskurissa, joka sisältää 1 % NP-40:tä, 150 mM NaCl:ia, 50 mM Tris/HCl:ää pH 8,0, 5 mM EDTA:ta, 1 mM PMSF:ää, ja johon on lisätty proteaasi-inhibiittoriseos. Postnukleaarisia lysaatteja esipuhdistetaan yli yön Protein A Sepharosella (Pharmacia). Immuunisaostus tehdään lisäämällä 3 mg ζ-spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta H146-968, joka tunnistaa ihmisen ja hiiren ζ-ketjun COOH-pään, sitten inkuboidaan 3 tunnin ajan, minkä jälkeen inkuboidaan 1 tunnin ajan Protein A Sepharosella. Sakka pestään neljä kertaa NET-TON-liuoksessa (650 mM NaCl:ia, 5 mM EDTA:ta, 50 mM Tris/HCl:ää, 0,5 % Triton X-100:aa, 1 mg/ml ovalbumiinia). Deglykosylaatiota varten sakat denaturoidaan 5%:isessa SDS:ssä joko 10%:isen 2-merkaptoetanolin kanssa tai ilman 100 °C:ssa ja inkuboidaan 2000 U:n kanssa PNGase F:ää (Biolabs) 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. Näytteitä keitetään joko ei-pelkistävässä tai pelkistävässä Laemmli-näytepuskurissa ja niille tehdään elektroforeesi 5-20%:isilla SDS-PAGE-gradienttigeeleillä. Proteiinit siirretään PVDF-kalvolle (Millipore) ja blokataan PBS-T:ssä (PBS, 0,4 % Tween-20:tä), joka sisältää 5 % kuorittua maitojauhetta (Fluka). Kalvoa inkuboidaan yhden tunnin ajan PBS-T:n kanssa, joka sisältää piparjuuriperoksidaasi-streptavidiinia (HRP-Strep, Southern Biotechnology, 1 : 5000). Sen jälkeen, kun kalvoa on pesty neljä kertaa 7 minuutin ajan PBS-T:ssä, täplä kehitetään käyttämällä ECL-kemoluminesenssireagenssia (Amersham). Pelkistävissä olosuhteissa tehty immuunisakkojen SDS-PAGE-analyysi paljastaa sarjan vyöhykkeitä, joiden ilmeinen molekyylipaino on noin 48-65 kDa, infektoitujen solujen lysaateista (klooni CFYZ.1), mutta ei parentaalisolujen (C196-soluja) lysaateista.

Kooltaan 48 kDa:n vyöhyke vastaa scFv(FRP5):sarana:ζ-proteiinia, jonka laskennallinen molekyylipaino on 48,7 kDa. Mainitun proteiinin aminohapposekvenssi esitetään SEKV. ID NO:5:ssä. Mainitussa sekvenssiluettelossa monoklonaalisesta vasta-aineesta FRP5 saatu tunnistusosa ulottuu aminohaposta asemassa 6 (Gln) aminohappoon asemassa 240 (Ile), CD8α:sta saatu sarana-alue ulottuu aminohaposta asemassa 245 (Ile) aminohappoon asemassa 304 (Phe), ja ζ-ketju ulottuu aminohaposta asemassa 307 (Asp) aminohappoon asemassa 443 (Arg). Suurmolekyylipainoisia lajeja ilmestyy scFv:n ja sarana-alueen kompleksiglykosylaation seurauksena. Endoglykosidaasi PNGase F:llä suoritetun deglykosylaation seurauksena saadaan yksinkertainen proteiinimalli ja ilmeinen molekyylipaino alenee noin 47 kDa:iin. Endogeeninen ζ-ketju todetaan 16 kDa:n vyöhykkeenä (ennustettu 16,3 kDa) infektoimattomissa ja infektoiduissa soluissa. Kun SDS-PAGE-analyysi suoritetaan ei-pelkistävissä olosuhteissa, havaitaan sekä disulfisidoksiset scFv:sarana:ζ-homodimeerit, joiden ilmeinen molekyylipaino on noin 96 kDa, että scFv(FRP5):sarana:ζ-molekyylien heterodimeerit, joissa on endogeeninen ζ ja joiden ilmeinen molekyylipaino on noin 64 kDa. PNGase F -käsittely alentaa hieman näiden kahden vyöhykkeen molekyylipainoja. Todettu 32 kDa:n vyöhyke vastaa CTL:n endogeenisiä ζ-ζ-homodimeerejä.

b) scFv(FRP5):sarana:ζ-proteiinia tuottavien T-solujen virtaussytometrinen analyysi

scFv(FRP5):sarana:ζ-proteiinin solun pinnan ilmentyminen ja erbB-2-reseptorin sidosaffiniteetti transdusoiduissa Cl96 CTL-soluissa ja transdusoiduissa Jurkat-soluissa varmistetaan virtaussytometrialla.

Yksisolususpensiot, joissa on 5 x 10^5 elävää solua (Jurkat-soluja, JFYZ.4-soluja, Cl96-soluja, CFYZ.1-soluja), värjätään erbB-2-proteiinin puhdistetun solunulkoisen domeenin kanssa (erbB-2^{ecd}, ilmennetään Sf9-hyönteissoluissa käyttämällä bakulovirusilmentymisvektoria; Disis *et al.*,

Cancer Res. 54, 16-20 (1994)) yhden tunnin ajan, ja sen jälkeen FITC-konjugoidun anti-erbB-2 monoklonaalisen vasta-aineen FSP77 (EP-patenttihakemus 502 812) kanssa 45 minuutin ajan 4 °C:ssa 100 µl:ssa PBS:ää, joka sisältää 1 % BSA:ta ja 0,1 % natriumatsidia. Myös FSP77 on spesifinen erbB-2-reseptorin solunulkoiselle domeenille, mutta se tunnistaa eri epitoopin mAb FRP5:stä (I.M. Harwerth *et al.*, J. Biol. Chem. 21, 15160-15167 (1992)). Saadaan 10 000 eteenpäin sironta/sivusironta -valikoivaa (gated) elävää solua ja analysoidaan virtaussytometrialla, joka paljastaa puhdistetun, liukoisen erbB-2-reseptorin solunulkoisen domeenin sitoutumisen transdusoituihin T-soluihin JFYZ.4 ja CFYZ.1, mutta ei infektoimattomiin Jurkat- tai C196-soluihin.

Sarana-alue antaa scFv-osalle joustavuuden ja saavutettavuuden ja se on välttämätön edellytys erbB-2-reseptorin solunulkoisen domeenin sitoutumiselle scFv-domeeniin. Myös CD4:n D3D4:n insertio mahdollistaa sitoutumisen. Sellainen rakenne, jossa tutkitaan scFv-domeenin suoraa fuusiota ζ-ketjuun, ilman sarana-aluetta tai välikettä, johtaa sellaiseen pintareseptoriin, joka ei voi sitoutua erbB-2-proteiiniin.

Esimerkki 4: scFv(FRP5):sarana:ζ-fuusioproteiinin viestin välitys

T-solujen, joihin on pantu sopivaa kalsiumia kelatoivaa fluoresoivaa väriainetta, solunsisäinen kalsium- (Ca^{2+})-konsentraatio mitataan sen jälkeen, kun soluja on inkuboitu liukoisen erbB-2-reseptorin kanssa. Tätä tarkoitusta varten viljellyt JFYZ.4-infektantit ja Jurkat-solut suspendoidaan 1 x 10^7/ml RPMI 1640:aan, johon on lisätty 2 % FCS:ää ja 5 mM Indo-1/AM:ää (Calbiochem) (M. Lopez *et al.*, Cytometry 10, 165-173 (1989)), ja pyöritetään 45 minuutin ajan 37 °C:ssa. Kahden pesukerran jälkeen 3 x 10^5 solua inkuboidaan jäillä 2 mg:n kanssa puhdistettua erbB-2^{ecd}:ta. Reaktio pannaan alkuun 37 °C:ssa lisäämällä yhtäaikaa 5 mg

anti-erbB2 mAb FSP77:ää, mitä seuraa ristisitoutuminen vuohen anti-hiiri-Ig-antiseerumin (GαM Ig, Southern Biotechnology) kanssa. Kontrollina solut laukaistaan lisäämällä anti-ihmis-CD3ϵ mAb:tä (Serva) ja GαM Ig:tä. Kalsiumvirtaa seurataan 15 minuutin ajan virtaussytometrillä mittaamalla emissio 405 ja 525 nm:ssä.

Ristisitoutuminen johtaa nopeaan solunsisäisen kalsiumin lisääntymiseen JFCZ.4-soluissa, mutta ei parentaalisissa Jurkat-soluissa, mikä on verrattavissa tulokseen, joka saatiin CD3-kompleksin ristisitoutumisella anti-CD3ϵ mAb:n kanssa infektoimattomissa soluissa. Tämä osoittaa sen, että solunsisäinen viestinvälitys sysätään alkuun scFv(FRP-5):sarana:ζ-proteiinin ristisitoutumisen jälkeen solunulkoisen ligandidomeenin kautta, ja että scFv(FRP5):sarana:ζ-proteiini on toiminnallisesti aktiivinen.

Esimerkki 5: *In vitro* -sytotoksisuusmääritys

Infektoitujen C196- (CFYZ.1) -solujen sytolyyttinen aktiivisuus määritetään *in vitro*. Kohdesoluina käytetään onkogeenisesti transformoituja hiiren NIH/3T3-fibroblasteja ja HC11-epiteelisoluja, jotka ilmentävät ihmisen erbB-2-reseptoria (N.E. Hynes *et al., supra*). Solun hajoamisen mittana käytetään LDH:n vapautumista näistä soluista (T. Decker ja M.L. Lohmann-Matthes, J. Immunol. Methods 115, 61-69 (1988)).

Sytotoksisuusmääritys suoritetaan phenol red free -alustalla, johon on lisätty 4 % vakioitua supernatanttia, joka sisältää yhdistelmä-muriini-Il-2:ta (rmIl-2, recombinant murine Il-2, katso edellä). Kohdesoluja lisätään vakiomäärä (7500/kolo) efektorien (CFYZ.1-soluja) 2-kertaiseen sarjalaimennokseen, mitä seuraa kahdeksan tunnin inkubointi 37 °C:ssa ja 5%:isessa CO_2:ssa. Kaikki laimennokset suoritetaan kolmena kappaleena. LDH-pitoisuus määritetään supernatantin 50 µl:n erästä käyttämällä CytoTox 96 -määritystä (Promega) (T. Decker ja M.L. Lohmann-Matthes, *sup-*

ra). LDH-aktiivisuutta, joka on mitattu kohdesolujen hajoamisen jälkeen 0,4%:isella Triton X-100:lla, pidetään 100 %:na. Mitatut kokeelliset arvot korjataan efektori- ja kohdesoluista tapahtuvan spontaanin LDH-vapautumisen suhteen. Infektoidut C196-solut, jotka ilmentävät scFv(FRP-5):sarana:ζ-rakennetta, hajottavat tehokkaasti erbB-2:ta ilmentävät NIH/3T3-solut tai HC11-solut efektori- ja kohdesolujen 1 ja 10 välisessä suhteessa. Ihmisen erbB-2-reseptorilla transfektoitujen epiteeli- ja fibroblastikohdesolujen hajoaminen tapahtuu MHC:n rajoittamattomalla tavalla, joka ei ole erotettavissa normaalista antigeenispesifisestä solun sytotoksisuudesta. Sitä vastoin solun hajoamista ei havaita silloin, kun efektoreina käytetään parentaalisia C196-soluja. Monoklonaalinen vasta-aine FRP5 ja siitä saatu scFv-domeeni ovat spesifisiä ihmisen erbB-2-molekyylille, eivätkä ne tunnista hiiren homologia, jota ilmennetään matalalla tasolla molemmissa solulinjoissa. Tämän vuoksi solun hajoamista ei havaita, kun transfektoimattomia NIH/3T3-soluja tai HC11-soluja inkuboidaan sellaisten T-solujen kanssa, jotka ilmentävät scFv(FRP5):sarana:ζ-rakennetta.

Esimerkki 6: Kasvaimen vastainen aktiivisuus *in vivo*

Transdusoitujen CTL-solujen (infektoituja C196-soluja) kasvaimen vastaisen aktiivisuuden määrittämiseen *in vivo* käytetään kahta koejärjestelyä. Ensimmäisessä järjestelyssä 5×10^5 NIH3T3#3.7-kasvainsolua sekoitetaan 5×10^6 kanssa CFYZ.1-soluja tai parentaalisia C196-soluja (efektorin suhde kohteeseen 1:10) 0,1 ml:ssa elatusainetta, ja heti sen jälkeen seos injektoidaan ihon alle (s.c.) paljaiden (nude) Balb/c-hiirien oikeaan kylkeen (H.J. Winn, J. Immunol. 86, 228-234 (1961)). Kasvainten kasvua seurataan kaliiperimittauksin. Kontrollina injektoidaan pelkästään NIH3T3#3.7-kasvainsoluja. Jokainen ryhmä koostuu viidestä eläimestä. Toisessa järjestelyssä paljaiden Balb/c-hiirien oikeaan kylkeen pannaan s.c. 4×10^5 NIH3T3#3.7-

kasvainsoluja. Neljäntenä ja viidentenä päivänä, kun kasvain on käsin tuntuva, parentaalisia C196-soluja ja CFYZ-.1-soluja injektoidaan häntälaskimon sisään (1 x 10^7 solua 0,2 ml:ssa elatusainetta). Intraperitoneaalisesti annetaan 500 U rhIl-2:ta (Hoffman-La Roche) 0,2 ml:ssa PBS:ää neljäntenä, viidentenä ja kuudentena päivänä. Kasvainten kasvua seurataan kaliiperimittauksin. Kontrolleina injektoidaan NIH3T3#3.7-soluja sekä ilman Il-2:ta että sen kanssa. Jokainen ryhmä koostuu viidestä eläimestä. Ihmisen erbB-2-onkogeenillä transformoidut NIH/3T3-solut johtavat nopeaan kasvainten muodostukseen ihonalaisen ruiskeen jälkeen paljaisiin Balb/c-hiiriin, joilta puuttuu kateenkorva (athymic). CFYZ.1-infektanttien ja kasvainsolujen yhtäaikainen anto estää täysin kasvainten muodostumisen 7 päivään asti. Infektoimattomien parentaalisten C196-solujen annolla ei kuitenkaan ole vaikutusta kasvainsolujen kasvuun. Samanlainen tulos saadaan, kun paljaisiin hiiriin pannaan ensin NIH/3T3-erbB-2-kasvainsoluja ja sen jälkeen niitä käsitellään CFYZ.1-soluilla yhdessä eksogeenisen Il-2:n kanssa. Transdusoitujen CTL:ien anto hidastaa selvästi kasvainsolujen kasvua seitsemän päivän aikana, mikä näin osoittaa systeemisen *in vivo* -vaikutuksen. Soluilla on kyky löytää kasvain, aktivoitua ja osoittaa sytolyyttinen aktiivisuutensa eri kohtaan annettuna.

Nämä tulokset osoittavat, että spesifisyys ja näin ollen transdusoitujen CTL:ien sytolyyttinen efektorikoneisto voidaan tehokkaasti suunnata uudelleen ennakolta määritettyä pinta-antigeenia, erbB-2-reseptoria, vastaan, jolla on tärkeä merkitys monien ihmisen adenokarsinoomien, esimerkiksi rinta-, munasarja-, maha- ja koolonsyövän, etiologiassa. Kohdennetun T-soluvaikutuksen periaatetta pidetään siksi käyttökelpoisena terapeuttisena lähestymistapana, ja yleensä sitä voidaan soveltaa sellaisten kasvainsolujen eliminaatioon, jotka ilmentävät pinta-antigeenia korkeampina tasoina kuin normaalit solut. Rakenne sallii sellaisten CTL:ien tuottamisen, joissa on monia haluttuja spesi-

fisyyksiä, vaihtamalla scFv-osa ja korvaamalla se millä tahansa olemassa olevalla antigeenin tunnistustoiminnolla, joka on saatu spesifisestä monoklonaalisesta vasta-aineesta. Tehokkaiden siirtojärjestelmien, esim. retrovirusvektorien, käyttö mahdollistaa scFv:sarana:ζ:n DNA:n siirron solutyyppeihin, joita ei ole helppo transfektoida.

Talletustiedot:

Hybridoomasolulinjat, jotka tuottavat vasta-aineita FRP5, FSP16, FSP77 ja FWP51, on talletettu talletuslaitokseen European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, PHLS Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, UK) 21. marraskuuta, 1990, talletusnumeroilla 90112115, 90112116, 90112117 ja vastaavasti 90112118.

Piirrosten lyhyt kuvaus:

Kuva 1: pL(F4Z)SN-retrovirusvektorin rakenne. cDNA, joka koodaa CD4:n immunoglobuliinin kaltaisten D3- ja D4-domeenien aminohappotähteitä 184-370, saadaan PCR:llä ja subkloonataan PL(FX)SN-vektorin XbaI-kohtaan. Fuusiorajojen aminohapposekvenssit esitetään yksikirjaimisin koodein.

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:
(A) NIMI: CIBA-GEIGY AG
(B) KATU: Klybeckstr. 141
(C) KAUPUNKI: Basel
(E) MAA: SVEITSI
(F) POSTINUMERO (ZIP): 4002
(G) PUHELIN: +41 61 69 11 11
(H) TELEFAX: +41 61 696 79 76
(I) TELEX: 962 991

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Bifunktionaalinen proteiini, valmistus ja käyttö

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 11

(iv) KONEKOODIMUOTO:
(A) VÄLINETYYPPI: Levyke
(B) TIETOKONE: IBM PC-yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn julkaisulupa #1.0, versio #1.25 (EPO)

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 748 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(ix) OMINAISPIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: koodaava sekvenssi
(B) SIJAINTI: 9..728
(D) MUU INFORMAATIO: /tuote= "scFv(FRP)5"

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:1:

```
AAGCTTCT CAG GTA CAA CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAA CTG AAG AAG CCT      50
         Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro
           1               5                  10
```

```
GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCC TCT GGG TAT CCT TTC ACA          98
Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 15                  20                  25                  30

AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA CAG GGT TTA AAG         146
Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys
                 35                  40                  45

TGG ATG GGC TGG ATT AAC ACT TCC ACT GGA GAG TCA ACA TTT GCT GAT         194
Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp
             50                  55                  60

GAC TTC AAG GGA CGG TTT GAC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AAC ACT         242
Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr
         65                  70                  75

GCC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AGT GAA GAC ATG GCT ACA TAT         290
Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr
     80                  85                  90

TTC TGT GCA AGA TGG GAG GTT TAC CAC GGC TAC GTT CCT TAC TGG GGC         338
Phe Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly
 95                  100                 105                 110

CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT GGC         386
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                 115                 120                 125

GGT GGC TCC GGC GGT GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CAC         434
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His
             130                 135                 140

AAA TTC CTG TCC ACT TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG         482
Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys
         145                 150                 155

GCC AGT CAG GAT GTG TAT AAT GCT GTT GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA         530
Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
     160                 165                 170

GGA CAA TCT CCT AAA CTT CTG ATT TAC TCG GCA TCC TCC CGG TAC ACT         578
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr
175                 180                 185                 190

GGA GTC CCT TCT CGC TTC ACT GGC AGT GGC TCT GGG CCG GAT TTC ACT         626
Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr
                 195                 200                 205

TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT         674
Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
             210                 215                 220
```

```
CAG CAA CAT TTT CGT ACT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAA TTG      722
Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
       225                 230                 235

GAG ATC TAGCTGATCA AAGCTCTAGA                                      748
Glu Ile
    240
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 240 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2:

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1               5                  10                  15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe
    130                 135                 140

Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145                 150                 155                 160

Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
                165                 170                 175
```

```
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val
            180                 185                 190

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr
        195                 200                 205

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
    210                 215                 220

His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225                 230                 235                 240
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 748 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleotidi
- (C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(ix) OMINAISPIIRRE:
- (A) NIMI/SELITYS: koodaava sekvenssi
- (B) SIJAINTI: 9..728
- (D) MUU INFORMAATIO: /tuote= "scFv(FWP51)"

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3:

```
AAGCTTCT CAG GTA CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT      50
          Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
            1               5                  10

GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GAT TAC ACC TTC ACC      98
Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr
 15                  20                  25                  30

AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAA     146
Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
                35                  40                  45

TGG ATT GGT ATG ATT GAT CCT TCA GAC AGT GAA ACT CAA TAC AAT CAA     194
Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Gln Tyr Asn Gln
            50                  55                  60

ATG TTC AAG GAC AAG GCC GCA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AAT ACA     242
Met Phe Lys Asp Lys Ala Ala Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr
        65                  70                  75
```

```
GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT      290
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
     80                  85                  90

TAC TGT GCA AAA GGG GGG GCC TCT GGG GAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG      338
Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Ala Ser Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 95                 100                 105                 110

GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT      386
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                115                 120                 125

GGC GGT GGC TCC GGC GGT GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT      434
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
            130                 135                 140

CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT CTG GGA GGC GAA GTC ACC ATC ACT TGC      482
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Gly Glu Val Thr Ile Thr Cys
        145                 150                 155

AAG GCA AGC CAA GAC ATT AAG AAG TAT ATA GCT TGG TAC CAA CAC AAG      530
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys
    160                 165                 170

CCT GGA AAA AGT CCT CGG CTA CTC ATA CAC TAC ACA TCT GTA TTA CAG      578
Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Val Leu Gln
175                 180                 185                 190

CCA GGC ATC CCA TCC AGG TTC AGT GGA AGT GGG TCT GGG AGA GAT TAT      626
Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr
                195                 200                 205

TCC TTC AGC ATC CAC AAC CTG GAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT TAT TAT      674
Ser Phe Ser Ile His Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
            210                 215                 220

TGT CTA CAT TAT GAT TAT CTG TAC ACG TTC GGA GGG GGC ACC AAG CTG      722
Cys Leu His Tyr Asp Tyr Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        225                 230                 235

GAG ATC TAGCTGATCA AAGCTCTAGA                                       748
Glu Ile
    240
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 240 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:4:

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Gln Tyr Asn Gln Met Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Ala Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Gly Gly Ala Ser Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser
    130                 135                 140

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Gly Glu Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala
145                 150                 155                 160

Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Val Leu Gln Pro Gly
            180                 185                 190

Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe
        195                 200                 205

Ser Ile His Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu
    210                 215                 220

His Tyr Asp Tyr Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225                 230                 235                 240
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 1479 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(ix) OMINAISPIIRRE:
(A) NIMI/SELITYS: koodaava sekvenssi
(B) SIJAINTI: 40..1422
(D) MUU INFORMAATIO: /tuote= "johto-scFv(FRP5): lyt-2 sarana:zeta"

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5:

```
GAATTCGGCA CGAGCTTAAG GCACCACTTC TTAGACATC ATG GCT TGG GTG TGG          54
                                            Met Ala Trp Val Trp
                                              1               5

ACC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC AAA GTG CCC AAG CAG ATC CAG        102
Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Lys Val Pro Lys Gln Ile Gln
                  10                  15                  20

TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG        150
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
             25                  30                  35

ATC TCC TGC AAG GCC TCT GGG TAT CCT TTC ACA AAC TAT GGA ATG AAC        198
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
         40                  45                  50

TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA CAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATT        246
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
     55                  60                  65

AAC ACC TCC ACT GGA GAG TCA ACA TTT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG        294
Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
 70                  75                  80                  85

TTT GAC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AAC ACT GCC TAT TTG CAG ATC        342
Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
                  90                  95                 100

AAC AAC CTC AAA AGT GAA GAC ATG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA TGG        390
Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp
             105                 110                 115

GAG GTT TAC CAC GGC TAC GTT CCT TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC        438
Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
         120                 125                 130
```

```
ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT GGC TCC GGC GGT      486
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    135                 140                 145

GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CAC AAA TTC CTG TCC ACT      534
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr
150                 155                 160                 165

TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG      582
Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
                170                 175                 180

TAT AAT GCT GTT GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA      630
Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
            185                 190                 195

CTT CTG ATT TAC TCG GCA TCC TCC CGG TAC ACT GGA GTC CCT TCT CGC      678
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
        200                 205                 210

TTC ACT GGC AGT GGC TCT GGG CCG GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC AGT      726
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
    215                 220                 225

GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAA CAT TTT CGT      774
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Phe Arg
230                 235                 240                 245

ACT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAA TTG GAG ATC AAA GCT CTA      822
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Leu
                250                 255                 260

GAG ATC AGC AAC TCG GTG ATG TAC TTC AGT TCT GTC GTG CCA GTC CTT      870
Glu Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro Val Leu
            265                 270                 275

CAG AAA GTG AAC TCT ACT ACT ACC AAG CCA GTG CTG CGA ACT CCC TCA      918
Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser
        280                 285                 290

CCT GTG CAC CCT ACC GGG ACA TCT CAG CCC CAG AGA CCA GAA GAT TGT      966
Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys
    295                 300                 305

CGG CCC CGT GGC TCA GTG AAG GGG ACC GGA TTG GAC TTT CTA GAG GAT     1014
Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Leu Glu Asp
310                 315                 320                 325

CCC AAA CTC TGC TAC TTG CTA GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAC GGA GTC     1062
Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val
                330                 335                 340
```

```
ATC ATC ACA GCC CTG TAC CTG AGA GCA AAA TTC AGC AGG AGT GCA GAG      1110
Ile Ile Thr Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu
            345                 350                 355

ACT GCT GCC AAC CTG CAG GAC CCC AAC CAG CTC TAC AAT GAG CTC AAT      1158
Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
        360                 365                 370

CTA GGG CGA AGA GAG GAA TAT GAC GTC TTG GAG AAG AAG CGG GCT CGG      1206
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg
    375                 380                 385

GAT CCA GAG ATG GGA GGC AAA CAG CAG AGG AGG AGG AAC CCC CAG GAA      1254
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu
390                 395                 400                 405

GGC GTA TAC AAT GCA CTG CAG AAA GAC AAG ATG GCA GAA GCC TAC AGT      1302
Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
                410                 415                 420

GAG ATC GGC ACA AAA GGC GAG AGG CGG AGA GGC AAG GGG CAC GAT GGC      1350
Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
            425                 430                 435

CTT TAC CAG GGT CTC AGC ACT GCC ACC AAG GAC ACC TAT GAT GCC CTG      1398
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
        440                 445                 450

CAT ATG CAG ACC CTG GCC CCT CGC TAACAGCCAG GGCATTTCTC CCTCACGGGC      1452
His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
    455                 460

AGATCCCCGG GTACCGAGCT CGAATTC                                        1479
```

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 461 aminohappo
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6:

```
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Lys Val
 1               5                  10                  15

Pro Lys Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro
            20                  25                  30

Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
        35                  40                  45
```

```
Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys
     50                  55                  60

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp
 65                  70                  75                  80

Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr
                 85                  90                  95

Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Phe Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly
        115                 120                 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His
145                 150                 155                 160

Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys
                165                 170                 175

Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
            180                 185                 190

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr
        195                 200                 205

Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr
    210                 215                 220

Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240

Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
                245                 250                 255

Glu Ile Lys Ala Leu Glu Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser
            260                 265                 270

Val Val Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val
        275                 280                 285

Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln
    290                 295                 300

Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu
305                 310                 315                 320

Asp Phe Leu Glu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu
                325                 330                 335
```

Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe
340 345 350

Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu
355 360 365

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu
370 375 380

Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg
385 390 395 400

Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met
405 410 415

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
420 425 430

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
435 440 445

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
450 455 460

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 443 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:7:

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe
130 135 140

Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145 150 155 160

Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
165 170 175

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val
180 185 190

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr
195 200 205

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
210 215 220

His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240

Lys Ala Leu Glu Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val
245 250 255

Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg
260 265 270

Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro
275 280 285

Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe
290 295 300

Leu Glu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile
305 310 315 320

Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg
325 330 335

Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn
340 345 350

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys
355 360 365

Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn
370 375 380

Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
385 390 395 400

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
405 410 415

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
420 425 430

Asp Ala Leu His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
435 440

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 41 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:8:

CTGAAAGCTT AGATCTGCCC GTGAGGGAGA AATGCCCTGG C 41

(2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 35 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:9:

TCGATCTAGA AAGTCCAATC CGGTCCCCTT CACTG 35

(2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:10:

GATCTCTAGA GGATCCCAAA CTCTGCTACT TGC 33

(2) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 37 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleotidi
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: cDNA

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:11:

TCGATCTAGA GATCAGCAAC TCGGTGATGT ACTTCAG 37

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Bifunktionaalinen proteiini, joka sisältää:
   1) yksiketjuisen vasta-aineen, joka on saatu sopivaa kasvainsolun antigeenia vastaan suunnatusta monoklonaalisesta vasta-aineesta,
   2) sarana-alueen, joka käsittää noin 40 - noin 200 aminohappoa, ja joka on liitetty yksiketjuisen vasta-aineen V_L-domeeniin, ja
   3) toiminnallisen zeta- (ζ)-ketjun, joka saadaan T-solun antigeenireseptorista (TCR), ja joka on liitetty sarana-alueeseen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen bifunktionaalinen proteiini, **tunnettu** siitä, että sarana-alue on liitetty yksiketjuisen vasta-aineen V_L-domeenin C-terminaaliin.

3. DNA, joka koodaa patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaista bifunktionaalista proteiinia.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA, joka koodaa proteiinia, joka on **tunnettu** siitä, että sarana-alue on immunoglobuliinin kaltainen sarana-alue.

5. Patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukainen DNA, joka koodaa proteiinia, joka on **tunnettu** siitä, että toiminnallinen ζ-ketju sisältää solukalvon läpäisevän ja soluliman domeenin.

6. Isäntäsolu, joka ilmentää jonkin patenttivaatimuksista 3-5 mukaista DNA:ta.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen isäntäsolu, joka on sytotoksinen lymfosyytti (CTL).

8. *In vitro* -menetelmä valikoitujen kasvainsolujen hajottamiseksi, jossa menetelmässä mainitut kasvainsolut saate-

taan kosketukseen patenttivaatimuksen 1 mukaista proteiinia tuottavan CTL:n kanssa.

9. Menetelmä CTL:n varustamiseksi tarkoin määrätyllä, MHC:stä riippumattomalla ja MHC:n rajoittamattomalla kasvainsoluspesifisyydellä, jossa menetelmässä mainittuun CTL:ään viedään patenttivaatimusten 3-5 mukainen DNA.

10. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen proteiinin tuottamiseksi, jossa menetelmässä viljellään patenttivaatimuksen 6 mukaista isäntäsolua olosuhteissa, joissa mainittua proteiinia koodaavan DNA:n ilmentyminen on mahdollista.

11. Ainekoostumus, joka sisältää patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukaisen isäntäsolun.

12. Patenttivaatimuksen 7 mukaisen isäntäsolun käyttö syövän hoitamiseksi tarkoitetun lääkkeen valmistamiseksi.

13. Patenttivaatimuksen 7 mukainen CTL käytettäväksi syövän hoitomenetelmässä.

14. Polyklonaalinen tai monoklonaalinen vasta-aine, joka on spesifinen patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaiselle proteiinille.

15. Vektori, joka sisältää patenttivaatimusten 3-5 mukaisen DNA:n.

PATENTKRAV

1. Bifunktionellt protein, som innehåller:
   1) en enkedjig antikropp som erhållits från en monoklonal antikropp som riktats mot ett lämpligt antigen på en tumörcell,
   2) en gångjärnsregion, som innefattar ca 40 - ca 200 aminosyror, och som anknutits till V_L-domänen av en enkedjig antikropp, och
   3) en funktionell zeta- (ζ)-kedja, som erhålls från en antigenreceptor av en T-cell (TCR), och som anknutits till gångjärnsregionen.

2. Bifunktionellt protein enligt patentkravet 1, **kännetecknat** därav, att gångjärnsregionen har anknutits till C-terminalen av V_L-domänen av den enkedjiga antikroppen.

3. DNA, som kodar för bifunktionellt protein enligt patentkravet 1 eller 2.

4. DNA enligt patentkravet 3, som kodar för ett protein, som är **kännetecknat** därav, att gångjärnsregionen är en immunoglobulin-liknande gångjärnsregion.

5. DNA enligt patentkravet 3 eller 4, som kodar för ett protein, som är **kännetecknat** därav, att den funktionella ζ-kedjan innehåller cellmembrandomänen och cytoplasmiska domänen.

6. Värdcell, som uttrycker DNA enligt något av patentkraven 3-5.

7. Värdcellen enligt patentkravet 6, som är en cytotoxisk lymfocyt (CTL).

8. *In vitro*-förfarande för att lysera valda tumörceller, i vilket förfarande nämnda tumörceller bringas i kontakt med CTL som producerar proteinet enligt patentkravet 1.

9. Förfarande för att utrusta CTL med en noggrant bestämd, MHC-oberoende och MHC-obegränsad tumörcellspecificitet, i vilket förfarande DNA enligt patentkraven 3-5 förs in i nämnda CTL.

10. Förfarande för att producera proteinet enligt patentkravet 1, i vilket förfarande man odlar värdcellen enligt patentkravet 6 i förhållanden, vilka möjliggör uttryckning av DNA som kodar för nämnda protein.

11. Komposition, som innehåller värdcellen enligt patentkravet 6 eller 7.

12. Användning av värdcellen enligt patentkravet 7 för framställning av ett läkemedel avsett för behandling av cancer.

13. CTL enligt patentkravet 7 för användning vid en metod för att behandla cancer.

14. Polyklonal eller monoklonal antikropp, som är specifik mot proteinet enligt patentkravet 1 eller 2.

15. Vektor, som innehåller DNA enligt patentkraven 3-5.

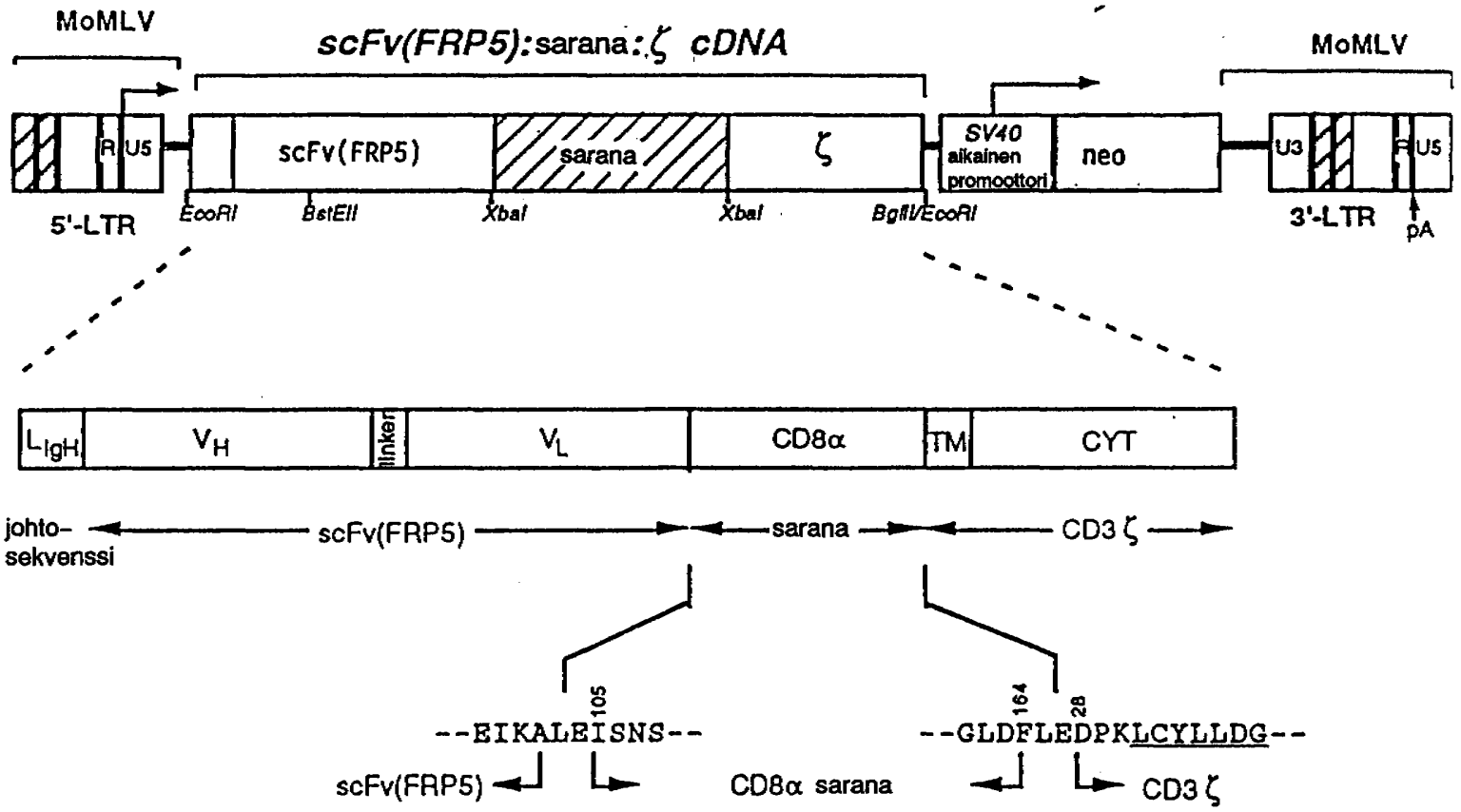

Figure 1 pL(FYZ)SN–retrovirusvektorin rakenne

119191