



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.CI.: C 12 N 15/13 C 12 N 15/10 C 12 P 21/08

(21) Patentansøgning nr: PA 1987 03385

(22) Indleveringsdag: 1987-07-01

(24) Løbedag: 1986-10-27

(41) Alm. tilgængelig: 1987-07-01

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2005-01-17

(86) International ansøgning nr: PCT/US86/02269

(86) International indleveringsdag: 1986-10-27

(85) Videreførelsesdag: 1987-07-01

(30) Prioritet: 1985-11-01 US 793980

(73) Patenthaver: International Genetic Engineering, Inc., 1545 - 17th Street, Santa Monica, CA 90404, USA

(72) Opfinder: Randy R. Robinson, 5606 W. 79th Street, Los Angeles, CA 90045, USA

Alvin Y. Liu, 807 - 8th Street, Apt. 6, Santa Monica, CA 90403, USA

Arnold H. Horwitz, 7529 Midfield Ave, Los Angeles, CA 90045, USA

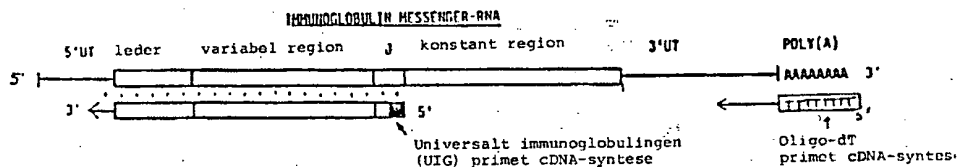
Randolph Wall, 5106 Van Noord, Sherman Oaks, CA 91423, USA

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1780 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Modulsamling af antistofgener, antistoffer fremstillet derved samt anvendelse deraf

(57) Sammendrag:

Kimære immunoglobulinmolekyler fremstilles ved kloning af cDNA-sekvenser, der koder for humane konstante regioner sammen med ikke-humane variable regioner.



Den foreliggende opfindelse angår rekombinant-DNA-metoder til fremstilling af immunoglobuliner, genetiske sekvenser, der koder derfor, såvel som fremgangsmåder til opnåelse af sådanne sekvenser.

5
Anvendelse af celle-til-celle-fusion til fremstilling af monoklone antistoffer ifølge Kohler og Milstein (Nature (London), 256: 495, 1975) har affødt en revolution inden for biologi som med hensyn til betydning svarer til opfindelsen af rekombinant-DNA-kloning. Hybridoma-fremstillede monoklone antistoffer er allerede anvendt i stor udstrækning i kliniske diagnoser og ved grundlæggende videnskabelige studier. Anvendelse af human B-cellehybridomafremstillet monoklone antistoffer er meget lovende for den kliniske behandling af cancer, virale og mikrobielle infektioner, B-celle-immunoforstyrrelser med formindsket antistofproduktion og andre sygdomme og forstyrrelser af immunsystemet.

20
Desværre er udbytter af monoklone antistoffer fra humane hybridomacellelinier forholdsvis lave (1 µg/ml i human x human sammenlignet med 100 µg/ml i musehybridomaer), og produktionsomkostninger er høje for antistoffer fremstillet ved hjælp af human vævskultur i stor målestok. Mus x mus-hybridomaer er på den anden side anvendelige, forbi de fremstiller rigelige mængder af protein, og disse cellelinier er mere stabile end
25
de humane linier. Gentagne injektioner af "fremmede"-antistoffer, såsom museantistof, i mennesker kan imidlertid føre til skadelige hypersensitivitetsreaktioner.

30
Der er derfor foretaget nyere undersøgelser af muligheden for at fremstille antistoffer, der har fordelene ved de monoklone antistoffer fra mus-mus-hybridomaer, men de humane monoklone antistoffers artsspecifikke egenskaber.

35
Et andet problem, som immunologer møder, er, at de fleste humane monoklone antistoffer (dvs. antistoffer med humane genkendelsesegenskaber) opnået i cellekultur er af IgM-typen. Når det er ønskeligt at opnå humane monokloner af IgG-typen, har det imidlertid været nødvendigt at anvende sådan teknik, som

cellesortering, for at skille de få celler, som har skiftet til fremstilling af antistoffer af IgG-typen eller anden type, fra størstedelen, der producerer antistoffer af IgM-typen. Der består derfor et behov for en mere bekvem metode til skift af antistofklasser for et hvilket som helst givet antistof med en forudbestemt eller ønsket antigenspecificitet.

Den foreliggende forbindelse forener både hybridomateknik og monoklon antistofteknik og tilvejebringer en hurtig og effektiv metode, såvel som produkter hidrørende derfra, til forbedret produktion af kimære humane/ikke-humane antistoffer eller af "klaseskiftede" antistoffer.

Forsøg på at løse problemet med at frembringe kimære antistoffer har været beskrevet af forskellige forfattere.

F.eks. beskriver Cabilly et al. i EP-A-125023 konstruktionen af en ekspressionsvektor for en kimær immunoglobulinkæde, der omfatter gentagne trin af fordøjelse med restriktionsendonuklease, oprensning af fragmenter eller udfyldning med Klenow-polymerase og dNTP'er samt limering. Det resulterende plasmid bærer et menneske/muse-hybridgen omfattende en variabel muse-region og en konstant human region.

I GB-A-2137631 beskrives cDNA-kloner, der koder for lette immunoglobulin-lambda-kæder og tunge immunoglobulin- μ -kæder.

Sharon et al., Nature 309: 364 til 367 (24. maj 1984) beskriver ekspresion af kimære antistoffer omfattende V-regionen af en tung musekæde og C-regionen af en let muse- κ -kæde. Konstruktion af genet blev udført under anvendelse af genomiske DNA-fragmenter.

Kudo et al. beskriver i EP-A-184187 (kendt teknik under artikel 54 (3) EPC) konstruktionen af muse-menneske-kimær tung immunoglobulinkæde-DNA, hvilket DNA er isoleret fra genomiske DNA'er fra henholdsvis mus og menneske.

Weissman et al. beskriver i WO86/05513 (dokument under artikel 54 (3) EPC) en plasmidvektor til anvendelse til fremstilling af muse/menneske- κ -kæde-gener.

S.L. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851-6855 (november 1984) beskriver fremstillingen af et muse-human-antistofmolekyle med defineret antigenbindingspecificitet, fremstillet ved at gener for de variable regioner fra
5 en muse-antistof-fremstillende myelomacellelinie med kendt antigenbindingspecificitet forenes med gener for humant immunoglobulins konstante regioner under anvendelse af rekombinant-DNA-teknik. Kimære gener blev konstrueret, hvor den tunge kædes variable regionexon fra myelomacellelinien S107 knyttedes
10 godt til konstante regionexoner i humant IgG1's eller IgG2's tunge kæde, og hvor den lette kædes variable regionexon fra den samme myeloma til human kappa lette kædeexon. Disse gener blev transficeret i musemyelomacellelinier og transformerede celler, der fremstillede kimære muse-human-antistoffer mod
15 phosphocholin var således udviklet.

S.L. Morrison et al., europæisk patentpublikation nr. 173494 (publiseret 5. marts 1986) beskriver kimære "receptorer" (f.eks. antistoffer) med variable regioner hidrørende fra én
20 art og konstante regioner hidrørende fra en anden. Der nævnes anvendelse af cDNA-kloning til konstruktion af generne, selv om der ikke er anført detaljer med hensyn til cDNA-kloning eller priming. (Se side 5, 7 og 8).

25 G.L. Boulianne et al., Nature, 312:643 (13. december 1984) fremstiller også antistoffer, der består af muse variable regioner forenet med humane, konstante regioner. De opbyggede immunoglobuliner, hvori DNA-segmenterne, der koder for muse variable regioner, specifikke for haptentrinitrophenyl
30 (TNP), blev forenet med segmenter, der koder for humane mu og kappa konstante regioner. Disse kimære gener blev udtrykt som funktionel TNP-bindende kimær IGM.

35 Se hos Munro, Nature, 312:597 (13. december 1984), Dickson, Genetic Engineering News, 5, nr. 3 (marts 1985) eller Marx, Science, 299:455 (august 1985) for en kommentar på arbejdet udført af Boulianne et al. og Morrison et al..

5 M. S. Neuberger et al., Nature, 314:268 (25. marts 1985) konstruerer også en kimær, tung kæde af immunoglobulingen, hvori et DNA-segment, der koder for en muse variabel region specifik for hapten-4-hydroxy-3-nitrophenacetyl (NP) blev forenet med et segment, der koder for den humane ϵ -region. Når dette kimære gen blev transficeret ind i J558L-cellelinien, blev et antistof fremstillet, som bandt til NP-haptenen og havde humane IgE-egenskaber.

10 M. S. Neuberger et al. har også publiceret arbejde, der viser fremstillingen af cellelinier, som secernerer haptenspecifikke antistoffer, hvori Fc-delen er blevet erstattet enten med en aktiv enzymdel (G. Williams og M.S. Neuberger, Gene 43:319, 1986) eller med et polypeptid, der udviser c-myc-antigendeterminanter (Nature, 312:604, 1984).

20 M. Neuberger et al, PCT-publikation W086/01533 (publiceret 13. marts 1986) beskriver også fremstillingen af kimære antistoffer (se side 5) og foreslår blandt teknikkens mange anvendelser begrebet "klasseskift" (se side 6).

25 M. Taniguchi, i europæisk patentpublikation nr. 171.496 (publiceret 19. februar 1985) beskriver fremstillingen af kimære antistoffer, der har variable regioner med tumorspecificitet og hidrører fra forsøgsdyr og konstante regioner, der hidrører fra mennesker. De tilsvarende tunge og lette kædegener fremstilles i den genome form og udtrykkes i mammale celler.

30 S. Takeda et al., Nature, 314:452 (4. april 1985) har beskrevet en mulig metode til konstruktionen af kimære immunoglobulingener, som har intronsekvenser fjernet ved anvendelsen af en retrovirusvektor. Et uventet splejsedonorsted forårsagede imidlertid fjernelsen af V-regionledersekvensen. Dette forsøg frembragte således ikke-fuldstændige kimære antistofmolekyler.

35 S. Cabilly et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 3273-3277 (juni 1984) beskriver plasmider, som dirigerer syntesen i E. coli af tunge kæder og/eller lette kæder af antistof imod carcinoembryon-antigen (CEA). Et andet plasmid blev konstrue-

ret til ekspression af en afkortet form af tung kæde (Fd')-fragment i *E. coli*. Funktionel CEA-bindingsaktivitet blev opnået ved *in vitro* rekonstitution i *E. coli*-ekstrakter af en del af den tunge kæde med let kæde.

5

S. Cabilly et al, europæisk patentpublikation 125023 (publiceret 14. november 1984) beskriver kimære immunoglobulingener og deres formodede produkter såvel som andre modificerede former. På siderne 21, 28 og 33 diskuteres cDNA-kloning og priming.

10

M. A. Boss, europæisk patentansøgning 120694 (publiceret 3. oktober 1984) beskriver ekspression i *E. coli* af ikke-kimære immunoglobulinkæder med 4-nitrophenylspecificitet. Der er en almen beskrivelse af kimære antistoffer, men ingen detaljer (se side 9).

15

C. R. Wood et al., *Nature*, 314: 446 (april 1985) beskriver plasmider, som dirigerer syntesen af muse-antistofproteiner mod NP i gær. Tung kæde af mu-antistofproteiner viste sig at være glycosyleret i gærcellerne. Når både tunge og lette kæder blev syntetiseret i den samme celle, blev noget af proteinet samlet til funktionelle antistofmolekyler som påvist ved anti-NP-bindingsaktivitet i opløseligt protein fremstillet fra gær-celler.

20

25

A. Alexander et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 79: 3260-3264 (1982) beskriver fremstillingen af en cDNA-sekvens, der koder for en abnorm kort human Ig γ tung kæde (OMM γ^3 HCD-serumprotein), der indeholder en 19-aminosyreleder efterfulgt af de første 15 led i V-regionen. En omfattende indre deletion fjerner den tilbageværende del af V og hele C_{H1}-området. Dette er cDNA, der koder for et molekyle med en indre deletion.

30

T. W. Dolby et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77: 6027-6031 (1980) beskriver fremstillingen af en cDNA-sekvens og rekombinantplasmider, der indeholder den samme kodning for mu og kappa humane immunoglobulinpolypeptider. En af de DNA-rekombinerede molekyler indeholdt codoner for en del af C_{H3}-konstant-regionområdet og den hele 3'-ikke-kodende sekvens.

35

M. Seno et al., *Nucleic Acids Research*, 11: 719-726 (1983) beskriver fremstillingen af en cDNA-sekvens og rekombinantplasmider, der indeholder den samme kodning for en del af den variable region og hele den konstante region af den humane IgE tunge kæde (ε-kæde).

10 T. Kurokawa et al., *ibid*, 11: 3077-3085, (1983) viser konstruktionen under anvendelse af cDNA af tre ekspressionsplasmider, der koder for den konstante del af den humane IgE tunge kæde.

15 F. T. Liu et al., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 81: 5369-5373 (september 1984) beskriver fremstillingen af en cDNA-sekvens og rekombinantplasmider, der indeholder den samme kodning af ca. 2/3 af CH₂-, og hele CH₃- og CH₄-områderne af human IgE's tunge kæde.

20 Y. Tsujimoto et al., *Nucleic Acids Res.*, 12: 8407-8414 (november 1984) beskriver fremstillingen af en human V λ cDNA-sekvens fra en Ig λ-fremstillende human Burkitt-lymphoma-cellelinie ved at benytte sig af et klonet konstant region-gen, som en primer for cDNA-syntese.

25 J. Murphy., PCT-publikation WO 83/03971 (publiceret 24. november 1983) beskriver hybridproteiner fremstillet af fragmenter, der indeholder et toxin og en cellespecifik ligand (som formodes muligvis værende et antistof).

30 Tan et al., *J. Immunol.* 135:8564 (november 1985) opnåede ekspression af et kimært genomt gen for human-muse-immunoglobulin efter transfektion ind i musemyelomaceller.

35 P. T. Jones et al., *Nature* 321:552 (maj 1986) konstruerede og udtrykte en genom konstruktion, hvor CDR-områder af variable regioner fra et monoklont museantistof blev anvendt til at erstatte de tilsvarende områder i et humant antistof.

L. K. Sun et al., Hybridoma 5 suppl. 1 S17 (1986) beskriver et kimært humant/muse-antistof med potentiel tumorspecificitet. De kimære tunge og lette kædegener er genome konstruktioner og udtrykkes i mammale celler.

Sahagan et al., J. Immun. 137:1066-1074 (august 1986) beskriver et kimært antistof med specificitet over for et humant tumorassocieret antigen, for hvilket generne er sammensatte ud fra genome sekvenser.

For en nyere oversigt over området, se også S. L. Morrison, Science 229: 1202-1207 (20. september 1985) og V.T. Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986).

Oi et al.-beskrivelsen er relevant, da den anfører, at fremstillingen af kimære antistoffer fra cDNA-konstruktioner i gær og/eller bakterier ikke nødvendigvis er fordelagtig.

Se også kommentaren på side 835 i Biotechnology 4 (1986).

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en hidtil ukendt fremgangsmåde til at fremstille genteknologifremstillede antistoffer med ønsket variabel regionspecificitet og konstant regionegenskaber gennem genkloning og ekspresion af lette og tunge kæder. De klonede immunoglobulingenprodukter kan fremstilles ved ekspresion i genteknologifremstillede organismer.

Anvendelsen af kemisk gensyntese, rekombinant-DNA-kloning og fremstilling af specifikke immunoglobulinkæder i forskellige organismer tilvejebringer en effektiv løsning for den effektive produktion af humane monoklone antistoffer i stor målestok med antigenspecificiteter af enten humane eller ikke-humane, især gnavere, monoklone antistoffer. Opfindelsen tilvejebringer også en løsning til problemet med classeskiftende antistofmolekyler, således at det er bekvemt at fremstille immunoglobuliner med en hvilken som helst given classes bestemte bindingspecificitet.

5 Opfindelsen tilvejebringer vektorer omfattende cDNA-sekvenser, der koder for immunoglobulinkæder, som omfatter en konstant human region og en variabel, enten human eller ikke-human, region. Immunoglobulinkæderne kan enten være tunge eller lette.

10 Opfindelsen tilvejebringer også gensekvenser, der koder for immunoglobulinkæder, der omfatter en variabel cDNA-region af ikke-human origin og en konstant genomregion af human origin.

15 Opfindelsen tilvejebringer også sekvenser, som ovenfor, der er til stede i rekombinant-DNA molekyler, især i bærere, såsom plasmidvektorer, der er i stand til ekspression i ønskede prokaryote eller eukaryote værter.

20 Opfindelsen tilvejebringer også konsensussekvenser og specifikke oligonucleotidsekvenser, der er anvendelige som sonder for hybridisering og priming af cDNA-syntese af en hvilken som helst hybridoma-mRNA, der koder for variable regioner med en hvilken som helst ønsket specificitet.

25 Opfindelsen tilvejebringer værter, der er i stand til ved dyrkning at fremstille kimære antistoffer og fremgangsmåder til anvendelse af disse værter.

30 Opfindelsen tilvejebringer også kimære individuelle immunoglobulinkæder og hele samlede molekyler, der har humane konstante regioner og ikke-humane variable regioner, hvor begge variable regioner har den samme bindingsspecificitet.

Blandt andre immunoglobulinkæder og/eller -molekyler, der tilvejebringes ved opfindelsen, er:

35

(a) et fuldstændigt, funktionelt immunoglobulinmolekyle, der omfatter

5 (i) to identiske kimære tunge kæder, der omfatter en ikke-human variabel region og en human konstant region, og

(ii) to identiske helt (dvs. ikke-kimære) humane lette kæder.

10 (b) et fuldstændigt, funktionelt immunoglobulinmolekyle, der omfatter

(i) to identiske kimære tunge kæder, der omfatter en ikke-human variabel region og en human konstant region, og

15 (ii) to identiske helt (dvs. ikke-kimære) ikke-humane lette kæder.

(c) et monovalent antistof, dvs. et fuldstændigt funktionelt immunoglobulinmolekyle, der omfatter:

20 (i) to identiske kimære tunge kæder, der omfatter en ikke-human variabel region og en human konstant region, og

25 (ii) to forskellige lette kæder, hvoraf kun en har den samme specificitet som den variable region hos de tunge kæder. Det resulterende antistofmolekyle binder kun til én ende deraf og er derfor ude af stand til divalent binding,

(d) et antistof med to forskellige specificiteter, dvs. et fuldstændigt, funktionelt immunoglobulinmolekyle, der omfatter:

30 (i) to forskellige kimære tunge kæder, hvoraf den første er én, der omfatter en ikke-human variabel region og en human konstant region og den anden omfatter en forskellig ikke-human variabel region og en human konstant region, og

35 (ii) to forskellige kimære lette kæder, hvoraf den første omfatter en ikke-human variabel region, der har den samme specificitet, som den første tunge kædes variable region og en human konstant region, og den anden omfatter en ikke-human

variabel region, der har den samme specificitet, som den anden tunge kædes variable region, og en human konstant region.

Det resulterende antistofmolekyle binder til to forskellige antigener.

Genetiske sekvenser, især cDNA-sekvenser, der koder for de førnævnte kombinationer af kimære kæder eller af ikke-kimære kæder tilvejebringes også heri.

Opfindelsen tilvejebringer også en genetisk sekvens, især en cDNA-sekvens, der koder for den variable region af et antistofmolekyles tunge og/eller lette kæde, operabelt koblet til en sekvens, der koder for et polypeptid, der er forskelligt fra en immunoglobulinkæde (f.eks. et enzym). Disse sekvenser kan samles ved hjælp af metoder ifølge opfindelsen og udtrykkes til opnåelse af molekyler med blandet funktion.

Anvendelsen af cDNA-sekvenser er særligt fordelagtigt sammenlignet med genome sekvenser (som indeholder introner) ved at cDNA-sekvenser kan udtrykkes i bakterier eller andre værter, som mangler RNA-splejsningssystemer.

Blandt foretrukne specifikke antistoffer er sådanne, der har specificiteter til cancer-beslægtede antigener.

Figur 1 viser DNA-omordninger og ekspresionen af immunoglobulins μ og γ tunge kædegener. Dette er en skematisk repræsentation af det humane tunge kædegenkompleks, ikke vist i de rigtige forhold. Variabel-V-regiondannelse hos tung kæde forekommer gennem foreningen af V_H -, D- og J_H -gensegmenter. Dette frembringer et aktivt μ -gen. En anden type DNA-omordning kaldet "klaseskift" omlokaliserer den bundne V_H , D og J_H region fra den μ konstante C-region til en anden tung kædes C-region (skiftning til γ er anført her). Der fremhæves skematisk at J-regionen er et almindeligt træk hos alle udtrykte tunge kædegener. J-regionen er også et almindeligt træk hos udtrykte lette kædegener.

Figur 2 viser de kendte nucleotidsekvenser hos humane J-regioner og muse-J-regioner. Consensussekvenser for J-regionerne

er vist nedenfor de faktiske sekvenser. Oligonucleotidsekvensen under muse-kappa J-regionconsensussekvensen er et "universalt immunoglobulingen"-oligonucleotid (UIG), som anvendes i den foreliggende opfindelse.

5

Figur 3 fremhæver skematisk anvendelsen af UIG-oligonucleotidprimeren for syntesen af cDNA komplementær til immunoglobulin-messenger-RNA's variable region, eller anvendelsen af oligo-dT som en primer for cDNA-syntese efterfulgt af in vitro mutagenese.

10

Figur 4 viser syntesen og analysen af humane IgG1-gener, omfattende tre isolerede kloner (A.b), hvoraf en (pGMH-6) anvendes som en kloningsvektor (B). En 1,5 kb deletion af pBR322-sekvens mellem Bam HI og PvuII er markeret. Ikke i målestoksforhold.

15

Figur 5 viser kloningsvektoren pQ23, en modificeret pBR322, egnet til cDNA-kloning ved KpnI-stedet. Denne vektor indeholder også de anvendelige restriktionsenzymsteder BglII og SalI. Ikke i målestoksforhold.

20

Figur 6 viser i A. syntesen og analysen af humane lette kædekappagener. Figuren viser også i B. (ikke i målestoksforhold) konstruktion af en human C κ -region-kloningsvektor pING2001.

25

Figur 7 viser primerer konstrueret til syntese af immunoglobulins V-region. (A) viser J-C-regioner af tung kæde og primerer. En DNA-version af hver muse-J-region af tung kæde er vist direkte over primerer konstrueret fra den sekvens. Muse-J-regioner er 5' til 3', fra venstre til højre, mens primerer er 3' til 5', venstre til højre. Primernavne er omfattet af klammer, og antal nucleotider (N) og antal af forkert matchede med hver J μ -region er anført til højre. Primerer, som indfører et BstEII-sted, er understreget. (B) viser J-regionerne af lette kæder og primerer. Det samme som for (A) bortset fra lette kæder. Primerer konstrueret til at indføre et BglII-sted er understreget, som BclI-stedet, der er til stede i pING2016E. (C) viser UIG-primerer til muse-variable regioncon-

30

35

sensus. Den faktiske primersekvens er vist nedenfor den konsensussekvens. Den humane C κ -HindIII-vektor pGML60 er vist nedenfor. (D) viser en muse γ 2a J/C-forbindelsesprimer.

5 Figur 8 viser syntesen af V-regionmodulgener af tung kæde under anvendelse af oligonucleotid primet cDNA-syntese. Ikke i målestoksforhold.

10 Figur 9 viser konstruktionen af hybride muse-humane-immunoglobuliner. Del A viser konstruktionen af et gen for tung kæde. Stiplede regioner viser C-regionmoduler, mens skraverede eller sorte regioner viser V-regionmoduler. Ikke i målestoksforhold.

15 Figur 10 viser konstruktionen af cDNA-kloningsekspressions-"pendul"-vektorer for mammae celler. Vektorerne pING2003 og pING2003E hidrører fra pL1, pUC12, pSV2-neo og M8- α -RX12. Stiplede regioner indikerer DNA-fremmer til muse tung kæde, skraverede regioner indikerer SV-40-DNA fra pL1, og dobbeltskraverede regioner indikerer SV-40-DNA fra pSV2-neo. I vektorerne
20 pING2003 og pING2003E repræsenterer tykke linier pBR322-DNA fra pSV2-neo, mens tynde linier betegner pUC12-DNA. Pile indikerer SV-40 tidlige regionpromotorers lokaliseringer og retninger, og indikerer en fuldstændig SV-40-intronsekvens.
25 Ikke i målestoksforhold.

30 Figur 11 viser konstruktionen af det tunge kædeekspressionsplasmid pING2006E. Pilene viser SV-40-promotorlokaliseringer og retninger for transcription. Skraverede og sorte områder viser muse-V-regionmoduler, mens stiplede områder viser humane C-regionmoduler. Ikke i målestoksforhold.

35 Figur 12 viser strukturen af de kimære anti-hepatitis tunge kædegener i ekspressionsplasmiderne pING2006E og pING2012E. Del A viser strukturen af kimære muse-human anti-hepatitis tunge kædegener. Strukturen af humant IgG1-mRNA- og -cDNA er vist i A.a.. Den humane tunge kædes konstante regions cDNA-klon pGMH-6 og cDNA-kloner for muse tung kædes variable region pBS13-1 og pJ3-11 blev anvendt til at fremstille hybridgenet

anvendt i pING2006E. Skraverede genblokke indikerer muse variable regionsekvenser, mens åbne genblokke viser humane IgG1 konstante regionsekvenser. Del B viser den nucleotide sekvens af anti-hepatitis B tung kædes variable region i pING2006E og pING2012E. pING2012E blev konstrueret ved først at indsætte et BglIII-sted ved SallI-stedet i pING1202 (se fig. 16) til dannelse af pING1202BglIII. Det kimære tunge kædegen fra dette plasmid blev indsat i ekspressionsvektoren pING2003E, hvilket resulterer i pING2012E. pING2012E er forskelligt fra pING2006E i regionen øjeblikkeligt opstrøms for initiatoren ATG. Understregede nucleotider betegner humane J-regionsekvenser fra cDNA-klonen pGMH-6. Aminosyre 117 med stjerne indikerer en enkelt ændring ved dette sted fra muse til human sekvens (Ala til Ser) indført i den kimære gen-J-region. Rækkefølgebestemmelse var ved hjælp af Sanger-metoden på plasmidskabeloner (åben cirkel) og M13-skabeloner (lukket cirkel).

Figur 13 viser i del A J-C-forbindelsesregionnucleotidsekvensen i lette kædekloner hidrørende fra pING2001 (pMACK-3, pING2013E, pING2007E, pING2010E-gpt og pING2014E-gpt). J-regionsekvensen begyndende fra pK2-3 er markeret human-JK4. G-nucleotidet, ikke forudsagt ved genom rækkefølgebestemmelse, er markeret med en stjerne. Oligonucleotidprimeren (K2-4BCLI), som anvendes til at modificere denne sekvens, er vist under den humane JK4-sekvens. Del B viser fremgangsmåden til steddrettet mutagenese, der anvendes til at fremstille pING2016E-gpt. Ikke i målestoksforhold.

Figur 14 genkopinumner af de transficerede sekvenser i to transformanter. nDNA fra 2AE9, 2BH10 blev fordøjet med de anførte enzymer. Koncentrationen af DNA er titreret ned tværs over banerne med den mængde, der er anført over dem. Sonden indeholder humane C- γ -1-sekvenser (pmvHc24 ApaI-BamHI). Referencen er kønscelle (eng.: germ-line) eller GM2146 nDNA fordøjet med ApaI. 3' ApaI-stedet er 2 bp for stedet for poly(A)-addition (3).

Figur 15 viser nucleotidsekvensen af V-regionen af L6-V μ -cDNA-klon pH3-6a. Sekvensen blev bestemt ved dideoxytermineringsme-

tode under anvendelse af M13-subkloner af genfragmenter (vist nedenfor). Abne cirkler betegner aminosyrerester bekræftet ved peptidsekvens. En sekvenshomolog til Dsp.2 i CDR3-regionen er understreget.

5

Figur 16 viser nucleotidsekvensen af V-regionen af L6-V κ -cDNA-klon pL3-12a. Oligonucleotidprimeren anvendt for stedrettet mutagenese er vist nedenfor J κ 5-segmentet. Abne cirkler betegner aminosyrerester, der er bekræftet ved peptidsekvens.

10

Figur 17 viser konstruktionen af kimære L6-V H - samt humane C- γ -1-ekspressionsplasmider. Del (a) viser sekvenserne af BAL-31 deletionklonerne M13mp19-Cl- δ -4 (Cl- δ -4) og M13mp19-Cl- δ -21(Cl- δ -21). 5'-enden af cDNA-klonen, pH3-6a, er betegnet med en pil. M13-sekvenser er understreget. Den oligonucleotidprimer, der anvendes til dette eksperiment, er H3-6a (5'-GACTGCACCAACTGG-3'), som primer i FR1, nær den fuldt udviklede N-ende. Del (b) viser strategien for stedrettet mutagenese af 1 μ g kloner Cl- δ -4 og Cl- δ -21, hver føjet til 20 ng af 31-mer-oligonucleotidet MJH2-ApaI. Komplementær strengsyntese med Klenow-fragmentet af DNA-polymerase foregik ved stuetemperatur i 30 minutter, derefter 15°C i 72 timer. Transficerede fag-plaquer blev adsorberet til nitrocellulose, fæstnet med NaOH og hybridiseret til ³²p-mærket MJH2-ApaI-oligonucleotid ved 65°C, 18 timer, i 4 x TBS (0,6M NaCl, 0,04M tris-HCl (pH-værdi 7,4), 0,004M EDTA) og 10% dextransulfat. Afsluttende vask af filtrene foregik ved 65°C, 4 x SSPE, 0,1% SDS i 15 minutter (T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982). Positive plaquer blev påvist ved udsættelse for "Kodak" XAR-film natten over og blev direkte udvalgt for vækst og restriktionenzymanalyse af RF-DNA. Forkert matchede mellem MJH2-ApaI-oligonucleotidet og muse-C H 1 er anført, hvilket resulterer i de kodningsændringer, som er vist nedenfor oligonucleotidet. Del (c) viser strategien for substitutionen af hver af de mutageniserede L6-V H -moduler for den residente V H af det kimære ekspressionsplasmid pING2012 til dannelse af pING2111 og pING2112.

15

20

25

30

35

Figur 18 viser konstruktionen af det kimære L6-ekspressionsplasmid pING2119. Sali til BamHI fragmentet fra pING2100 er identisk med Sali til BamHI-A fragmentet fra pING2012E.

5 Figur 19 viser modificering af V_K -genet og dets anvendelse ved konstruktion af let kæde og tung samt lette kædeekspressionsplasmider.

10 (a) Deletion af oligo-d[GC]-segment 5' af V_K af L6. Oligonucleotidet er en 22-mer og indeholder et Sali-sted. De tre forkert matchede er vist. V_K -genet bindes efter mutagenese som et Sali-HindIII-fragment til human-C-K-modul. Det således dannede ekspressionsplasmid er pING2119.

15 (b) pING2114, et tungt samt let kædeekspressionsplasmid. Ekspressionsplasmidet pING2114 indeholder det kimære L6 tunge kædegen fra pING2111 og den kimære lette kæde fra pING2119 (tykke linie).

20 Figur 20 viser en opsummering af de sekvensændringer, der er foretaget ved konstruktionen af de kimære L6 antistof-ekspressionsplasmider. Understregede rester i den 5' ikke-translaterede region hidrører fra de klonede muse kappa og tunge kædegener. Rester med en cirkel omkring i V/C-grænsen resulterer fra mutageneseoperationer til fremstilling af restriktionsenzymsteder i denne region. Rester betegnet med små cirkler over dem i L6 tunge kædekimær resulterer også fra mutagenese. De er ikke udtrykte (eng: silent) ændringer.

30 Figur 21 viser 2H7 V_H -sekvensen. V_H -genet indeholder J_H1 -sekvenser og DSP.2-sekvenser. Små cirkler over aminosyresternerne er sådanne, som matcher peptidsekvenser.

35 Figur 22 viser 2H7 V_L -sekvensen. V_L -genet indeholder J_L5 -sekvenser. Et 22-mer-oligonucleotid blev anvendt til at placere et Sali-sted 5' ATG-initiatorcodonet. Små cirkler oven over aminosyresternerne er de, som matcher peptidsekvenser.

Figur 23 viser de kimære immunoglobulingenekspressionsplasmider med 2H7-specificiteten. pING2101 (V_H ,neo), pING2106

(V_K,neo) og pING2107 (V_K,gpt) er et-gen-plasmider. De andre er to-gen-plasmider. Deres konstruktion involverer ligeringen af de større NdeI-fragmenter af pING2101 og pING2107 til lineariseret pING2106 delvis fordøjet med NdeI. pHL2-11 og pHL2-26 blev opnået ud fra pING2101 og pING2106; pLL2-25 blev opnået fra pING2107 og pING2106.

Figur 24 viser en opsummering af de nucleotidændringer, der er introduceret i V_H og V_K ved konstruktionen af de kimære plasmider. De beslægtede V_H- og V_K-nucleotidrester i 5'-enden er understreget. Rester med cirkler i J-C-forbindelsesstederne hidrører fra de humane C-moduler.

Generelt er antistoffer sammensat af to lette og to tunge kædemolekyler. Lette og tunge kæder er fordelt i områder med strukturel og funktionel homologi. De variable regioner i både lette (V_L) og tunge (V_H) kæder bestemmer genkendelse og specificitet. Lette (C_L) og tunge (C_H) kæders konstante regionsområder giver vigtige biologiske egenskaber, såsom antistofkæde forening, udskillelse, transplacental mobilitet, komplementbinding og lignende.

En kompleks række af begivenheder fører til immunoglobulin-gensekspresion i B-celler. V-region gensekvenser givende antigenspecificitet og -binding er lokaliseret i separate kønslinie-gensegmenter, der benævnes V_H, D og J_H; eller V_L og J_L. Disse gensegmenter er forbundne ved hjælp af DNA-omordninger til dannelse af de fuldstændige V-regioner udtrykt i henholdsvis tunge og lette kæder (fig. 1). De omordnede forbundne (V_L-J_L og V_H-D-J_H) V-segmenter koder derefter for de fuldstændige, variable regioner eller antigenbindingsområder hos henholdsvis lette og tunge kæder.

Visse benævnelser og udtryk anvendes gennem hele beskrivelsen og kravene. De følgende definitioner anføres med det formål at skabe klarhed og overensstemmelse.

1. Ekspressionsvektor - et plasmid DNA, der indeholder nødvendige regulatoriske signaler for syntesen af mRNA, der hidrører fra gensekvenser, som kan indsættes i vektoren.

2. Modulvektor - et plasmid DNA, der indeholder et konstant eller variabelt regiongenmodul.

3. Ekspressionsplasmid - en ekspressionsvektor, som indeholder et indsat gen, såsom et kimært immunoglobulingen.

4. Genkloning - syntese af et gen, indsættelse i DNA-vektorer, og identifikation ved hybridisering og lignende.

5. Transfektion - overførslen af DNA ind i mammale celler.

Opfindelsen tilvejebringer en hidtil ukendt fremgangsmåde til kloning og produktion af humane antistoffer med ønsket specificitet. Generelt forener fremgangsmåden fem elementer:

(1) Isolering af messenger-RNA (mRNA) fra B-cellehybridomalinier, der producerer monoklone antistoffer mod specifikke antigener, kloning og cDNA-fremstilling derfra.

(2) Fremstilling af universelle immunoglobulingen-oligonucleotider (UIG), der er anvendelige som primerer og/eller sonder for kloning af de variable regionensegmenter i det lette og tunge kæde mRNA fra specifikke humane eller ikke-humane hybridomacellelinier, og cDNA-produktion derfra.

(3) Fremstilling af konstant regionensegmentmoduler ved cDNA-fremstilling og kloning, eller genom genfremstilling og kloning.

(4) Konstruktion af fuldstændige, tunge eller lette kæde-kodende sekvenser ved kobling af de klonede specifikke immunoglobulin variable regionensegmenter fra del (2) ovenfor til klonede humane konstante regionensegmentmoduler.

(5) Ekspression og produktion af lette og tunge kæder i udvalgte værter, omfattende prokaryote og eukaryote værter, enten i separate fermentationer efterfulgt af samling af antistofmolekyler in vitro, eller gennem produktion af begge kæder i den samme celle.

Opfindelsen anvender klonede hybridoma-B-cellelinier, der fremstiller monoklone antistoffer med defineret specificitet

for isolering af mRNA for cDNA-kloning. På grund af at mange lymfoide cellelinier indeholder meget aktive nucleaser, som nedbryder mRNA under isolering, anvendes der ifølge opfindelsen metoder til fremstilling af mRNA specifikt udviklet for isolering af intakt mRNA fra celler og væv, der indeholder aktive nucleaser. En sådan fremgangsmåde giver fremstillinger af totalt RNA ved celle- eller vævsødelæggelse i en ethanol-perchlorat-tørisblanding, som reducerer nucleasevirkning (P.M. Lizardi et al., *Anal. Biochem.*, 98: 116 (1979)). Denne fremgangsmåde giver intakt translationsdygtigt mRNA.

Andre fremgangsmåder, som er blevet anvendt ifølge opfindelsen, omfatter ekstraktion af cellerne med lithiumchlorid samt urinstof (C. Auffray og F. Rougeon, *Eur. J. Biochem.*, 107: 303 (1980)) eller guanidinthiocyanat (J. M. Chirgwin et al., *Biochemistry*, 18: 5294 (1979)) til fremstilling af RNA.

Et universelt træk ved alle lette og tunge immunoglobulinkædegener og messenger-RNA'er er den såkaldte J-region (dvs. forbindelsesregion, se fig. 1). J-regioner hos tunge og lette kæder har forskellige sekvenser, men en høj grad af sekvenshomologi forekommer (større end 80%) inden i de tunge kæders J_H-regioner eller J-regionerne i kappa lette kæde. Opfindelsen tilvejebringer consensusekvenser for J-regioner hos lette og tunge kæder, der er anvendelige ved udformning af oligonucleotider (betegnet heri som UIG'er) til anvendelse som primerer eller sonder til kloning af lette eller tunge immunoglobulinkæder-mRNA'er eller -gener (fig. 2 eller 7). Afhængig af naturen af udformningen af en bestemt UIG kan den være i stand til hybridisering til alle immunoglobulin-mRNA'er eller -gener, der indeholder en enkelt specifik J-sekvens, såsom UIG-MJH3, som kun detekterer muse-J_H3-sekvenser (fig. 7).

En anden anvendelse af en bestemt UIG-sonde kan være hybridisering til lette kæde- eller tunge kæde-mRNA'er med en specifik konstant region, såsom UIG-MJK, som detekterer alle muse-J_K-holdige sekvenser (fig. 7). UIG-udformningen kan også omfatte en sekvens til indføring af et restriktionsenzymsted i et immunoglobulins cDNA-kopi (se fig. 7). Opfindelsen kan

f.eks. benytte kemisk gensyntese til frembringelse af UIG-sonder til kloningen af V-regioner i immunoglobulin-mRNA fra hybridomaceller, der laver monoklone antistoffer med ønskede antigen-specificiteter.

5 En multitrinsprocedure anvendes til dannelse af fuldstændige V+C-region-cDNA-kloner fra lette og tunge kæde-mRNA'er fra hybridomacelle. I det første trin anvendes der ifølge opfindelsen UIG-sonder som "primerer" for omvendt transcriptase-kopiering af den fuldstændige V-region og tunge og lette kæde-mRNA'ers lederkodende sekvenser (fig. 3). Den komplementære streng af den primerudstrakte cDNA syntetiseres derefter og denne dobbeltstrengede cDNA kloner i passende cDNA-kloningsvektorer, såsom pBR322 (Gubler og Hoffman, Gene, 25: 263 (1983)) eller pQ23 (fig. 5, T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, side 224 (1982)). Kloner screenes for specifik hybridisering med UIG-oligonucleotidsonder. Positive tunge og lette kæde-kloner identificeret ved denne screeningsprocedure kortlægges og rækkefølgebepstemes til udvælgelse af de, der indeholder V-region og lederkodende sekvenser.

En alternativ metode er at fremstille cDNA-kloner under anvendelse af oligo-dT som en primer, efterfulgt af udvælgelse af lette og tunge kæde-kloner ved hjælp af standardhybridiseringsmetoder.

I et andet trin anvendes kloning af C-regionsegmenter til dannelse af tunge og lette kædemodulvektorer. I én fremgangsmåde fremstilles cDNA-kloner af human tung og let immunoglobulinkæde-mRNA. Disse cDNA-kloner omdannes derefter i C-regionmodulvektorer ved sted-rettet mutagenese til placering af et restriktionssted ved en ønsket lokalisering nær en grænse til den konstante region. En alternativ metode anvender genome C-regionkloner som kilden for C-regionmodulvektorer.

35 Et tredje trin i cDNA-kloning involverer frembringelsen af fuldstændige, lette og tunge kæde-kodningssekvenser med koblete V- og C-regioner. De klonede V-regionsegmenter, frembragt

som ovenfor, udskæres og ligeres til lette eller tunge kædes C-region-modulvektorer. For eksempel kan man kloner den fuldstændige, humane, kappa lette kædes C-region og den fuldstændige humane γ -1-C-region. Derudover kan man modificere en human γ -1-region og indføre et termineringscodon, hvorved der opnås en gensekvens, som koder for den tunge kædedel af et Fab-molekyle.

Kodningssekvenserne, der operationelt har koblete V- og C-regioner, overføres derefter til passende ekspressionssystemer for ekspression i passende værter, prokaryote eller eukaryote. Operationelt koblet betyder forening i-ramme af kodningssekvenser til afledning af en kontinuert translationsdygtig gensekvens uden ændringer eller forstyrrelser af triplet-læserammen.

En særlig fordel ved at anvende genetiske cDNA-sekvenser ifølge den foreliggende opfindelse er den kendsgerning, at de koder kontinuert for immunoglobulinkæder, hvad enten tunge eller lette. Ved "kontinuert" menes, at sekvenserne ikke indeholder introner (dvs. ikke er genome sekvenser, men nærmere, da de hidrører fra mRNA ved omvendt transcription, er sekvenser med nærliggende exoner). Dette karakteristika af cDNA-sekvenserne tilvejebragt ifølge opfindelsen gør det muligt for dem at kunne udtrykkes i prokaryote værter, såsom bakterier, eller i lavere eukaryotiske værter, såsom gær.

En anden fordel ved cDNA-kloningsmetoder er den nemhed og simpelhed, hvorved der opnås V-regionenmoduler.

Udtrykket "ikke-human" som anvendt ifølge opfindelsen er ment som omfattende et hvilket som helst dyr forskelligt fra et menneske, hvori en immunreaktion kan frembringes som derefter fører til anvendelige B-celler resulterende i tilsvarende hybridomaer eller B-celle-kloner opnået ved viral transformation og lignende. Sådanne dyr omfatter almindeligvis gnavere, såsom musen eller rotten. På grund af at det er nemt at behandle og opnå mus, er musen på nuværende tidspunkt det foretrukne ikke-humane dyr. Mus-mus-hybridomaer anvendes således som de foretrukne kilder for tunge og lette kæders variable regioner.

Fortrinsvis tilvejebringer opfindelsen hele V- og/eller C-region-cDNA-sekvenser. Dette betyder, at sekvenserne koder for i alt væsentligt operable V- og/eller C-regioner, uden mangel på nogen som helst større strukturelle dele deraf.

5

Udtrykkene "konstante" og "variable" anvendes funktionelt til at betegne sådanne regioner i immunoglobulinkæden, hvad enten hos tunge eller lette kæder, som koder for egenskaber og træk, der besiddes af de variable og konstante regioner i naturlige ikke-kimære antistoffer. Som bemærket er det ikke nødvendigt for den fuldstændige kodende region for variable eller konstante regioner at være til stede, så længe som en funktionel virkende region er til stede og tilgængelig.

10

15

20

25

30

35

En lang række kildehybridomaer er tilgængelige til fremstilling af mRNA. Se f.eks. kataloget ATCC Cell Lines and Hybridomas, december 1984, American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A., side 5-9 og ECACC Catalogue, 2. udgave; PHLS CAMR Porton Down, Salisbury, Wills; SP40JG, U.K., side 30-35 og 40-46. Hybridomaer, der secernerer monoklone antistoffer, der er reaktive over for en lang række antigener, er anført deri og tilgængelige fra samlingen og anvendelige ifølge opfindelsen. Af særlig interesse af hybridomaer, der secernerer antistoffer, som er reaktive over for virale antigener omfattende Denque kompleks-specifik (ATCC HB 114), Denque type 1 virus (ATCC HB 47), Denque type 2 virus (ATCC HB 46), Denque type 3 virus (ATCC HB 49), Denque type 4 virus (ATCC HB 48), Epstein-Barr receptor (ATCC HB 135), flavivirus-gruppe (ATCC HB 112), hepatitis B overfladeantigen (ATCC CRL 8017 og 8018), herpes simplex type I (ATCC HB 8068), herpes simplex type II (ATCC HB 8067), influenzavirus (ATCC CL 189), influenza A-virus, matrixprotein (ATCC HB 64), influenza A-virus, nucleoprotein (ATCC HB 65), influenza A Bangkok/1/79HA (ATCC HB 66), influenza AWSN NP (ATCC HB 67), SV40 stor T-antigen (ATCC TIB 115), SV40 stor T-antigen, C-terminalende (ATCC TIB 117) og SV40 ikke-viral T-antigen (ATCC TIB 116). Eksempler på andre hybridomaer omfatter sådanne, der secernerer antistoffer til tumorassocierede antigener eller

til humane lymfocytantigener, såsom sådanne, der er reaktive med human tumor-associeret CEA, høj mw (ATCC CRL 8019), human tumor-associeret α -fetoprotein, IgG₁K (ATCC HB 134), human B-lymfocyt HLA-DR, monomorph, IgG_{2b} (ATCC HB 104), human T-lymfocyt T-celleforstadier, IgG₁ (ATCC CRL 8022), human T-lymfocyt T-celle-delmængde, hjælper, IgG_{2b} (ATCC CRL 8002), T-delmængde, suppresser/cytotoksisk, human, IgG₁ (ATCC CRL 8013), T-celledelmængde, suppressor/cytotoksisk, human, IgG_{2a} (ATCC CRL 8014), T-celler, perifer, human, IgG₁ (ATCC CRL 8000), T-celler, perifer, human IgG_{2a} (ATCC CRL 8001), thymocytter, "almindelige", humane, IgG₁ (ATCC CRL 8020).

Disse linier og andre af lignende natur kan anvendes til at kopiere mRNA, der koder for variabel region, under anvendelse af UIG-sonder. Af særlig interesse har antistoffer med specificitet over for humane tumorantigener.

Ekspressionsbærere omfatter plasmider eller andre vektorer. Foretrukne blandt disse er bærere, der bærer en funktionel fuldstændig human konstant, tung eller let kædesekvens, der har passende restriktionssteder fremstillet således, at en hvilken som helst variabel tung eller let kædesekvens med de passende cohæusive ender let kan indsættes deri. Humane konstante, tung eller let kædesekvens-holdige bærere er således en vigtig udførelsesform for opfindelsen. Disse bærere kan anvendes som mellemprodukter til ekspresion af en hvilken som helst ønsket komplet, tung eller let kæde i en hvilken som helst passende vært.

En foretrukken vært er gær. Gær tilvejebringer i alt væsentligt fordele for fremstillingen af lette og tunge immunoglobulin-kæder. Gær udfører post-translacionale peptidmodifikationer omfattende glycosylering. Et antal af DNA-rekombineringsstrategier eksisterer nu, hvori der anvendes stærke promotorsekvenser og plasmider med højt kopiantal, som kan anvendes til åbenlys fremstilling af de ønskede proteiner i gær. Gær genkender ledersekvenser på klonede mammale genprodukter og sernerer peptider, der bærer ledersekvenser (dvs. præpeptider) (Hitzman et al., 11th International Conference on Yeast, Gene-

tics and Molecular Biology, Montpellier, France, September 13-17, 1982).

5 Gærgenekspressionssystemer kan rutinemæssigt evalueres for niveauet af tung og let kædeproduktion, proteinstabilitet og
secenering. En hvilken som helst af en række gærgenekspressionssystemer, som inkorporerer promotor- og termineringselementer fra de aktivt udtrykte gener, der koder for glycolytiske enzymer frembragt i store mængder, når gær dyrkes i medier som er rig på glucose, kan anvendes. Kendte glycolytiske gener kan også tilvejebringe meget effektive transkriptionskontrolsignaler. For eksempel kan promotor- og terminator
10 signaler fra iso-1-cytochrom-C-(CYC-1)-gen anvendes.

15 Den følgende fremgangsmåde kan anvendes til evaluering af optimale ekspressionsplasmider til ekspressionen af klonede immunoglobulin-cDNA'er i gær.

(1) Det klonede DNA-immunoglobulin koblende V- og C-regioner er bundet til forskellige transcriptionspromotorer og DNA-terminatorfragmenter.
20

(2) De kimære gener placeres på gærplasmider, der anvendes til protein-overfremstilling (se f.eks. J.D. Beggs, Molecular Genetics and Yeast, Alfred Benzon Symposium, 16, København (1981)).
25

(3) Supplerende genetiske enheder, såsom et gærlederpeptid kan indbefattes i immunoglobulin-DNA-konstruktioner til opnåelse af antistofsecernerings.
30

(4) En del af sekvensen, ofte de første 6 - 20 codoner af gensekvensen, kan modificeres til at repræsentere foretrukne gærcodonanvendelse.
35

(5) De kimære gener placeres på plasmider, der anvendes til integration i gærkromosomer.

De følgende fremgangsmåder kan anvendes til simultant at udtrykke både lette og tunge kædegener i gær.

(1) De lette og tunge kædegener er hver knyttet til en gær-promotor- og en -terminatorsekvens og placeret på det samme plasmid. Dette plasmid kan udformes til enten autonom replika-tion i gær eller integration ved specifikke steder i gærkromo-somet.

(2) De lette og tunge kædegener er hver knyttet til en gær-promotor- og -terminatorsekvens på separate plasmider, der in-deholder forskellige selektive markører. For eksempel kan det lette kædegen placeres på et plasmid, der indeholder trp1-genet som en selektiv markør, mens det tunge kædegen kan pla-ceres på et plasmid, der indeholder ura3 som en selektiv mar-kør. Plasmiderne kan udformes til enten autonom replikation i gær eller integration ved specifikke steder i gærkromosomerne. En gærstreng, der er mangelfuld for begge selektive markører er enten simultant eller sekventielt transformeret med det plasmid, der indeholder let kædegen og med det plasmid, der indeholder tungt kædegen.

(3) De lette og tunge kædegener knyttes hver til en gærpro-motor- og -terminatorsekvens på separate plasmider, der hver indeholder forskellige selektive markører som beskrevet i (2) ovenfor. En gærparringstype "a"-streng, der er mangelfuld i de selektive markører, der findes på de lette og tunge kædeeks-pressionsplasmider (trp1 og ura3 i det ovenfor nævnte eksem-pel) transformeres med det plasmid, der indeholder det lette kædegen ved selektion for en af de to selektive markører (trp1 i det ovenfor nævnte eksempel). En gærparringstype "a"-streng, der er mangelfuld i de samme selektive markører som "a"-stren-gen (dvs. trp1 og ura3 som eksempler) transformeres med et plasmid, der indeholder det tunge kædegen ved selektion for den alternative selektive markør (dvs. ura3 i det ovenfor nævnte eksempel). "a"-strengen, der indeholder det lette kæde-plasmid (phenotype: Trp⁺ Ura⁻ i det ovenfor nævnte eksempel) og strengen, der indeholder det tunge kædeplasmid (phenotype: Trp⁻ Ura⁺ i det ovenfor nævnte eksempel) parres og diploider udvælges som er prototrofe for begge de ovenfor nævnte selek-tive markører (Trp⁺ Ura⁺ i det ovenfor nævnte eksempel).

Blandt bakterielle værter, som kan anvendes som transformeringsværdter, er *E. coli* K12-streng 294 (ATCC 31446) særlig anvendelig. Andre mikrobielle strenge, som kan anvendes, omfatter *E. coli* X1776 (ATCC 31537). De førnævnte strenge såvel
5 som *E. coli* W3110 (ATCC 27325) og andre enterobakterier, såsom *Salmonella typhimurium* eller *Serratia marcescens* og forskellige *Pseudomonas* arter kan anvendes.

Generelt anvendes plasmidvektorer, som indeholder replikonsekvenser og kontrolsekvenser, som hidrører fra arter, der er forligelige med en værtscelle i forbindelse med disse værter. Vektoren bærer almindeligvis et replikationssted, såvel som specifikke gener, som er i stand til at tilvejebringe phenotypisk selektion i transformerede celler. For eksempel transformeres *E. coli* nemt under anvendelse af pBR322, et plasmid,
10 der hidrører fra en *E. coli*-art (Bolivar et al., *Gene*, 2: 95 (1977)). pBR322 indeholder gener for ampicillin- og tetracyclinresistens og tilvejebringer således lette metoder til at identificere transformerede celler. pBR322-plasmid eller andre mikrobielle plasmider må også indeholde eller være modificeret til
15 at indeholde, promotorer, som kan anvendes af den mikrobielle organisme til ekspresion af dens egne proteiner. De promotorer, der almindeligvis mest anvendes ved rekombinant-DNA-konstruktion, omfatter β -lactamasepromotorsystemer (penicillinase) og lactosepromotorsystemer (β -galactosidase) promotorsystemer (Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978), Itakura et al.,
20 *Science*, 198: 1056 (1977)) og tryptophanpromotorsystemer (Goeddel et al., *Nucleic Acids Research*, 8: 4057 (1980), EPO publikations nummer 0036776). Selvom disse er de mest almindeligt anvendte er andre mikrobielle promotorer blevet fundet og brugt.
25
30

En genetisk konstruktion for en hvilken som helst tung eller let kimær immunoglobulinkæde kan f.eks. placeres under kontrol af den mod venstre rettede promotor (P_L) af bakteriefag λ . Denne promotor er en af de stærkeste kendte promotorer, som kan kontrolleres. Kontrol udøves af λ -repressoren og nærliggende restriktionssteder kendes.
35

Ekspressionen af immunoglobulinkædesekvensen kan også placeres under andre regulatoriske sekvensers kontrol, som kan være "homologe" til organismen i dens ikke-transformerede tilstand. For eksempel omfatter lactose-afhængigt E. coli-kromosomt DNA

5 et lactose- eller lac-operon, som formidler lactosefordøjelse ved opbygning af enzymet β -galactosidase. lac-kontrol-elementerne kan opnås ud fra bakteriofag λ pLAC5, som er inficerende for E. coli. lac-promotor/operatorsystemet kan fremkaldes af

10 IPTG.

Et andet promotor/operator-system eller dele deraf kan ligeledes anvendes. For eksempel arabinose, colicin E1, galactose, alkaliphosphatase, tryptophan, xylose, tac og lignende kan

15 anvendes.

Andre foretrukne værter er mammale celler, der er dyrket in vitro i vævskultur eller in vivo i dyr. Mammale celler tilvejebringer post-translational modifikationer til immunoglobulinproteinmolekyler, der omfatter lederpeptidfjernelse, korrekt foldning og samling af tunge og lette kæder, glycosylering på korrekte steder og secerneret af funktionelt antistofprotein fra cellen som H₂L₂-molekyler.

20

Mammale celler, som kan anvendes som værter for produktionen af antistofproteiner, omfatter celler af fibroplastorigin, såsom Vero (ATCC CRL 81) eller CHO-K1 (ATCC CRL 61), eller celler af lymfoidorigin, såsom hybridoma Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581) eller myleoma P3X63Ag8 (ATCC TIB 9) og dets derivater.

25

Flere mulige vektorsystemer er tilgængelige for ekspressionen af klonede tunge kæde-gener og lette kæde-gener i mammale celler. En klasse af vektorer anvender DNA-elementer, som tilvejebringer et autonomt replikerende ekstrakromosomt plasmid, der hidrører fra dyrevira, såsom bovin-papillomavirus (N. Sarver et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79: 7147 (1982)), polyomavirus (R. J. Deans et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 1292 (1984)) eller SV40-virus (M. Lusky og M. Botchan, Nature, 293: 79 (1981)). En anden klasse af vektorer afhænger af

30

35

integrationen af den ønskede gensekvens i værtscellekromosomet. Celler, som stabilt har integreret det introducerede DNA i deres kromosomer, kan udvælges ved også at introducere lægemiddelresistensgener, såsom E. coli gpt (R. C. Mulligan og P. Berg, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78: 2072 (1981)) eller Tn5 neo (P. J. Southern og P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1: 327 (1982)). Det udvælgelige markørgen kan enten være direkte koblet til DNA-gensekvenserne for at blive udtrykt eller indført i den samme celle ved cotransfektion (M. Wigler et al., Cell, 16: 77 (1979)).

Da et immunoglobulin-cDNA kun er sammensat af sekvenser, der repræsenterer det fuldt udviklede mRNA, der koder for et antistofprotein eller dets forstadier, kræves der supplerende genekspressionselementer, der regulerer transcription af genet og fremstilling af RNA'et, for optimal syntese af immunoglobulin-mRNA. Disse elementer kan omfatte splejsesignaler, såvel som transcriptionspromotorer omfattende inducerbare promotorer, fremmere og termineringssignaler. cDNA-ekspressionsvektorer, der har inkorporeret sådanne elementer, omfatter sådanne, der er beskrevet af H. Okayama og P. Berg, Mol. Cell Biol., 3: 280 (1983), C.L. Cepko et al., Cell, 37: 1053 (1984), og R. J. Kaufman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 689 (1985).

En fremgangsmåde til at evaluere optimale vektorer for ekpressionen af immunoglobulin-cDNA i mammale celler involverer at man først placerer immunoglobulin-DNA-sekvensen i vektorer, der er i stand til stabilt at integrere ind i cellegenomen eller replikerer autonomt som et ekstrakromosomalt plasmid. Vektorerne kan anvendes til at evaluere forskellige genekspressionselementer for optimal immunoglobulinsyntese.

En yderligere fordel ved mammale celler, som værter, er deres evne til at udtrykke kimære immunoglobulingener, som hidrører fra genome sekvenser. Mammale celler kan således udtrykke kimære immunoglobulingener, som er sammensat af et variabelt region-cDNA-modul samt en konstant region, som er sammensat helt eller delvis af genome sekvenser. Flere genome kloner for hu-

man konstant region har været beskrevet (J. W. Ellison et al., Nucl. Acids Res., 10: 4071 (1982) eller E. Max et al., Cell, 29: 691 (1982)). Anvendelsen af sådanne genome sekvenser kan være hensigtsmæssige til den simultane indføring af immunoglobulinfremmere, splejsesignaler og transcriptionsterminerings-signaler sammen med det konstante regionensegment.

Forskellige fremgangsmåder kan følges til opnåelse af fuldstændige H₂L₂-antistoffer.

Først kan man separat udtrykke de lette og tunge kæder efterfulgt af in vitro-assembly af oprensede lette og tunge kæder ind i fuldstændige H₂L₂-IgG-antistoffer. Samlingsmetoderne, der anvendes til frembringelsen af fuldstændige H₂L₂-IgG-molekyler i celler, er blevet undersøgt i stort omfang (se f.eks. M. Scharff, Harvey Lectures, 69: 125 (1974)). In vitro-reaktionsparametre for dannelsen af IgG-antistoffer fra reduceret, isoleret lette og tunge kæder har været defineret af S. Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, side 69, 1979.

Dernæst er det muligt at co-udtrykke lette og tunge kæder i de samme celler til opnåelse af intracellulær associering og kobling af tunge og lette kæder til fuldstændige H₂L₂-IgG-antistoffer. Co-ekspressionen kan forekomme ved at anvende enten de samme eller forskellige plasmider i den samme vært.

Fremgangsmåden, der er beskrevet heri, kan også anvendes til at skifte et hvilket som helst antistofs klasse med en given specificitet og klasse til et antistof med den samme specificitet, men med en anden klasse, hvad enten human eller ikke-human. For eksempel kan humane IgM-antistoffer transmuteres til humane IgG-antistoffer ved at fremstille konstruktioner, der indeholder human konstant IgG-cDNA eller genome sekvenser, der er koblet til human variable cDNA-sekvenser, der er opnået fra en celle, der producerer det originale IgM-antistof. Disse konstruktioner indføres derefter i passende værter og udtrykkes.

Opfindelsen tilvejebringer "kimære" immunoglobulinkæder, enten tunge eller lette. En kimær kæde indeholder en konstant region, der i alt væsentligt ligner den, som er til stede i den tunge kæde hos et naturligt humant immunoglobulin, og en variabel region, der har en hvilken som helst ønsket antigenspecificitet. Den variable region er enten af human eller ikke-human origin.

Opfindelsen tilvejebringer også immunoglobulinmolekyler, der har tunge og lette kæder forenet således, at det samlede molekyle udviser ønsket bindings- og genkendelsesegenskaber. Forskellige typer immunoglobulinmolekyler tilvejebringes: monovalente, divalente, dispecifikke (dvs. med forskellige variable regioner), molekyler med kimære tunge kæder og ikke-kimære lette kæder eller molekyler med variable bindingsområder knyttet til peptiddele, der bærer ønskede funktioner.

Antistoffer, der har kimære tunge kæder med den samme eller forskellig variabel regionbindingspecificitet og ikke-kimære (dvs. helt humant eller helt ikke-humant) lette kæder, kan fremstilles ved passende forening af de nødvendige polypeptidkæder. Disse kæder fremstilles individuelt ved hjælp af de modulære samlingsfremgangsmåder ifølge opfindelsen.

Antistofferne ifølge opfindelsen med human konstant region kan anvendes til passiv immunisering, især hos mennesker, uden negative immunreaktioner, såsom serumsygdomme eller anafylaktisk chock. Antistofferne kan selvfølgelig også anvendes ved kendte immunodiagnostiske bestemmelser og i analysesæt i mærket form til in vivo afbildning, hvor mærket kan være en radioaktiv kilde eller et NMR-kontrastmiddel, såsom en carbon-13-kerne eller et røntgenkontrastmiddel, såsom en tungmetalkerne. Antistofferne kan også anvendes til in vitro-lokalisering af antigener ved passende mærkning.

Antistofferne kan anvendes til terapeutiske formål i sig selv i komplementformidlet lyse eller kan kobles til toxiner eller andre terapeutiske dele.

Antistoffers classeskift er anvendelig, når det ønskes at ændre sammensætningen, aggregeringen eller andre egenskaber hos antistoffer, der er opnået ved cellefusion eller hybridomateknik. For eksempel er de fleste human-human monoklone antistoffer af IgM-klassen og er kendt for at de har nemt ved reduktion og aggregering. Ændring af sådanne antistoffer til andre antistoftyper, såsom IgG, IgA eller IgE, er således en stor fordel.

Blandede antistof-enzym-molekyler kan anvendes til immunodiagnostiske metoder, såsom ELISA. Blandede antistof-peptid-effektorkonjugater kan anvendes til målrettet aflevering af effektordelen med en høj grad af effektivitet og specificitet.

Efter nu generelt at have beskrevet opfindelsen vil den yderligere forstås ved henvisning til bestemte specifikke eksempler, som er indbefattet heri kun for illustrationsformål og ikke er ment at være begrænsende, medmindre andet er anført.

Eksperimenter.

Materialer og metoder.
Vævskulturcellelinier.

De humane cellelinier GM2146 og GM1500 blev opnået fra the Human Mutant Cell Repository (Camden, New Jersey) og dyrket i RPMI1640 samt 10% føtal bovins serum (M. A. Bioproducts). Cellelinierne Sp2/0 og CRL 8017 blev leveret fra the American Type Culture Collection og dyrket i Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) samt 4,5 g/l glucose (M. A. Bioproducts) samt 10% føtal bovins serum (Hyclone, Sterile Systems, Logan, Utah). Medier blev suppleret med penicillin/streptomycin (Irvine Scientific, Irvine, California).

Rekombineret plasmid- og bakteriofag-DNA.

Plasmiderne pBR322, pL1 og pUC12 blev leveret fra Pharmacia P-L Biochemicals (Milwaukee, Wisconsin). Plasmiderne pSV2-neo og pSV2-gpt blev leveret fra BRL (Gaithersburg, Maryland) og er tilgængelige fra the American Type Culture Collection

(Rockville, Maryland). pHu- γ -1 er en subklon af 8,3 Kb fragmentet Kb HindIII til BamHI fra det humane IgG1 kromosomale gen. En separat isolering af det humane IgG1 kromosomale gen er beskrevet af J. W. Ellison et al., Nucl. Acids Res., 10: 4071 (1982). M8- α -RX12 indeholder 0,7 Kb fragmentet XbaI til EcoRI, der indeholder muse tung-kæde-fremmer fra J-C-intron-regionen i M603 kromosomgenet (M. Davis et al., Nature, 283: 733) indsat i M13mp10. G-haledannet pUC9 blev leveret fra Pharmacia P-L. DNA-manipulationer, der involverede oprensning af plasmid DNA ved grænsedensitetcentrifugering, restriktionsendonucleasefordøjelse, oprensning af DNA-fragmenter ved agarosegelelektroforese, ligering og transformering af E. coli blev udført som beskrevet af T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982). Restriktionsendonuclease-er og andre DNA/RNA-modificerende enzymer blev leveret fra Boehringer-Mannheim (Indianapolis, Indiana), BRL, New England Biolabs (Beverly, Massachusetts) og Pharmacia P-L.

Oligonucleotidfremstilling.

Oligonucleotider blev enten syntetiseret ved triestermetoden beskrevet af Ito et al. (Nucl. Acids Res., 10: 1755 (1982)) eller blev leveret fra ELESEN, Los Angeles, California. Trityleret, afblokerede oligonucleotider blev oprenset på Sephadex-G50, efterfulgt af omvendt-fase HPLC med en 0-25% gradient af acetonitril i 10mM triethylamineddikesyre, pH-værdi 7,2, på en C18 uBondapak-søjle (Waters Associates). Aftritylering blev udført i 80% eddikesyre i 30 minutter, efterfulgt af afdampning tre gange. Oligonucleotider blev mærket med [γ -³²P]ATP samt T4-polynucleotidkinase.

RNA-fremstilling og analyse.

Totalt, cellulært RNA blev fremstillet ud fra vævskulturceller ved hjælp af fremgangsmåden beskrevet af C. Auffray og F. Rougeon (Eur. J. Biochem., 107: 303 (1980)) eller J. M. Chirgwin et al. (Biochemistry, 18: 5294 (1979)). Fremstilling af poly(A)⁺-RNA, methykviksølvagarosegelelektroforese og "Northern"-overførsel til nitrocellulose blev udført som beskrevet

af T. Maniatis et al., supra. Totalt cellulært RNA eller poly(A)⁺-RNA blev direkte bundet til nitrocellulose ved først at behandle RNA'en med formaldehyd (B. A. White og F. C. Bancroft, J. Biol. Chem., 257: 8569 (1982)). Hybridisering til filterbundet RNA var med hak-translaterede DNA-fragmenter under anvendelse af betingelser beskrevet af D. H. Margulies et al. (Nature, 295: 168 (1982)) eller med ³²P-mærket oligonucleotid under anvendelse af 4xSSC, 10X Denhardt's, 100 µg/ml lakssperma-DNA ved 37°C natten over, efterfulgt af vask i 4xSSC ved 37°C.

cDNA-fremstilling og kloning.

Oligo-dT primede cDNA-biblioteker blev fremstillet ud fra poly(A)⁺-RNA fra GM1500- og GM2146-celler ved hjælp af fremgangsmåden beskrevet af henholdsvis H. Land et al. (Nucl. Acids Res., 9: 2251 (1981)) og V. Gubler og B. J. Hoffman, Gene, 25: 263 (1983). cDNA-bibliotekerne blev screenet ved in situ hybridisering (T. Maniatis, supra) med ³²P-mærket oligonucleotider under anvendelse af betingelserne anført ovenfor, eller med hak-translaterede DNA-fragmenter under anvendelse af betingelserne beskrevet af Lange et al. (Cell, 34: 891 (1983)).

Oligonucleotid-primerforlængelse og kloning.

Poly(A)⁺-RNA (20 µg) blev blandet med 1,2 µg primer i 40 µl 64mM KCl. Efter denaturering ved 90°C i 5 minutter og derefter afkøling i is blev 3 enheder human placentar ribonucleaseinhibitor (BRL) sat til 3 µl 1M tris-HCl, pH-værdi 8,3. Oligonucleotidet blev føjet til RNA ved 42°C i 15 minutter, derefter blev 12 µl 0,05M DTT, 0,05M MgCl₂ og 1mM af hver dATP, dTTP, dCTP og dGTP tilsat. 2 µl α-³²P-dATP (400 Ci/mmol, New England Nuclear) blev tilsat efterfulgt af 3 µl AMV-omvendt-transcriptase (19 enheder/µl, Life Sciences).

Efter inkubering ved 42°C i 105 minutter blev 2 µl 0,5M EDTA og 50 µl 10mM tris, 1mM EDTA, pH-værdi 7,6, tilsat. Ikke-inkorporerede nucleotider blev fjernet ved "Sephadex" G-50

hvirvelkolonnekromatografi, og RNA-DNA-hybridet blev ekstraheret med phenol, derefter med chloroform og præcipiteret med ethanol. Syntese af den anden streng, homopolymerhaledannelse med dGTP eller dCTP og indsættelse ind i homopolymerhaledannende vektorer blev udført som beskrevet af Gubler og Hoffman, supra.

Sted-rettet mutagenese.

Enkeltstrengt M13 subklon DNA (1 µg) blev forenet med 20 ng oligonucleotidprimer i 12,5 µl Hin-puffer (7mM tris-HCl, pH-værdi 7,6 7mM MgCl₂, 50 mM NaCl). Efter opvarmning til 95°C i et lukket rør blev primeren føjet til skabelonen ved langsomt at afkøle fra 70°C til 37°C i 90 minutter. 2 µl dNTP (1mM hver), 1 µl ³²P-dATP (10 uCi), 1 µl DTT (0,1M) og 0,4 µl Klenow-DNA-PolI (2u, Boehringer Mannheim) blev tilsat og kæderne forlænget ved 37°C i 30 minutter. Til dette blev sat 1 µl (10 ng) M13 omvendt primer (New England Biolabs) og opvarmnings/sammenføjnings- og kædeforlængelsestrinnene blev gentaget. Reaktionen blev stoppet med 2 µl 0,5M EDTA, pH-værdi 8 samt 80 µl 10mM tris-HCl, pH-værdi 7,6, 1mM EDTA. Produkterne blev phenolekstraheret og oprenset ved "Sephadex" G-50 hvirvelkolonnekromatografi og ethanol-præcipiteret før restriktionsenzymfordøjelse og ligering til den passende vektor.

Transficering af myelomavævskulturceller.

En variation af metoden beskrevet af A. Ochi et al. (Nature, 302: 340 (1983)) blev anvendt til protoplastfusion. 50 ml bakterier ved A₆₀₀ på 0,7 blev omdannet til protoplaster ved hjælp af metoden beskrevet af R. M. Sandri-Goldin et al. (Mol. Cell. Biol., 1: 743 (1981)), derefter fortyndet med 20 ml DMEM og 10% FBS (endelig volumen er 25 ml). Sp2/0-celler blev høstet, pelleteret ved 2.200 x g, vasket, genpelleteret og gensuspenderet i DMEM ved 2-5x10⁶/ml. Bakterielle protoplaster (10 ml) blev blandet med 10x10⁶ Sp2/0-celler og pelleteret ved centrifugering ved 4.000 x g ved 22°C i 20 minutter. Efter afpipettering af supernatanten blev pelleten suspenderet i den tilbageværende dråbe af medium ved at ryste røret. 2 ml 10%

DMSO, 37% (vægt/vol.) PEG6000 (Kodak) i DMEM blev tilsat dråbevis under blanding i løbet af 45 sekunder. Efter 15 sekunder blev 2 ml 42% PEG6000 i DMEM tilsat i løbet af 45 sekunder. Fuldstændigt DMEM (45 ml) blev langsomt tilsat under blanding. Cellerne blev pelleteret ved 2500 x g, derefter vasket og pelleteret tre gange.

Elektroporationsmetoden beskrevet af H. Potter et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 7161 (1984)) blev anvendt. Efter transficering fik cellerne lov til at komme sig i fuldstændig DMEM i 48-72 timer, hvorefter de blev podet ved 10.000 til 50.000 celler pr. brønd i dyrkningsplader med 96 brønde i nærværelse af selektivt medium. G418 (GIBCO)-selektion var ved 0,8 mg/ml, mycophenolisk syre (Calbiochem) ved 6 µg/ml samt 0,25 mg/ml xanthin og HAT (sigma) var ved standardkoncentration.

Bestemmelse af immunoglobulinsyntese og -secernerings.

Secerneret immunoglobulin blev målt direkte fra vævskulturer, cellesupernatanter. Cytoplasmisk proteinekstrakt blev fremstillet ved hvirvling af 1×10^6 -celler i 160 µl 1% NP40, 0,15M NaCl, 10mM tris og 1mM EDTA, pH-værdi 7,6 ved 0°C, i 15 minutter, efterfulgt af centrifugering ved 10.000 x g til fjernelse af uopløseligt materiale.

Dobbeltantistof-sandwich ELISA (A. Voller et al., i Manual of Clinical Immunology, 2. udgave, udgivere N. Rose og H. Friedman, side 359-371, 1980) under anvendelse af affinitetoprenset antiserum blev anvendt til at påvise specifikke immunoglobuliner. Til påvisning af human IgG var det pladebundne antiserum gede-anti-human-IgG (KPL, Gaithersburg, Maryland) i en 1/1000-fortynding, mens det peroxidasebundne antiserum var gede-anti-human-IgG (KPL eller Tago, Burlingame) i en 1/4000-fortynding. Til påvisning af human immunoglobulin kappa var det pladebundne antiserum gede-anti-human-kappa (Tago) i en 1/500 fortynding, mens det peroxidasebundne antiserum er gede-anti-human-kappa (Cappel) i en 1/1000-fortynding.

Antistoffer, der binder hepatitis B-overfladeantigen, blev påvist under anvendelse af en kommerciel bestemmelse (Abbott, AUSAB).

5 Eksempler.

De følgende eksempler viser fremstillingen af kimære antistoffer, der hver har en human konstant region og en ikke-human variabel region. Disse eksempler anviser den trinvis fremgangsmåde til fremstilling af de kimære antistoffer.

10 Eksempel 1: Humant antistofs konstante region-gen-moduler og cDNA-ekspressionsvektorer.

(1) Fremstilling af cDNA-kloner og bærere, der indeholder disse, for tung kædes humane konstante region.

15 Cellelinien GM2146 blev anvendt som kilde ved mRNA-fremstilling og cDNA-kloning. Denne cellelinie secernerer IgG1 (J. G. Simmons et al., Scand. J. Immunol., 14: 1-13, 1981). Undersøgelser af denne cellelinie viste at den secernerer IgA såvel som IgG.

20 Cellelinien blev klonet og resultater viste at fem af seks subkloner kun secernerede IgG, mens en af seks subkloner kun secernerede IgA. Poly(A)⁺-RNA blev fremstillet ud fra cellelinien og et cDNA-bibliotek blev fremstillet ud fra poly(A)⁺-RNA ved hjælp af fremgangsmåden beskrevet af U. Gubler og B. J. Hoffman, Gene, 25: 263-269 (1983). En indledende spredning af cDNA transformeret i E. coli-stammer HB101 og RR1 gav et samlet antal kolonier på 1500, som blev screenet ved hybridisering til fragment af HindIII til BamHI af en genom klon af human IgG1 (pHu-γ-1). Der blev fundet fire positive kloner. Et fragment, der indeholder den CH3-kodende region af en af disse kloner, pGMH-3 (fig. 4), blev anvendt til at genscreene det oprindelige bibliotek samt en ny transformation af ca. 5000 kolonier. To af de største kloner, pGMH-6 og pGMH-15, blev analyseret ved hjælp af restriktionsenzymfordøjelse (fig. 4). Begge kloner indeholdt hele den konstante region af human IgG1, selvom det viste sig, at pGMH-6 havde deleteret ca. 1500

basepar af pBR322-DNA, tilsyneladende uden at påvirke IgG1 cDNA-sekvenserne.

5 Klon pGMH-6 tilvejebragte IgG1's konstante regionsmodul i konstruktionen af kloningsvektorer til kloning af tung kædes variable region.

(2) Fremstilling af cDNA-kloner og bærere, der indeholder disse, for human let kædes konstante region.

10 En human cellelinie (GM1500), der producerer IgG₂K, blev udvalgt til indledningskloningsfasen. Poly(A)⁺-RNA fremstillet ud fra GM1500 er aktivt i in vitro translation under anvendelse af kanin-reticulocytekstrakter. Et cDNA-bibliotek blev fremstillet ud fra dette RNA ved hjælp af fremgangsmåden beskrevet af Land et al., Nucl. Acids Res., 9: 2251-2266 (1981)
15 under anvendelse af fordøjet KpnI og dG-haledannet pQ23 som kloningsvektoren (fig. 5). Denne vektor indeholder BglII-, KpnI- og SstI-steder indsat mellem BamHI- og SaliI-stederne hos pBR322.

20 For at identificere cDNA-klonerne frembragt ud fra GM1500 RNA, som svarer til let kæde-mRNA, blev en DNA-sonde, UIG-HuK, syntetiseret og oprenset. UIG-HuK-oligonucleotid har sekvensen 5'-AGCCACAGTTCGTTT-3' og er udformet til at hybridisere til alle funktionelle humane kappa-mRNA-arter ved J-C-forbindelsen. Denne sonde blev anvendt til at prime cDNA-syntese på
25 GM1500 RNA i nærværelse af dideoxynucleotider og omvendt transcriptase. Poly(A)⁺-RNA anvendtes fra 1,2 µg totalt GM1500 i dette eksperiment, hele J-sekvensen og noget af V-regionen blev aflæst, hvilket viser at (1) GM1500 RNA er intakt, (2) at kappa-sonden har den korrekte sekvens, og (3) GM1500 let kæde
30 mRNA indeholder J_k4-sekvenser.

cDNA-kloner, der er positive for hybridisering til sonden for let kæde, blev udvalgt. Da sonden hybridiserer til J-C-forbindelsen, var det vigtigste punkt at bestemme, om klonerne
35 havde fuldstændig konstant region-sekvens ud over J-regionen.

Indsættelsesstørrelser for de to største kappa-cDNA-kloner var 0,6 og 0,9 kb, restriktionsenzym-kortlægning viste at hele den

konstante region-kodningssekvens var til stede i begge kloner (fig. 6) Den humane kappa-cDNA-klon pK2-3 blev anvendt til at fremstille let kæde konstant regionvektoren pING2001 ved at indsætte Sau3A-fragmentet, der omfatter human kappa konstant regionen og J-regionen i BclI-stedet hos pBR325 (fig. 6B).

En variant af human kappa cDNA-klonen blev fremstillet ved at placere et HindIII-sted i J-regionen. Dette blev udført ved in vitro mutagenese under anvendelse af J_KHINDIII-oligonucleotidprimer (fig. 7c). Det resulterende plasmid er pGML60.

En vektor, pING2003, blev konstrueret for at overføre og udtrykke cDNA-sekvenser i mammale celler (fig. 10). Denne vektor blev konstrueret ud fra pUC12 og to plasmider, der indeholdt SV40-sekvenser. pL1 tilvejebringer en SV40 tidlig-regionspromotor og en SV40 sen-region-splejsesekvens. pSV2-neo-sekvenser tilvejebringer en udvælgelig markør for mammal celletransformation og SV40 polyadenyleringssignalsekvenser. pUC12 tilvejebringer et multipelt kloningssted for cDNA-indsættelse.

pING2003-vektoren har flere anvendelige restriktionssteder for modifikationer. Disse omfatter et HindIII-sted, der er anvendelig for indsættelsen af fremmer-sekvenser, og et HindIII til XhoI-fragment, der er anvendelig for indsættelsen af skiftende promotorsekvenser. Denne vektor er anvendelig ved ekspressionen af cDNA-gener i mammale celler.

Tilsætning af fremmerelement til pING2003.

Immunoglobulin-fremmerelementer har vist sig at fremme transcription af gener i deres nærhed i stabilt transformerede musemyelomaceller med flere hundrede gange (S. D. Gillies et al., Cell, 33: 717, 1983 og J. Banerji et al., Cell, 729, 1983). For at lette ekspression af muse-human-immunoglobulin-gener i muse-myelomaceller blev muse-immunoglobulin tung kædefremmerelementet sat til cDNA-ekspressionsvektoren pING2003 (fig. 10). DNA for muse-tung kæde fremmerregionen blev isoleret ud fra en M13-subklon af genomt DNA for muse-tung kæde (M8- α -

RX12, R. J. Deans, ikke publiceret). DNA isoleret fra en Sall samt EcoRI fordøjelse af denne subklon blev modificeret med HindIII-koblere og indsat i HindIII-stedet hos pING2003, hvilket resulterede i den nye cDNA-ekspressionsvektor
5 pING2003E. Denne vektor er anvendelig ved effektiv ekspression af cDNA-gener i mammale celler, især muse-myeloma- eller hybridoma-cellelinier.

Eksempel 2: Kimært human-muse-antiantistofkæde mod HBsAg.

10 (1) Fremstilling af cDNA-kloner og bærere, der indeholder disse, for tung musekædes variable region.

Cellelinien CRL8017 blev opnået ud fra ATCC og subklonet. Subkloner blev dyrket og undersøgt for muse IgG anti-hepatitis B-
15 bindingsaktivitet under anvendelse af et kommercielt tilgængeligt anti-HBsAg-påvisningssæt. Der blev fundet tre positive subkloner. Poly(A)⁺-RNA blev fremstillet ud fra en af disse subkloner og blev fraktioneret på en methylkviksølvagarosegel. RNA'et indeholdt intakte lette kæde- og tunge kæde- mRNA'er
20 hvilket kan sluttes ud fra specifik hybridisering til kappa UIG-MJK-primer og til muse tung kæde UIGMJH3-sonden (se fig. 7). Derudover blev UIG-MJK-primeren anvendt til specifik priming af anti-HBsAg-poly(A)⁺-RNA i en dideoxyrækkefølgereaktion. Tilstrækkelig rækkefølge blev aflæst til at vise at et
25 større kappa-RNA af anti-HBsAg-cellelinien indeholder J_κ2-sekvensen.

Betingelserne for variabel region cDNA-syntese blev gjort optimale under anvendelse af tung og let kæde-UIG-primerer på
30 anti-HBsAg-poly(A)⁺-RNA. Dideoxykædeforlængelseseksperimenter viste at muse UIG-MJK-primer og UIG-JH3-primer korrekt primede kappa og tunge kæde RNA'er. Når omvendt transcription blev udført under fravær af dideoxynucleotider, blev hovedproduktet under anvendelse af kappa UIG-MJK-primeren et 410_±20 nucleotidfragment, mens hovedproduktet under anvendelse af tung kæde
35 UIG-JH3-primeren blev et 430_±30 nucleotidfragment. Dette svarer til de forventede længder af de variable og 5'-ikke-translaterede regioner hos kappa og tunge kæde immunoglobulin-

mRNA'er. Betingelserne for optimal priming af poly(AS)⁺ RNA fra CRL8017-celler burde virke godt for poly(A)⁺ RNA, der er isoleret fra en hvilken som helst cellelinie, der fremstiller et monoklont antistof.

5 Efter bestemmelse af optimale betingelser for priming af hybridoma mRNA med oligonucleotid-primere, blev to oligonucleotider udformet og anvendt til tung kæde V-region cDNA-syntese. Disse to oligonucleotider er UIG-MJHBSTEII(13) og UIG-MJH3
10 (fig. 7 og 8). Det bør bemærkes, at primersekvensen blev udformet til at indføre et BstEII-genkendelsessted (GGTGACC) i klonen, således at det ved dette sted kunne forenes med human IgG1 konstant modulet ved den analoge position hos sidstnævntes J-region. I dette tilfælde havde primeren en enkelt forkert matching mellem G og U med muse-mRNA-sekvensen som anvender J_H3-kodningssekvensen. UIG-MJHBSTEII(13)-primeren var 13
15 baser lang og den forkert matchede rest blev flankeret af 7 matchede 5' og 5 matchede 3' af den. Dette var 13-mer-BstEII-primeren. For at fastsætte primingseffektiviteten af 13-mer-BstEII-oligonucleotidet blev der anvendt en 21-mer-primer, der var specifik for muse-J_H3 (UIG-MJH3). Denne primer havde en
20 perfekt match for 17-nucleotiderne på dens 3'-ende.

Disse to primerer og J_H3-kodningssekvenserne er vist i fig. 8. Første streng cDNA-produkterne fremstillet via 13-mer-BstEII-
25 og 21-mer-J_H3-primerne omfatter bånd på ca. 430 nucleotider, som repræsenterer hele V_H-regionen. Under de anvendte standard primingsbetingelser var primingseffektiviteten af 13-mer-BstEII meget mindre end den af 21-mer-J_H3. I overensstemmelse hermed blev et cDNA-bibliotek fremstillet ud fra første streng
30 syntesen fra hver af disse primerer under anvendelse af metoder beskrevet af Gubler og Hoffman, supra.

Først blev 21-mer-J_H3-biblioteket screenet med 21-mer-J_H3-oligonucleotidet. Filterhybridisering blev udført ved 30°
35 natten over som beskrevet af T. de Lange et al., Cell, 34: 891-900 (1983). Filterne blev derefter vasket ved 51° i 6 x SSC, 0,1% SDS. Der blev udvalgt fem kolonier. Den største havde en indsættelse på ca. 460 bp. Mere signifikant indeholdt

den tre restriktionssteder forudsagt fra den kendte J_H3-sekvens, som er til stede opstrøms for primersekvensen. Denne klon, pJ3-11, blev rækkefølgebestemt under anvendelse af J_H3-primeren ved kæde-afslutningsmetoden (R. B. Wallace et al., *Gene*, 16: 21-26 (1981)). Den opnåede sekvens havde det tilbageværende J_H3-kodningssegment. Lige opstrøms matchede et 13-nucleotidsegment til en D-segmentsekvens (Dsp 2,2), der er publiceret (Y. Kurosawa et al., *J. Exp. Med.*, 155: 201 (1982), og S. Tonegawa, *Nature*, 302: 575 (1983)). Et nonapeptid forudsagt fra dette område viste karakteristisk homologi til de publicerede V-subgrupper af tung musekæde ved aminosyreresterne 86 til 94 omfattende FR3 af de tunge kæde-molekyler. Plasmid pJ3-11 repræsenterede en omarrangeret VDJ-sekvens og indeholdt tilsyneladende anti-hepatitis-V_H-sekvensen produceret af cel-
15 lelinien.

For at isolere en V_H-region-cDNA-klon, som havde et BstEII-sted i J-regionen, blev en AluI til Sau96I, 265 nucleotid lang, sonde fra pJ3-11 dernæst anvendt til at screene cDNA-biblioteket fremstillet ud fra 13-mer-BstEII-primeren. Der blev isoleret seks positive kloner. Den største, pBs13-1, blev yderligere analyseret. Indsættelsen var 280 nucleotider lang og dens restriktionskort var i overensstemmelse med pJ3-11's på nær det introducerede BstEII-sted. Figur 9 illustrerer
20 hvorledes disse to indsættninger blev genkombineret til fremstilling af pMVHca-13, en V_H-klon med det modulforbindende BstEII-sted. Tre yderligere V_H-cDNA-kloner blev isoleret fra et cDNA-bibliotek fremstillet ud fra 21-mer oligonucleotid-
25 UIG-MJH3BSTEII-primeren, der indeholdt et BstEII-sted. Disse kloner kan tilvejebringe, at skiftende V_H-cDNA-sekvenser forenes med humane C_H-sekvenser.
30

(2) Fremstilling af cDNA-kloner og bærere, der indeholder disse, for lette musekædes variable region mod HBsAg.

35 Da J_K2-sekvenser er til stede i mRNA, fremstillet ud fra anti-hepatitis-hybridomacellelinien, blev oligonucleotid-UIG-JK2-BGLII (fig. 7B) udformet til at indføre et BglII-sted ind i J_K2-regionen. Fordøjelse med BglII ville derefter tillade di-

rette indsættelse af en V_{κ} -cDNA-kodningsregion i BclI-stedet hos den tidligere nævnte humane C_{κ} -vektor, pING2001. Denne indsættelse ville resultere i den præcise forening af et muse variabelt region-segment (omfattende J-regionen) med et humant kapp konstante region-segment, hver i den rigtige kodningsramme og uden nogen ændring i aminosyresekvens for hverken muse variabel region eller human konstant region.

JK2BGLII-oligonucleotid blev anvendt til at prime anti-HBsAg-mRNA til at danne et cDNA-bibliotek som for tung kæde, supra, i pUC9. cDNA blev størrelsesudvalgt ved polyacrylamidgelelektroforese før kloning og 80% af cDNA-klonerne blev vist at have indsætningsstørrelser mellem 300 og 750 nucleotider i længden. Replikafiltre af dette bibliotek blev screenet med to oligonucleotider, den originale primer og en anden sonde komplementær til $J_{\kappa 2}$ -sekvens 5' til den originale primer.

Det blev opdaget, at anti-hepatitis-B-monoklon cellelinien CRL 8017 secernerer immunoglobuliner med mindst to forskellige lette kæder. Et af dem hidrører fra myeloma-NS-1, som blev anvendt som en fusionspartner til at frembringe anti-hepatitis-B-cellelinen. Da NS-1 hidrører fra myeloma-MOPC21, blev muligheden af, at MOPC21- V_{κ} -mRNA kan være til stede i V_{κ} -cDNA-biblioteket fra anti-hepatitis-monokloncellelinien undersøgt. Faktisk har en undersøgt cDNA-klon (p6D4B) et restriktionsenzymkort der er identisk til det af MOPC21- V_{κ} -cDNA, bortset fra det indsatte BglII-sted.

Der kan drages to konklusioner fra disse resultater. Den første er, at det er muligt effektivt at anvende et oligonucleotid til at indføre et restriktionsenzymsted, mens en V_{κ} -region klones fra en hybridomacellelinie. Den anden er, at man forsigtigt må undersøge hybridomacelleliner for tilstedeværelsen af flere V-region-sekvenser, hvoraf kun én er den ønskede sekvens.

For yderligere at karakterisere J-regionerne i kapp lette kæder, der er til stede i cellelinie-mRNA, blev poly(A)⁺-RNA bundet til nitrocellulose ved hjælp af formaldehyd-"Dot

blot"-fremgangsmåden, beskrevet af White og Bancroft, J. Biol. Chem., 257: 8569 (1982). RNA blev hybridiseret til ^{32}P -mærket oligonucleotidsonder specifikke for hver funktionel kappa J-region. Disse sonder er vist i fig. 7B som UIG-sonderne 5JK1, MJK, 5JK4 og 5JK5. Resultaterne viste at mRNA hybridiserede kraftigt til både MJK- og 5JK4-oligonucleotidsonder, hvilket viste at både $J_{\kappa}2$ - og $J_{\kappa}4$ -sekvenser var til stede. Da $J_{\kappa}2$ -mRNA tidligere var blevet identificeret som det, der hidrørte fra moderhybridompartner NS-1, blev det konkluderet, at $J_{\kappa}4$ -mRNA koder for anti-hepatitisbindingspecificitet hos CRL 8017-cellerne.

To forskellige cDNA-biblioteker blev screenet for at isolere V-region-kloner, der koder for $J_{\kappa}4$ -sekvenser. Den første blev primet af JK2BGLII, supra. Den anden blev fremstillet under anvendelse af oligonucleotidprimeren, JK4BGLII, som er specifik for $J_{\kappa}4$ -mRNA og indfører et BglII-sted i J-regionen af klonede V-regioner. JK4BGLII-primeren blev anvendt til at prime syntese af den første streng cDNA til konstruktion af et cDNA-bibliotek ved hjælp af den samme metode der blev anvendt til at konstruere et JK2BGLII-primet cDNA-bibliotek, bortset fra at cDNA ikke blev størrelsesudvalgt før kloning.

I fig. 7B vises de forkert matchede, som hver primer har med andre funktionelle muse-kappa-J-region-sekvenser. Bemærk, at $J_{\kappa}4$ har fem forkert matchede i 21-nucleotider, når sammenlignet med JK2BGLII-primeren, og 3 i 23 med JK4BGLII-primeren.

Begge biblioteker blev screenet for V-region-kloner, der indeholdt $J_{\kappa}4$ -sekvenser ved hybridisering til en oligonucleotid-sonde specifik for $J_{\kappa}4$ -sekvenser (5JK4). Resultaterne af screeningen er vist i tabel 1.

Tabel 1 *

Bibliotek	Sondespecificitet.	
	$J_{\kappa}2$	$J_{\kappa}4$
JK2BGLII	2% (30/1500)	0,15% (2/1500)
JK4BGLII	N/D	3,5% (31/875)

* Procentandel af kloner, der indeholder J κ 2- eller J κ 4-sekvenser og en V-region. De anvendte sonder var oligonucleotidet 5JK4 (J κ 4-specificitet, fig. 7) og p6D4B, som indeholder NS-1 (MOPC21) V-region-sekvensen. N/D, ikke udført.

5

Flere J κ 4-V-region-cDNA-kloner isoleret fra begge biblioteker blev karakteriseret. Disse kloner har identiske restriktionsenzymkort omfattende det frembragte BglIII-sted resulterende fra den oligonucleotidprimede cDNA-kloningsfremgangsmåde. Restriktionskortet og sekvensen af en klon, pV17, viser at pV17

10

indeholder V-region-gensekvenser. Disse resultater viser, at JK2BGLII-primer korrekt kunne, selv om ueffektivt, prime J κ 4-mRNA-sekvenser. Da JK2BGLII-primeren har færre forkert matchede med en hvilken som helst anden J κ -region-mRNA end med J κ 4-mRNA (fig. 7B) forventes det, at de

15

andre J κ -mRNA'er kan primes på den korrekte lokalisering med bedre effektivitet under anvendelse af JK2BGLII-primeren. Således kan effektiv cDNA-kloning af en hvilken som helst funktionel muse-kappa-V-region opnås ved anvendelse af en blanding

20

af JK2BGLII- og JK4BGLII-primeren. Placeringen af et BglIII-sted i J-regionen under cDNA-kloning af V-regionerne tillader forening af det klonede muse-V-region-gen-modul til det humane kappa-konstant-region-gen-modul (fig. 9B).

25

Efter at de fornævnte eksperimenter var udført viste det sig at cDNA-klon pV17 manglede en fuldstændig 5'-kodningsregion. Nucleotid-rækkefølgebestemmelse viste at A af initiator-codon'et ATG ikke var kopieret i pV17. Dette var ikke en tilfældig cDNA-kloningsartifakt, da to andre cDNA-kloner havde den samme fejl. To fremgangsmåder blev udformet til opnåelse af et let kædegen med en fuldstændig 5'-kodningsregion.

30

35

Først blev et nyt cDNA-bibliotek konstrueret ved først at prime med et oligonucleotid (5'-ATATTTGCTGATGCTCT-3') komplementær til pV17-sekvenser 155 baser fra 5'-enden. Fra dette bibliotek blev kloner, der hybridiserede til en pV17-DNA-

fragment-sonde, udvalgt og nogle af disse nye cDNA-kloner har
initiatoren ATG samt ca. 20 nucleotider af 5' ikke-
translateret region. En af disse kloner, p2-12, leverer en 5'
ikke-translateret region på 23 nucleotider og et fuldstændigt
5 ATG-initiatorcodon. Når p2-12 blev kombineret med sekvenser
hidrørende fra pV17, blev en variabel region med en fuldstæn-
dig 5'-ende dannet (pING2013E).

10 Dernæst blev sted-rettet mutagenese på den eksisterende lette
kæde-klon anvendt til simultant at fjerne poly-G-området og
placere en ribosom-genkendelsessekvens i nærheden af initia-
toren ATG. PstI-fragmentet fra pV17 blev subklonet ind i
M13mp18. Et oligonucleotid (V17-IVM; 5'-GTGTCGACTCAGCATGAGGT-
15 TCCAGGTTC-3') blev derefter anvendt som en primer til at mu-
tere pV17-sekvensen til at omfatte et Sali-sted og en initia-
tor ATG ind i pV17-sekvensen. Det resulterende plasmid
pV17-IVM tilvejebragte en alternativ muse variabel region til
forening til humane konstante regionmoduler.

20 Den fuldstændige nucleotidsekvens hos den variable region fra
pV17 blev derefter bestemt. Sekvensen viser at pV17 indeholder
en V κ -J κ -forbindelsesregion, der indeholder flere bevarede
aminosyrer og den hybride J κ 2/J κ 4-region, der er dannet ved
priming af J κ 4-RNA med UIG-JK2BGLII-oligonucleotidet. V κ -
25 regionen i pV17 er imidlertid ikke-funktionel, forbi V κ - og
J κ -regionen ikke er i den samme kodningsramme. Translation af
pV17-V-regionen ville således resultere i en abnorm immunoglo-
bulin-let-kæde, hvor J-regionen er translateret i en ukorrekt
ramme. Denne mangel kan forårsages af aberrerende V-J-
forening, resulterende i en ikke-funktionel kappa-mRNA, som er
30 blevet observeret af D.E. Kelley et al., Mol. Cell. Biol.,
5:1660-1675 (1985).

35 Da pV17-V-regionen koder for et abnormt immunoglobulin, er det
meget usandsynligt at denne lette kæde er del af et funktio-
nelt antistofmolekyle mod hepatitis. Disse resultater viser
vigtigheden af, at undersøge hybridomaceller for tilstedevæ-
relsen af flere RNA-arter, der koder for V-regioner, hvoraf
kun én er den ønskede sekvens.

Yderligere screening af CRL 8017-cDNA-biblioteker blev udført for at lede efter V_{κ} -cDNA-kloner, som ikke er fra nogen af de to V_{κ} -cDNA-klasser, der er fundet indtil nu (MOPC21-p6D4B, pV17). Først blev et oligo-dT-primet cDNA-bibliotek, der var fremstillet ud fra CRL8017-RNA, screenet med en DNA-fragment-sonde specifik for kappa konstant regionen, og separat med sonder specifik for MOPC21- og pV17- V_{κ} -regioner. En cDNA-klon (p1E9L-81), som indeholder kappa konstant regionen, men har en anden V_{κ} region end den hos MOPC21 eller pV17, blev opdaget. Denne metode, at screene oligo-dT-primede cDNA-biblioteker, er et anvendeligt alternativ til oligonucleotid-screening af cDNA-biblioteker, forbi hak-translaterede sonder med høj specifik aktivitet anvendes. Denne metode muliggør også den simultane isolering af flere klasser af V-region-kloner, såsom alle V_{κ} -kloner, ved hjælp af passende sondevalg. Dernæst blev det UIG-JK28GLII-primede cDNA-bibliotek, der var fremstillet ud fra CRL 8017-RNA, screenet med UIG-5JK2-oligonucleotid-sonden (se fig. 7). Der blev fundet en ny klasse af V_{κ} -cDNA-kloner, hvis medlemmer er homologe til p1E9L-81 og hybridiserer til UIG-5JK2-sonden, men ikke til en MOPC21- V_{κ} -sonde. Restriktionsendonucleasested-kortene og nucleotidsekvenserne hos disse kloner er også forskellig fra MOPC21-homologe V_{κ} -cDNA-kloner fra CRL8017-celler. Disse kloner har imidlertid en aberrerende V-J-forbindelse, som resulterer i et ikke-funktionelt mRNA, og er tilsyneladende identisk til ét beskrevet af Cabilly og Riggs (Gene, 40:157 (1985)).

Det blev derfor konkluderet, at anti-hepatitis-B-cellelinien CRL8017 har mindst tre klasser af V_{κ} -mRNA, der svarer til de ovenfor beskrevne cDNA-kloner p6D4B (MOPC21), p1E9L og pV17. p1E9L- og pV17-klonerne hidrører fra mRNA fra aberrerende omdannede kappa-gener, mens p6D4B-klonen hidrører fra moderhybridoma fusionspartneren NS-1. Ingen af disse kloner ser ud til at kode for den ønskede lette kæde mod hepatitis.

(3) Fremstilling og ekspresion af tung kæde, der indeholder human konstan/muse-variable regioner.

V-regionsekvenserne i pMVHCa-13 blev knyttet til den humane IgG1-konstant-(C)-region-klon pGMH6. På grund af tilstedevæ-

relsen af et andet BstEII-sted inden i IgG1 CH1-regionen hos pGMH-6 var en flertrinligerings nødvendig. Først blev 220 nucleotid BstEII-fragmentet fra J-CH1-regionen hos pGMH-6 liggeret til 1100 nucleotid-IgG-regionen BstEII til BamHI fragmentet hos pGMH-6. I en separat ligerings blev 420 nucleotid BstEII til BamHI fragmentet hos pMVHCa-13, som omfatter muse-V-regionen, knyttet til en kalvetarmphosphatase-behandlet BamHI-plasmidvektor. De to ligerings blev derefter forenet, ligase blev tilsat og produkterne blev transformeret ind i HB101, hvilket resulterede i den kimære muse-V-human-C-klon pMVHCC-24 (fig. 9A).

V-regionen af det hybride tunge kæde-gen i pMVHCC-24 blev yderligere analyseret ved partiel sekvensanalyse. Denne analyse viste at den klonede V-region indeholdt en D-sekvens, som matchede en kendt D-sekvens, DSP2,2 (Kurosawa og Tonegawa, supra). Sekvensen forudsagde også et lederpeptid med 19 aminosyrer, der ligner de kendte muse-V-tunge-kæde-lederpeptidsekvenser, og en 5' ikke-translateret region på mindst 3 nucleotider.

BamHI-fragmentet, der indeholder de muse-humane hybride tunge kæde-gen af pMVHCC-24 blev klonet i BamHI-fordøjet pING2003E-vektor, resulterende i ekspressionsplasmid pING2006E (fig. 11). pING2006E-plasmidet bør have en forøget sandsynlighed for effektiv ekspression af det kimære muse-human-immunoglobulin-gen i B-lymfoidceller på grund af tilstedeværelsen af muse-tunge-kæde-fremmer-regionen.

En modificering af det kimære tunge kæde-gen til stede i pMVHCC-24 blev udført for at tilvejebringe et alternativt tungt kæde-gen som mangler oligo-dC-regionen forudgående for initiatoren ATG. pING2012E- og pING2006E-vektorerne er identiske på nær nucleotiderne umiddelbart før ATG, som vist i fig. 12.

Bakterier, der gemmer pING 2006E- og pSV2-neo-plasmiderne, blev omdannet til protoplaster ved hjælp af fremgangsmåden beskrevet af R.M. Sandri-Goldin et al., Mol. Cell. Biol, 1:743 (1981). Protoplasterne blev derefter separat sammensmeltet til

SP2/0-Ag14-hybridomaceller (ATCC CRL 1581) ved behandling med polyethylenglycol (A. Ochi et al., Nature, 302: 340, 1983). De sammensmeltede celler fik lov til at komme sig i 72 timer i fuldstændigt medium, før udspreddning med 10.000 eller 50.000 celler pr. brønd i en vævskulturplade med 96 brønde. Cellerne blev udvalgt med G418 ved 0,8 mg/ml i to uger, hvorefter vækst i nogen brønde var ganske tydelig. Under disse udvælgelsesbetingelser blev Sp2/0-celler fuldstændigt dræbt i løbet af 4-7 dage af G418. Kun celler som havde integreret og udtrykt det i vektorerne tilstedeværende neo-gen vil vokse under G418-udvælgelse. Antallet af brønde, der var positive for vækst ved disse integrative transfektanter, er vist i tabel 2.

Tabel 2 *

Stamme/ plasmid	10.000 celler/brønd	50.000 celler/brønd
MC1061/pING2006E	3 (13%)	12 (50%)
MC1061/pSV2-neo	7 (29%)	4 (17%)
MC1061/ingen	0	0

* Procentandel af brønde, der viser positiv vækst ud af 24 brønde .

Celler transficeret med pING2006E og pSV2-neo blev undersøgt for immunoglobulin-gen-ekspression ved RNA- og proteinniveauet. Samlet celle-RNA blev fremstillet ud fra transficerede celler, der var bundet til nitrocellulose og hybridiseret til hak-translaterede sonder, specifikke for det muse-humane hybrid tunge kæde-gen. To kloner blev fundet som havde et stærkt signal, hvilket repræsenterer ekspression af genet ved RNA-niveauet. Mængden af samlet cellulær-RNA hybridiseret til muse-human-sonden viste sig at være ca. 1/10 af niveauet af tung kæde-RNA i de oprindelige hybridomaceller. Dette repræsenterer sandsynligvis ca. 1% af det samlede mRNA af den transficerede celle.

De transficerede muse-celler blev også undersøgt for produktion af cytoplasmisk humant tung-kæde-protein ved hjælp af en

ELISA-bestemmelse. Det viste sig at 3 ud af 7 pING2006E-transficerede cellelinier frembragte påviselige mængder af humant tung-kæde-protein. Muse-celle-transformanten, der producerede det meste muse-human-tung-kæde-protein, gav et signal i
5 ELISA-bestemmelsen sammenlignelig til den af en 1/100-fordyning af et humant B-cellelinieproducerende intakt humant immunoglobulin-IgG1. Denne beskedne mængde af påvist muse-human tung-kæde-protein kan skyldes flere faktorer, omfattende ustabilitet af tunge kæder i nærværelse af lette kæder i hybridomacller, eller ukorrekt fremstilling af det kimære gen-
10 transcript.

(4) Gen-forstærkning af det integrerede kimære gen.

Southern-plet-analyse viste at flere kopier af pING2006E-DNA-sekvenserne var integreret dobbelt i muse-genomet. Restriktionszymer ApaI og BglIII kløver begge pING2006E enkeltvis. I
15 transformanten, 2AE9, blev et bånd fra en ApaI- eller BglIII-fordøjelse af den forventede størrelse (8,2 kb) fundet at hybridisere til de humane C- γ -1-sekvenser (resultater ikke vist). Et BamHI-bånd med den korrekte størrelse (1,6 kb) viste sig at hybridisere til det humane såvel som til 1E9-V_H-sekvenserne. Gen-kopititreringseksperiment (fig. 14) viste at der er ca. 5 kopier af pING2006E i 2AE9-genomet. Den kendsgerning, at kun et enkelt bånd blev påvist i ApaI- eller BglIII-banen
20 viser, at disse individuelle kopier er i en dobbelt-arrangeret opstilling. Et sæt af dobbelt fordøjelser viser at pING2006E-sekvenser ikke undergik nogen omarrangering ved deres indføring i muse-DNA (resultater ikke vist).
25

Dernæst blev 2AE9-celler transficeret med et plasmid, som indeholder en anden udvælgelig markør, gpt-genet, og udvalgte kloner, der vokser ud i DMEM-HAT. En klon, 2BH10, har ca. 38 ng opløseligt humant γ -1-protein pr. 10^6 -celler. Southern-analyse viste at 2BH10 har ca. 30 kopier af pING2006E (fig. 14). De blev forstærket fra de 5 kopier i 2AE9 uden omdannelse af DNA-sekvenserne. (Sammenlign 2AE9-feltet til 2BH10). S1-
35 resultater (resultater ikke vist) viste at denne forøgelse i skabelon førte til en højere mængde IgG-gen-transcripter. Det

antages, at disse sekvenser blev co-forstærket med nærliggende cellulære sekvenser som et resultat af den anden udvælgelse.

Eksempel 3: Et kimært human-muse-antistof med cancerantigenspecificitet.

5

(1) Antistof L6.

Monoklont L6-antistof (MAb) blev opnået ud fra en mus, som var blevet immuniseret med celler fra et human lungecarcinom, hvorefter vildtceller blev hybridiseret med NS-1-muse-myelomaceller. Antistoffet binder til et tidligere ikke identificeret carbohydrateantigen, som udtrykkes i store mængder ved overfladen af celler fra de fleste humane carcinomaer, omfattende lungecarcinom (adeno, squamosus), brystcarcinomer, coloncarcinomer og ovariecarcinomer, mens antigenet kun er til stede i spormængder i normale celler fra den voksne vært. MAb L6 er en IgG2a og kan formidle antistofafhængig cellulær cytotoxicitet, ADCC, i nærværelse af humane perifere blodleukocytter som en kilde for effektorceller, for at lyse L6-positive tumorceller, og det kan lyse L6-positive tumorceller i nærværelse af human serum som en kilde for komplement, idet lysisen påvises som frigivelsen af ^{51}Cr fra mærkede celler i løbet af en 4 timers inkubationsperiode. MAb L6 kan lokalisere L6-positive tumorer, xenotransplanteret på nøgne mus, og det kan inhibere udvæksten af sådanne tumorer. MAb L6 er beskrevet i Cancer Res. 46:3917-3923, 1986 (angående MAb-specificitet) og i Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7059-7063, 1986 (angående MAb-funktion).

30

(2) Identifikation af J-sekvenser i immunoglobulin-mRNA af L6.

35

Frosne celler blev optøet på is i 10 minutter og derefter ved stuetemperatur. Suspensionen blev fortyndet med 15 ml PBS og cellerne blev centrifugeret ned. De blev gensuspenderet, efter vask i PBS, i 16 ml 3M LiCl, 6M urinstof og blev revet fra hinanden i en polytronklipper. Fremstillingen af mRNA og udvælgelsen af poly(A⁺)-fraktionen blev udført som beskrevet af C. Auffray og F. Rougeon, Eur. J. Biochem. 107:303, 1980.

Poly(A⁺)-RNA fra L6 blev hybridiseret individuelt med mærket J_H1-, J_H2-, J_H3- og J_H4-oligonucleotider under betingelser beskrevet af Nobrega et al., Anal. Biochem 131:141, 1983). Produkterne blev derefter underkastet elektroforese i en 1,7% agarose-TBE-gel. Gelen blev bundet i 10% TCA, suget tør og udsat for autoradiografi. Resultaterne viste at L6 V_H indeholder J_H2-sekvenser.

For analysen af V_K-mRNA blev "Dot-Blot"-fremgangsmåden beskrevet af White og Bancroft, J. Biol. Chem. 257:8569, (1982) anvendt. Poly(A⁺)-RNA blev immobiliseret på nitrocellulosefiltre og blev hybridiseret til mærket sonde-oligonucleotider ved 40° i 4xSSC. Disse eksperimenter viser at L6 indeholder J_K5-sekvenser. En svag hybridisering til J_K2 blev iagttaget.

15 (3) V-region-cDNA-kloner.

Et bibliotek primet af oligo-(dT) på L6-poly(A⁺)-RNA blev screenet for kappa-kloner med en muse-C_K-region-sonde. Fra L6-biblioteket blev flere kloner isoleret. En anden screening med en 5' J_K5-specifik sonde identificerede L6 (J_K5) lette kæde-kloner. Tunge kæde-kloner af L6 blev isoleret ved screening med J_H2-oligonucleotid.

De tunge og lette kæde-gener eller genfragmenter fra cDNA-klonerne, pH3-6a og pL3-12a, blev indsat i M13-bakteriofagvektorer for nucleotidsekvensanalyse. De fuldstændige nucleotidsekvenser af den variable region hos disse kloner blev bestemt (fig. 15 og 16) ved hjælp af dideoxykædeafslutningsmetoden. Disse sekvenser forudsiger V-region-aminosyresammensætninger, som stemmer godt overens med de observerede sammensætninger, og forudsiger peptidsekvenser, som er blevet bekræftet af direkte aminosyrerækkefølgebestemmelse af dele af V-regionerne.

35 cDNA-klonernes nucleotidsekvenser viser at de er immunoglobulin-V-region-kloner, da de indeholder aminosyrerester, der viser V-områder (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest; U.S. Dept of HHS, 1983).

L6 V_H hører til subgruppe II. cDNA forudsiger en N-endesekvens på 24 aminosyrerester, der er identisk til den hos en kendt V_H (45-165 CRI; Margolies et al., Mol. Immunol. 18:1065, 1981). L6 V_H har J_H2-sekvensen. L6 V_L er fra V_K-KpnI-familien (Nishi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:6399, 1985) og anvender J_K5. Det klonede L6 V_L forudsiger en aminosyresekvens, som blev bekræftet ved aminosyrerækkefølgebestemmelse af peptider fra L6's lette kæde, svarende til rester 18-40 og 80-96.

(4) In vitro mutagenese til at frembringe restriktionsenzymsteder i J-regionen til forening med et humant C-modul og til fjernelse af oligo(dC)sekvenser 5' til V-modulerne.

Begge kloner frembragt fra priming med oligo(dT) L6-V_K og L6-V_H behøver at blive modificeret. For L6 V_K blev J-region-mutagenese-primeren J_KHindIII, som vist i fig. 17B, anvendt. Et humant C_K-modul hidrørende fra en cDNA-klon blev mutageniseret til at indeholde HindIII-sekvensen (se fig. 17A) Mutagenesereaktionen blev udført på M13-subkloner af disse gener. Frekvensen af mutante kloner lå i området fra 0,5 til 1% af de opnåede plaquer.

Det er tidligere blevet iagttaget at oligo(dT)-sekvensen opstrøms for AUG-codonet i et V_H kimært gen virker forstyrrende på den korrekte splejsning i en særlig genkonstruktion. Det blev estimeret at ca. så mange som 70% af RNA-transcripterne havde undergået forkert splejsning, hvori en ukendt 3'-splejseacceptor i ledersekvensen var anvendt. Derfor blev oligo(dC)-sekvensen opstrøms for initiatoren AUG fjernet i alle klonerne.

I en fremgangsmåde blev et oligonucleotid anvendt som indeholder et SalI-restriktionssted for at mutagenisere L6 V_K-klonen. Den anvendte primer for denne oligonucleotid-rettede mutagenese er en 22-mer, som introducerer et SalI-sted mellem oligo(dC) og initiatoren met-codon (fig. 19).

I en anden fremgangsmåde blev nucleasen BAL-31 anvendt til at tygge oligo(dC) i L6 V_H-klonen pH3-6a væk. Størrelsen af dele-

tionen i de to mutanter, der blev opnået, blev bestemt ved nucleotidrækkefølgebestemmelse og er vist i fig. 17. I begge af disse mutanter (δ4 og δ21) blev hele oligo(dC) 5' for kodningsregionen deleteret.

5

Disse kloner blev derefter modificeret ved hjælp af oligonucleotid-rettet mutagenese med MJH2-ApaI-primer (fig. 17). Denne primer med 31 baser introducerer et ApaI-sted i muse-C_H-genet ved en stilling, der er analog til et eksisterende
10 ApaI-sted i human-C-γ-1-cDNA-gen-modul. Primeren indfører de passende codoner for human-C-γ-1-genet. Det kimære tunge kædegen, fremstillet ved forening af det mutageniserede muse-V_H-gen-modul med et humant C_H-modul, koder således for et kimært protein, som ikke indeholder nogle humane aminosyrer for hele
15 V_H-regionen.

Det humane C-γ-1-gen-modul er et cDNA hidrørende fra GM2146 celler (Human Genetic Mutant Cell Repository, Newark, New Jersey). Dette C-γ-1-gen-modul blev tidligere forenet med et
20 muse-V_H-gen-modul til dannelse af det kimære ekspressionsplasmid pING2012E.

(5) L6 kimære ekspressionsplasmider.

L6 kimære tunge kæde-ekspressionsplasmider blev afledt fra om-
25 placeringen af V_H-modulet pING2012E med V_H-moduler af mutanter δ21 og δ4 til opnåelse af ekspressionsplasmiderne pING2111 og pING2112 (fig. 17). Disse plasmider dirigerer syntesen af kimære L6 tunge kæde, når transficeret ind i mammae celler.

30 For det kimære L6 lette kæde-gen blev fragmentet SalI til HindIII af muse-V_K-modulet forenet med det humane C_K-modul ved hjælp af fremgangsmåden beskrevet i fig. 18 til dannelse af pING2119. Erstatning af neo-sekvensen med E. coli-gpt-gen hidrørende fra pSV2-gpt resulterede i pING2120, som udtrykte kimære L6 lette kæde og giver mycophenolisk syremodstand, når
35 transficeret ind i mammae celler.

Inklusionen af både kimære tunge kædegener og kimære lette kædegener i det samme plasmid muliggør indføringen ind i trans-

ficerede celler i et 1:1-genforhold mellem tunge og lette kædegener, hvilket fører til en balanceret gendosering. Dette kan forbedre ekspression og formindske manipulationer af transficerede celler til optimal kimær antistofekspression.

5 Til dette formål blev DNA-fragmenterne hidrørende fra de kimære tunge og lette kædegener af pING2111 og pING2119 forenet i ekspressionsplasmidet pING2114 (fig. 19). Dette ekspressionsplasmid indeholdt en udvælgelig neo^R-markør og separate transcriptionenheder for hvert kimært gen, hver indeholdende

10 en muse-tung-kædefremmer.

Modifikationerne og V-C-forbindelsesregionerne hos de kimære L6-gener er opsummeret i fig. 20.

(6) Stabil transfektion af muse lymfoide celler til produktionen af kimært antistof.

15

Elektroporation blev anvendt (Potter et al., supra; Toneguzzo et al., Mol. Cell Biol., 6: 703, 1986) for indføringen af L6 kimært ekspressionsplasmid-DNA i muse-Sp2/0-celler. Elektroporationsteknikken gav en transfektionsfrekvens på 1-10 x 10⁻⁵ for Sp2/0-cellerne.

20

To-gen ekspressionsplasmidet pING2114 blev lineariseret ved fordøjelse med AatII-restriktionsendonuclease og transficeret ind i Sp2/0-celler til opnåelse af ca. 50 G418-modstanddygtige kloner, som blev screenet for syntese af human tung og let kæde.

25

Niveauerne for syntese af kimær antistof kæde fra de to fremstillere, D7 og 3E3, er vist i tabel 3. Kimær-L6-antistof blev fremstillet ved at dyrke D7-transfektantcellerne i 24 timer ved 2x10⁶ celler pr. ml i 5 liter DMEM, suppleret med HEPES-puffer og penicillin og streptomycin. Supernatanten blev koncentreret over en Amicon YM30-membran i 10mM natriumphosphatpuffer, pH-værdi 8,0. Det fremstillede blev hældt på en DEAE-cellulosesøjle, som adskilte immunoglobulinet i ubundne og bundne fraktioner. Prøver fra DEAE-ubundet, DEAE-bundet og præ-DEAE præparat (fremstillet fra 1,6 µl medium) blev separat

30

35

oprenset ved affinitetskromatografi på en protein-A "Sephacrose"-søjle, idet der blev elueret med 0,1M natriumcitrat, pH-værdi 3,5. Det eluerede antistof blev neutraliseret og koncentreret ved Amicon-centricon-filtrering i phosphatpufret saltopløsning. Udbytterne for de tre præparater var 12 µg (DEAE-ubundet), 6 µg (DEAE-bundet) og 9 µg (præ-DEAE-søjle). Western-analyse af antistofkæderne viste at de var forenet i H₂L₂-tetramerlignende naturlige immunoglobuliner.

(7) En anden oprensning for kimært L6-antistof secerneret i vævskultur.

a. Sp2/0.pING2114.D7-celler blev dyrket i kulturmedium (DMEM (Gibco nr. 320-1965)), suppleret med 10% føtal bovins serum (Hyclone nr. A-1111-D), 10mM HEPES, 1xglutamin-Pen-Strep (Irvine Scientific nr. 9316) til 1 x 10⁶ celle/ml.

b. Cellerne blev derefter centrifugeret ved 400 x g og gensuspenderet i serumfri kulturmedium ved 2 x 10⁶ celle/ml i 18-24 timer.

c. Mediet blev centrifugeret ved 4000 o/min. i en JS-4,2 rotor (3000 x g) i 15 minutter.

d. 1,6 liter supernatant blev derefter filtreret gennem et 0,45 mikron filter og derefter koncentreret over et YM30 (Amicon Corp.) filter til 25 ml.

e. Ledeevnen af den koncentrerede supernatant blev indstillet til 5,7-5,6 mS/cm og pH-værdien indstillet til 8,0.

f. Supernatanten blev centrifugeret ved 2000 x g, 5 minutter, og derefter hældt på en 40 ml DEAE-søjle, der var ækvilibreret i forvejen med 10mM natriumphosphat, pH-værdi 8,0.

g. Den gennemstrømmede fraktion blev opsamlet og hældt på en A-"Sephacrose" (Sigma) søjle med 1 ml protein, der var ækvilibreret i forvejen med 10 mM natriumphosphat, pH-værdi 8,0.

h. Søjlen blev først vasket med 6 ml 10mM natriumphosphat-puffer, pH-værdi 8,0, efterfulgt af 8 ml 0,1M natriumcitrat,

pH-værdi 3,5, derefter med 6 ml 0,1M citronsyre (pH-værdi 2,2). Fraktioner på 0,5 ml blev opsamlet i rør, der indeholdt 50 µl 2M tris base (Sigma).

5 i. Størstedelen af IgG var i elueringen med pH-værdi 3,5 og blev forenet og koncentreret over Centricon 30 (Amicon Corp.) til ca. 0,06 ml.

10 j. Pufferen blev ændret til PBS (10mM natriumphosphat, pH-værdi 7,4, 0,15M NaCl) i Centricon 30 ved gentagen fortynding med PBS og genkoncentrering.

k. IgG-opløsningen blev derefter indstillet til 0,10 ml og bovint serum albumin (fraktion V, U.S. Biochemicals) blev sat til 1,0% som et stabiliseringsreagens.

15 (8) Produktion og oprensning af kimært L6-antistof secerneret i ascitesvæske.

20 a. Ascitesvæske blev først centrifugeret ved 2.000 x g i 10 minutter.

b. Ledeevnen af supernatanten blev indstillet til 5,7-5,6 mS/cm og dens pH-værdi indstillet til 8,0.

25 c. Supernatanten blev derefter hældt på en 40 ml DEAE-cellulosesøjle, der var ækvilibreret i forvejen med 10mM Na₂PO₄H, pH-værdi 8,0.

30 d. Det gennemstrømmede fra DEAE-søjlen blev opsamlet og dets pH-værdi blev indstillet til 7,4 og derefter hældt på en "Sepharose"-søjle med 1,0 ml gede-anti-human-IgG (H+L).

e. Søjlen blev først vasket med 6 ml 10mM natriumphosphat, 0,5M natriumchlorid, efterfulgt af 8 ml 0,5M NH₄OH og 3M natriumthiocyanat.

35 f. Natriumthiocyanateluatet blev forenet og dialyseret mod 2 l PBS natten over.

Antistoffet kan yderligere koncentreret ved trinnene j. og k. i den forudgående fremgangsmåde.

Tabel 3.

Niveauer af secerneret kimære-L6-kæder fra Sp2/0-transfektanter^a.

Dyrkningsbetingelser	FBS	Sp2/0.D7		Sp2/0.3E3	
		kappa ^b	γ ^c	kappa ^b	γ ^c
1. 20 ml, 2d, podet@ 2x10 ⁵ /ml	+	17	77	100	700
2. 200 ml, 2d, podet@ 2,5x10 ⁵ /ml	+	0,9	6	80	215
3. 200 ml, 1d, podet@ 2x10 ⁶ /ml	-	1,9	3,8	97	221
4. Balb/c ascites	-	5.160	19.170	ND	ND

a - Sp2/0-celler transficeret ved elektroporation med pING2114(pL6HL).

b - µg/l målt ved ELISA specifikt for human-kappa-human Bence-Jones-proteinstandard.

c - µg/l målt ved ELISA specifikt for human-γ-human-IgG-standard.

ND - Ikke bestemt.

FBS: Føtal bovinserum.

(9) Undersøgelser foretaget af det kimære L6-antistof.

Først blev prøverne undersøgt med et bindingsforsøg, hvori celler fra både en L6 antigenpositiv og en L6 antigennegativ cellelinie blev inkuberet med standard-muse-monoklonantistof L6, kimært L6-antistof hidrørende fra cellekultur-supernatanterne og kimært L6-antistof hidrørende fra ascites (som tidligere beskrevet) efterfulgt af et andet reagens, fluorescein-isothiocyanat-konjugeret gede-antistoffer (FITC) over for humant (eller mus for standarden) immunoglobulin.

Da bindingsforsøget viste stærkt reaktivitet hos det kimære L6 med den L6 antigenpositive cellelinie og total mangel på reakt-

tivitet med den negative cellelinie var det næste trin at undersøge for det kimære L6's evne til at inhibere bindingen mellem muse-L6 og antigenpositive celler, sådanne inhiberingsundersøgelser, anvendes rutinemæssigt til at etablere identiteten af to antistoffers genkendelse af antigen. Disse resultater er diskuteret nedenfor (inhibering af binding). Som del af disse undersøgelser blev der foretaget et groft estimat af antistofivrighed (aviditet).

Endelig blev to aspekter af antistoffunktion undersøgt, nemlig evnen til at formidle ADCC i nærværelse af humane periferae blodleukocytter og evnen til at dræbe L6-positive tumorceller i nærværelse af human serum som en kilde for komplement (se "funktionelle forsøg" nedenfor).

Bindingsforsøg. Celler fra en human coloncarcinomalinie, 3347, som tidligere er blevet vist at udtrykke ca. 5×10^5 molekyler L6-antigen ved celleoverfladen, blev anvendt som mål. Celler fra T-cellelinien HSB2 blev anvendt som en negativ kontrol, da de i overensstemmelse med tidligere undersøgelser ikke udtrykker påviselige mængder af L6-antigenet. Målcellerne blev først inkuberet i 30 minutter ved 4°C med enten det kimære L6 eller med muse-L6-standard, som var blevet oprenset fra muse-ascites. Dette blev efterfulgt af inkubering med et andet FITC-mærket reagens, som for det kimære antistof var gede-anti-human-immunoglobulin, opnået fra TAGO (Burlingame, CA) og anvendt i en fortynding på 1:50. For muse-standard var det gede-anti-mus-immunoglobulin, også opnået fra TAGO og anvendt i en fortynding på 1:50. Antistofbinding til celleoverfladen blev bestemt under anvendelse af en Coulter Model EPIC-C-cellesorterer.

Som vist i tabel 4 og 4A bandt både det kimære L6 og muse-standard L6 signifikant og ca. i den samme udstrækning til den L6-positive 3347-linie. De bandt ikke over baggrundsstøj til den L6-negative HSB2-linie.

På baggrund af den kendsgerning, at de tre forskellige kimære L6-prøver anført i tabel 4 opførte sig ensartet i bindingsfor-

søgene, blev de forenet til inhiberingsundersøgelserne anført nedenfor. De samme inhiberingsundersøgelser blev udført for kimær L6 hidrørende fra ascitesvæske anført i tabel 4A.

5 Bindingsinhibering.

Som det næste trin blev den udstrækning, til hvilken trindelte doser af det kimære L6-antistof eller standard-muse-L6 kunne inhibere binding af en FITC-mærket muse-L6 til overfladen af antigenpositive 3347-coloncarcinomceller.

10

Både det kimære L6- og muse-standard-L6 inhiberer bindingen af det direkte mærkede L6-antistof, idet bindingskurverne er parallelle. Det kimære antistof var en smule mindre effektivt end standarden, som indikeret af resultaterne, som viste at 3,4 $\mu\text{g/ml}$ af det forenede kimære L6 MAb, sammenlignet med 2,0 $\mu\text{g/ml}$ af standard-muse-L6 MAb, var nødvendigt for 50% bindingsinhibering, og at 5,5 $\mu\text{g/ml}$ af det kimære L6 (hidrørende fra ascites) sammenlignet med 2,7 $\mu\text{g/ml}$ af standard-muse-6 MAb var nødvendigt for 50% bindingsinhibering.

15

20

Som en del af disse undersøgelser blev et groft estimat foretaget af antistofivrighed. Standard-muse-L6-ivrighed var tidligere blevet bestemt til ca. 4×10^8 . Resultaterne viste at der ikke var nogen signifikante forskelle i ivrighed mellem det kimære L6 og muse-L6.

25

Funktionsforsøg.

Der blev foretaget en sammenligning mellem de kimære L6's og standard-muse-L6's evner til at lyse L6-antigenpositive celler i nærværelse af humane periferae blodleukocytter som en kilde for effektorceller (formidlende antistofafhængig cellulær cytotoxicitet, ADCC) eller humanserum som kilde for komplement (formidlende komplementafhængig cytolyse, CDC).

30

35

Som vist i tabel 5 og tabellerne 5A-5D var det kimære L6 overlegent over for den samtidige undersøgte prøve af muse-L6 m.h.t. at forårsage ADCC, som målt ved et 4 timers ^{51}Cr -frigivelsesforsøg.

I tabellerne 6 og 6A-6B anføres resultaterne fra undersøgelser på komplementformidlet målcellelysis. I dette tilfælde blev en høj cytolytisk virkning observeret både med muse-L6-antistofferne og de kimære L6-antistoffer.

5

Konklusioner.

De ovenfor anførte resultater viser et antal vigtige, uventede kvaliteter ved det kimære monoklone L6-antistof ifølge opfindelsen. For det første binder det kimære L6-antistof til L6-antigenpositive tumorceller i ca. den samme udstrækning som muse-L6-standarden og med ca. den samme aviditet. Dette er signifikant af de følgende grunde: L6-antistoffet fastlægger (a) et overfladecarbohydratantigen, og (b) et proteinantigen med ca. 20.000 dalton, hvoraf hver er karakteristisk for ingen-lille celledungetcarcinomer (NSCLC) og visse andre humane carcinomer. L6-antistoffet binder ikke signifikant påviseligt til normale celler, såsom fibroblaster, endotheliale celler eller epitheliale celler i de større organer. Således bestemmer det kimære monoklone L6-antistof et antigen, som er specifikt for carcinomceller og ikke normale celler.

10
15
20

Ud over evnen hos de kimære monoklone L6-antistoffer ifølge opfindelsen til at binde specifikt til ondartede celler og lokalisere tumorer, udviser det kimære-L6 indgående biologiske virkninger med hensyn til at binde til dets mål, hvilket gør det kimære antistof til en hovedkandidat for tumorimmunoterapi. Resultaterne anført heri viser, at kimært L6 er i stand til at binde til tumorceller og ved binding dræbe tumorcellerne, enten ved ADCC eller CDC. Sådan tumor-drabs-virkning blev vist under anvendelse af koncentrationer af kimært L6-antistof så lave som 0,01 µg/ml (10 ng/ml).

25
30

Selv om udsigten til at forsøge tumorterapi under anvendelse af monoklone antistoffer er attraktivt, idet nogle delvise tumortilbageslag er blevet rapporteret, har sådan monoklonantistofterapi til dato været mødt med begrænset succes (Houghton, februar 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82:1242-1246). Den terapeutiske effektivitet af monoklone museantistoffer

35

(som er de, som er blevet forsøgt indtil nu) ser ud til at være for lav for de fleste praktiske formål. Opdagelsen af den indgående biologiske aktivitet af kimært L6 koblet med dets specificitet for et carcinoantigen gør det kimære L6-antistof til et terapeutisk middel, der kan vælges til behandling af tumorer in vivo. På grund af de "humane" egenskaber som vil gøre de kimære monoklone L6-antistoffer mere resistente over for clearance in vivo vil de kimære monoklone L6-antistoffer desuden fordelagtigt anvendes ikke kun til terapi med umodificerede kimære antistoffer, men også til udvikling af forskellige immunokonjugater sammen med lægemidler, toxiner, immunomodulatorer, isotoper osv., såvel som for diagnostiske formål, såsom in vivo afbildning af tumorer under anvendelse af passende mærkede kimære L6-antistoffer. Sådan immunokonjugationsteknik er kendt for fagmanden indenfor området og kan anvendes til at modificere de kimære L6-antistofmolekyler ifølge den foreliggende opfindelse.

To illustrerende cellelinier der udskiller kimært L6-antistof blev deponeret før denne ansøgnings indleveringsdag hos ATCC, Rockville Maryland. Disse er transficeret hybridoma-C255 (svarende til 3E3-celler, supra), ATCC HB 9240 og transficeret hybridoma C256 (C7-celler, supra), ATCC HB 9241. Se bilag 1 og 2.

(10) Ekspresion i gær af L6-kæder.

Genetiske sekvenskodninger for kimært L6-antistofets tunge og lette kæder blev fremstillet og indført i vektorer. Gærceller blev transformeret dermed, og ekspresion af separate tunge og lette antistofkæder for L6-antistof blev påvist.

Den foreliggende opfindelse er ikke ment som værende begrænset i omfang med de deponerede cellelinier, da den deponerede udførelsesform er ment som en enkelt illustration af et aspekt af opfindelsen og alle cellelinier som er funktionelt ækvivalente er inden for opfindelsens omfang. I virkeligheden adskillige modifikationer af opfindelsen ud over de, som er vist inden for området fra den foregående beskrivelse og tilhørende

tegninger. Sådanne modifikationer er ment at falde inden for de vedføjede kravs omfang.

Tabel 4.

5 Bindingsforsøg med kimært L6-antistof og monoklont L6-museantistof til en L6-antigenpositiv cellelinie og L6-antigen-negativ cellelinie.

		Bindingsforhold for*	
		H3347-celler (L6+).	
Antistof	Portion	GAM	GAH
Standard L6		56,6	4,2
Kimært L6	a	1,3	110,3
	b	1,3	110,3
	c	1,3	110,3
		Bindingsforhold for*	
		HSB-2-celler (L6-)	
		GAM	GAH
Standard L6		1,1	1,1
Kimært L6	a	1,0	1,0
	b	1,0	1,1
	c	1,0	1,1

* Alle forsøg blev udført under anvendelse af en antistofkoncentration på 10 µg/ml. Bindingsforholdet er det antal af gange klarere end prøve er end en kontrolprøve behandlet med GAM (FITC-konjugeret gede-anti-mus) eller GAH (FITC konjugeret gede-anti-human) alene. Et forhold på 1 betyder at prøven er lige så klar som kontrollen, et forhold på 2 mener at prøven er to gange så klar som kontrollen osv..

35 Tabel 4A.

Bindingsforsøg med kimært L6-antistof og monoklont museantistof til en L6-antigenpositiv cellelinie og en L6-antigen-negativ cellelinie.

	Antistof	Antistofkon- centration ($\mu\text{g/ml}$)	Bindingsforhold for*	
			H3347-celler (L6+)	
			GAM	GAH
5	Standard L6	30	38	4
		10	49	4
		3	40	3
	Kimært L6 (ascites)	30	2	108
		10	2	108
		3	1	42
10	Kimært L6 (cellekultur)	30	1	105
		10	1	86
		3	1	44
15			Bindingsforhold for**	
			HSB-2-celler (L6-)	
			GAM	GAH
	Standard L6	10	1	1
20	Kimært L6 (ascites)	10	1	1
		10	1	1
	Kimært L6 (cellekultur)	10	1	1

* Bindingsforholdet er det antal gange klarere en prøve er end en kontrolprøve behandlet med GAM (FITC-konjugeret gede-anti-human) alene. Et forhold på 1 betyder at prøven er lige så klar som kontrollen, et forhold mener at prøven er to gange så klar som kontrollen osv..

Tabel 5.

ADCC af kimære L6 (mus) og standard L6-antistoffer på colon-carcinomcellelinie 3347.

	Antistofkon- centration ($\mu\text{g/ml}$)	PBL pr. målcelle	% cytolysis*
35	Kimært L6	10	64
		5	70

63

		10	0	2
	Standard L6	10	100	24
		5	100	17
		10	0	2
5	Ingen	0	100	1

10 * Målcellerne er blevet mærket med ^{51}Cr og blev i 4 timer udsat for en kombination af MAb og humane periferae blodleukocytter (PBL), og frigivelsen af ^{51}Cr blev derefter målt. Frigivelsen af ^{51}Cr (efter korrektion for værdier for spontan frigivelse fra ubehandlede celler) er et mål for procentandelen af cytolyse.

Tabel 5A.

15 ADCC af kimære L6 og standard (muse) L6-antistoffer på colon-carcinomcellelinie 3347.

	Antistofkon-	PBL pr.	%	
	centration	målcelle	cytolysis*	
	($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
20	Kimært L6	20	100	80
	(ascites)	10	100	74
		5	100	71
		2,5	100	71
25		20	0	0
	Kimært L6	10	100	84
	(cellekultur)	5	100	74
		2,5	100	67
		10	0	3
30	Standard L6	20	100	32
		10	100	26
		20	0	0

35 * Målcellerne var blevet mærket med ^{51}Cr og blev i 4 timer udsat for en kombination af MAb og humane periferae blodleukocytter (PBL), og frigivelsen af ^{51}Cr blev derefter målt. Frigivelsen af ^{51}Cr (efter korrektioner for værdier for spontan frigivelse fra ubehandlede celler) er et mål for andelen af cytolyse.

Tabel 5B.

ADCC af kimære L6 og standard (muse) L6-antistoffer på colon-carcinomcellelinie 3347.

	Antistofkon- centration ($\mu\text{g/ml}$)	PBL pr. målcelle	% cytolysis*
5			
	Kimært L6	100	84
10	(ascites)	100	78
		100	85
		100	81
		100	80
		100	71
15		100	65
		0	0
	Standard L6	100	32
		0	0
	Ingen	100	19

20 * Målcellerne var blevet mærket med ^{51}Cr og blev i 4 timer udsat for en kombination af MAb og humane perifere blodleukocytter (PBL), og frigivelsen af ^{51}Cr blev derefter målt. Frigivelsen af ^{51}Cr (efter korrektioner for værdier for spontan frigivelse fra ubehandlede celler) er et mål for andelen af
25 cytolyse.

Tabel 5C.

ADCC af kimære L6 og standard (muse) L6-antistoffer på lunge-carcinomcellelinie H2669.

	Antistofkon- centration ($\mu\text{g/ml}$)	PBL pr. målcelle	% cytolysis*
30			
	Kimært L6	100	35
35	(ascites)	100	31
		100	27
		100	15

		0,001	100	13
		0,0001	0	15
	Standard L6	10	100	9
		1	100	15
5	Ingen	0	100	9
	Kimært L6	10	10	19
	(ascites)	1	10	15
		0,1	10	11
		0,01	10	13
10		0,001	10	22
		0,0001	10	11
	Standard L6	10	10	7
		1	10	6
	Ingen	0	10	8
15	Kimært L6	10	0	4
	(ascites)			
	Standard L6	10	0	9

* Målcellerne var blevet mærket med ^{51}Cr og blev i 4 timer udsat for en kombination af MA b og humane perifere blodleukocytter (PBL), og frigivelsen af ^{51}Cr blev derefter målt. Frigivelsen af ^{51}Cr (efter korrektioner for værdier for spontan frigivelse fra ubehandlede celler) er et mål for andelen af cytolyse.

25 Tabel 5D.

ADCC af kimært L6 og standard (muse) L6-antistoffer på colon-carcinomcellelinie H3347.

30	Antistof	Antistofkoncentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PBL pr. målcelle	% cytolysis*
	Kimært L6	10	100	62
	(ascites)	1	100	66
		0,1	100	69
		0,01	100	26
		0,001	100	8
35		0,0001	0	3

		10	0	0
	Standard L6	10	100	19
		1	100	24
			0	0
5	Ingen	0	100	8

* Målcellerne var blevet mærket med ^{51}Cr og blev i 4 timer udsat for en kombination af MAb og humane perifere blodleukocytter (PBL), og frigivelsen af ^{51}Cr (efter korrektioner for værdier for spontan frigivelse fra ubehandlede celler) er et mål for andelen af cytolyse.

Tabel 6.

Komplementafhængig cytotoxisk effekt af kimært og standard (muse) L6 på coloncarcinomceller fra linie 3347, som målt ved et 4 timers ^{51}Cr -frigivelsesforsøg. Humanserum fra en sund frivillig forsøgsperson blev anvendt som komplementkilde.

Antistof	Human-komplement	% cytolysis
20 L6-standard 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	ja	90
L6-kimært 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	ja	89
L6-standard 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	nej	0
L6-kimært 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	nej	1

Tabel 6A.

Komplementafhængig cytotoxisk effekt af kimært L6 og standard (muse) L6-antistoffer på coloncarcinomcellelinie 3347.

Antistof	Antistofkoncentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PBL pr. målcelle	% cytolysis*
30 Kimært L6	20	+	29
(ascites)	10	+	23
35	5	+	18
	2,5	+	8
	20	inaktiveret	0
	10	0	0

67

	Kimært L6	20	+	29
	(cellekultur)	5	+	26
		2,5	+	18
		20	+	4
5		10	0	4
	Standard L6	20	+	55
		10	+	37
		20	inaktiveret	0
		20	0	1
10	Ingen	0	+	0

* Komplementformidlet cytolyse blev målt ved et 4 timers ^{51}Cr -frigivelsesforsøg. Humanserum fra en sund forsøgsperson blev anvendt som komplementkilde.

15

Tabel 6B.

Komplementafhængig cytotoksisk effekt af kimært L6 og standard (muse) L6-antistoffer på colonicarcinomcellelinie 3347.

20	Antistof	Antistofkon- centration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PBL pr. målcelle	% cytolysis*
	Kimært L6	10	+	209
	(ascites)	5	+	155
25		2,5	+	166
		1,25	+	114
		0,6	+	63
		0,3	+	17
		10	0	0
30	Standard L6	10	+	96
		5	+	83
		2,5	+	48
		1,25	+	18
		0,6	+	7
35		0,3	+	4
		10	0	2
	Ingen	0	+	0

* Komplementformidlet cytolyse blev målt ved et 4 timers ^{51}Cr -frigivelsesforsøg. Humanserum fra en sund forsøgsperson blev anvendt som komplementkilde.

5 Eksempel 4: Et humant kimært museantistof med specificitet for humant B-celleantigen.

10 Monoklont 2H7-muse-antistof (γ 2bK) genkender et humant B-celleoverfladeantigen, Bp35 (E.A. Clark et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82:1766 (1985)). Bp35-molekylet spiller en rolle i B-celleaktivering. mRNA blev fremstillet ud fra 2H7-cellelinien. To cDNA-biblioteker blev fremstillet - én under anvendelse af UIG-H-primeren med tung kæde og den anden oligo(dT). En V_H -klon, pH2-11, blev isoleret efter screening med det samme UIG-H-oligonucleotid. For at isolere klonen med 15 let kæde, blev et muse-kappa-specifikt DNA-fragment anvendt til at screene oligo(dT)-biblioteket. Kandidatkloner blev yderligere screenet med en muse- J_K5 -sekvens. En V_K -klon, pL2-12, blev således isoleret. Den lette kæde UIG-K blev anvendt til at fremstille et restriktionsenzymsted i J-regionen. 20

De to cDNA-kloner blev også modificeret ved 5'-enden til fjernelse af den kunstige oligod[C]-sekvens. I pH2-11 blev dette udført under anvendelse af restriktionsenzymet NcoI, som skærer en nucleotidrest 5' af ATG-initiatorcodonet. I pL2-12 blev 25 dette opnået ved hjælp af et oligonucleotid in vitro mutagenese under anvendelse af en 22-mer der indeholder et SallI-sted.

DNA-sekvenserne af disse to kloner er vist i fig. 21, 22. For at konstruere det kimære tunge kæde-plasmid blev V_H -modulet 30 knyttet til det humane C- γ -1-modul (pGMH6) ved J_H BstEII-stedet, og det kimære lette kæde V_K -modul blev knyttet til det humane C κ -modul (pGML60) ved J_K HindIII-stedet. Ekspressionsvektorsekvenserne blev afledt fra pING2012-neo såvel som pING2016-gpt. De konstruerede plasmider er pING2101 (V_H C- γ -1-neo), pING2106 (V_K C κ -neo), pING2107 (V_K C κ -gpt). pING2101 og 35 pING2106 blev også anvendt til at fremstille plasmider, der indeholdt begge gener. De er pHL2-11 og pHL2-26. Derudover blev pING2106 og pING2014 forenet til et plasmid med to lette

kæder, pLL2-25, for at kompensere for den ringere (sammenlignet til tung kæde) ligevægtsakkumulering af let kæde-protein i transficerede celler. (Se fig. 23). Fig. 24 viser ændringerne, der er foretaget med de variable regionsekvenser under opbygningen.

5

Plasmidet, pHL2-11, blev lineariseret med AatII, og DNA'et blev anvendt til at transficere Sp2/0-celler ved elektroporation. Transformanter blev udvalgt i G418-DMEM. Én transformant, 1C9, frembragte 9,3 ng/ml kimært kappa og 33-72 ng/ml kimært γ -1-protein som bestemt ved ELISA. Southern-analyse af 1C9-DNA viste at der kun er én kopi af plasmidet integreret i Sp2/0-genom.

10

15

20

25

30

35

P A T E N T K R A V

1. Vektor omfattende en cDNA-sekvens, der koder for den fuldstændige, variable
5 region af en immunoglobulinkæde, hvilken kæde omfatter en fuldstændig V-J-
forbindelse i tilfælde af en let kæde, og en fuldstændig V-D-J-forbindelse i tilfælde af
en tung kæde, hvilken vektor mangler enhver konstant region eller hvilke som helst in-
tron-sekvenser.
- 10 2. DNA-fragment omfattende en cDNA-sekvens, der koder for den fuldstændige
konstante IgG1-region for en human tung kædes immunoglobulinkæde, hvilket frag-
ment mangler en hvilken som helst variabel region og den konstante region mangler
hvilke som helst intron-sekvenser.
- 15 3. Vektor omfattende en kontinuert kodningssekvens, uafbrudt af introns, omfatten-
de:
 - i) en DNA-sekvens, der koder for den variable region af en ikke-human immunoglobu-
lin-kæde omfattende en V-J-forbindelse i tilfælde af en let kæde og en V-D-J-
forbindelse i tilfælde af en tung kæde;
 - 20 ii) en DNA-sekvens, der koder for den konstante region af en human immunoglobulin-
kæde.
4. Vektor ifølge krav 1 eller 3, som er et plasmid.
- 25 5. Bakterie, der er transformeret med vektoren eller fragmentet ifølge kravene 1, 2,
3 eller 4.
6. Pattedyrscelle eller gær, der er transficeret med vektoren eller fragmentet ifølge
kravene 1, 2, 3 eller 4.

7. Polynukleotidmolekyle, der omfatter en konsensussekvens for J-regionen af den tunge kæde af et immunoglobulin-molekyle, hvori konsensus-sekvensen udviser mindst 80% sekvens-homologi til kendte J-region-sekvenser uden at være identiske.
- 5 8. Molekyle ifølge krav 7, hvori sekvensen er for en human tung kædes J-region.
9. Molekyle ifølge krav 7, hvori sekvensen er for en tung musekædes J-region.
10. Polynukleotidmolekyle omfattende en konsensussekvens for J-regionen af en let
10 kæde af et immunoglobulinmolekyle, hvori konsensussekvensen udviser mindst 80% sekvenshomologi til kendte J-regionsekvenser uden at være identiske.
11. Molekyle ifølge krav 10, hvori sekvensen er for et human Kappa-J-region.
- 15 12. Molekyle ifølge krav 10, hvori sekvensen er for en muse-Kappa-J-region.
13. Molekyle ifølge krav 10, hvori sekvensen er for en muse-Lambda-J-region.
14. Fremgangsmåde til direkte fremstilling af en gensekvens, der koder for en kimær
20 immunoglobulinkæde med en konstant human region og en variabel ikke-human region af enhver ønsket specificitet, hvilken fremgangsmåde omfatter:
- a) tilvejebringelse af en cDNA-sekvens, der koder for en fuldstændig ikke-human variabel region omfattende en fuldstændig V-J-forbindelse i tilfælde af en let kæde og en fuldstændig V-D-J-forbindelse i tilfælde af en tung kæde, og som mangler hvilke som
25 helst konstante regionsekvenser;
- b) tilvejebringelse af en vektor indeholdende en gensekvens, der koder for den konstante region;
- c) operativ binding af sekvensen a) til vektoren b).
- 30 15. Fremgangsmåde ifølge krav 14, hvori trin (c) omfatter operativ binding af cDNA-sekvensen til sekvensen af trin (c) i et plasmid.

	MJH3-	ACCAGTGACAGAGACGTCGGT
	MJH3-BSTEII-	TCCCTGAGACCAGTGGCAGAG
5	MJH-BSTEII(13)-	ACCAGTGGCAGAG
	MJH4-	GTCAGTGGCAGAGGAGTCGGT
	SJK1-	GCAAGCCACCTCCGTGG
10	JK2BGLII-	CCCTGGTTCGACCTCTAGATT
	SJK2-	GTGCAAGCCTCCCCCTGG
	SJK4-	GCAAGCCGAGCCCCTGT
15	JK4BGLII	CCCCCTGTTTCAACCTCTAGATT
	SJK5	GCAAGCCACGACCCTGG
20	MJK	TGGTTCGACCTTTATTTTG

22. Fremgangsmåde ifølge krav 19, k e n d e t e g n e t ved, at nævnte konsensussekvens yderligere omfatter den sekvens, der koder for genkendelsesstedet for et restriktionsendonukleaseenzym.

23. cDNA-ekspressionsvektorer, der har restriktionsendonukleasestedkort som vist i fig. 10, indeholdende en SV40-tidlig region-promotor, en SV40-sen region-splejningssekvens, den selekterbare markør neo, SV40-polyA-signalsekvenser, et multipelt kloningssted (pING2003) og eventuelt endvidere en tung musekædes forstærker-element (pING2003 E).

24. Fremgangsmåde ifølge krav 19, hvori konsensussekvensen er valgt fra gruppen bestående af dem, der betegnes som UIGH, UIGK og MJ_H2-Apal:

UIG-H AGGGACCACGGTCACCGTCTC

UIG-K GGGACCAAGCTTEAG

5

MJ_H2-ApaI TGT CAGAGGAGTCGGTCGTGTTTCCGGGTA

10

FIG. 1

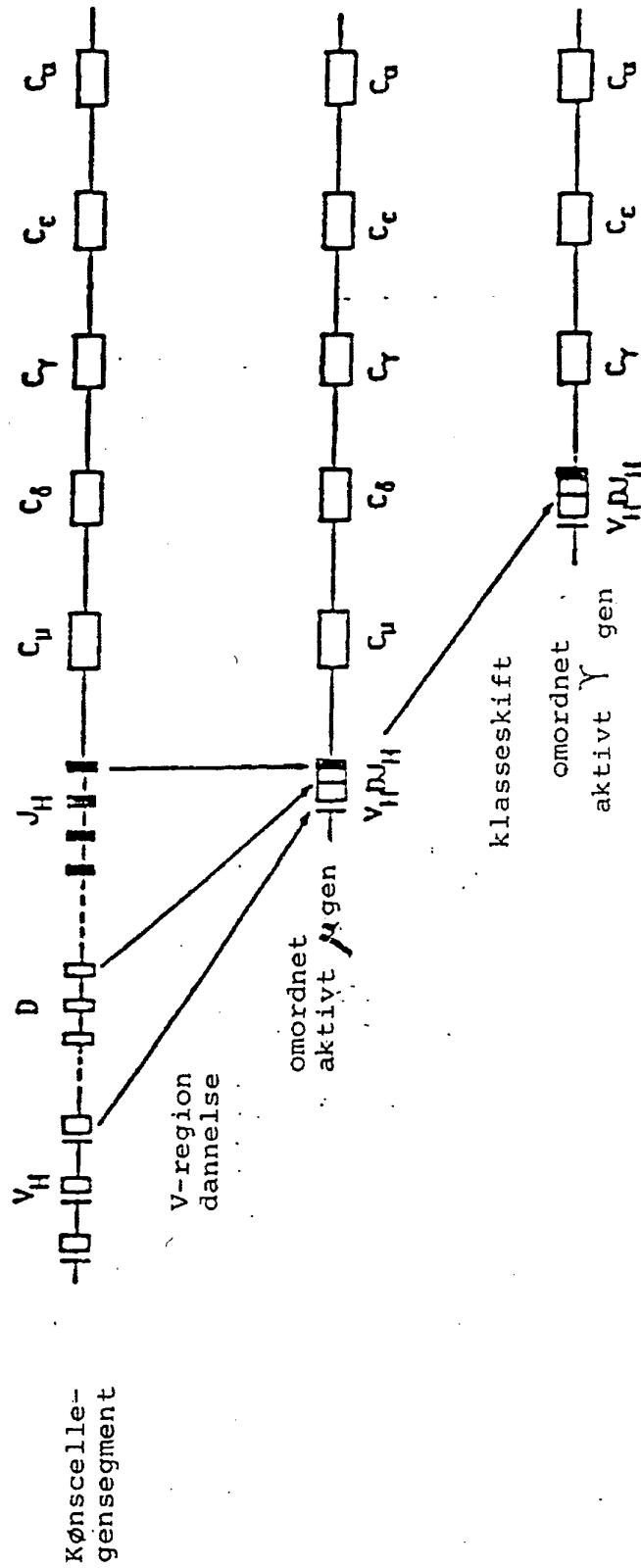


FIG. 2

Ig tungkæde J-C-regionhuman tunge kæde J-region

J | CH1

JH1 GCTGAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
 JH2 CTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTCGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCAG
 JH3 ATGCTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAG
 JH4 ACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
 JH5 ACACTGGTTCGACTCCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
 JH6 AT(TAC)₅GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
Consensus TCGACCTCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

tunge musekæde J-regioner

J | CH1

JH1 TACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
 JH2 TACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCAG
 JH3 CCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCCAG
 JH4 TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
Consensus TTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG

Ig lette kæde J-C-regionhuman Kappa J region

J | C

JK1 GGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
 JK2 ACACCTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC
 JK3 TCACCTTCGGCCCTGGGACCAAGTGGATATCAAAC
 JK4 TCACCTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC
 JK5 TCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAC
Consensus TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

muse Kappa J region

J | C

JK1 TGGACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATCAAAC
 JK2 TACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
 JK3 TTCACATTCAGTGATGGGACCAGACTGGAAATAAAAC
 JK4 TTCACGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAAC
 JK5 CTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC
Consensus TTCGGTGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
 UIG(MJK) 3'TGGTTCGACCTTTATTTG 5'

human Lambda pseudo J-region

J | C

JPSL1 CACATGTTTGGCAGCAAGACCCAGCCCACTGTCTTAG

muse Lambda J-region

J | C

JL1 TGGGTGTTCCGGTGGAGGAACCAACTGACTGTCTCCTAG
 JL2 TATGTTTTCCGGCGGTGGAACCAAGGTCACTGTCTCCTAG
 JL3 TTTATTTTCCGGCAGTGGAAACCAAGGTCACTGTCTCCTAG
Consensus TTCGGCGGTGGAACCAAGGTCACTGTCTCCTAG

FIG. 3

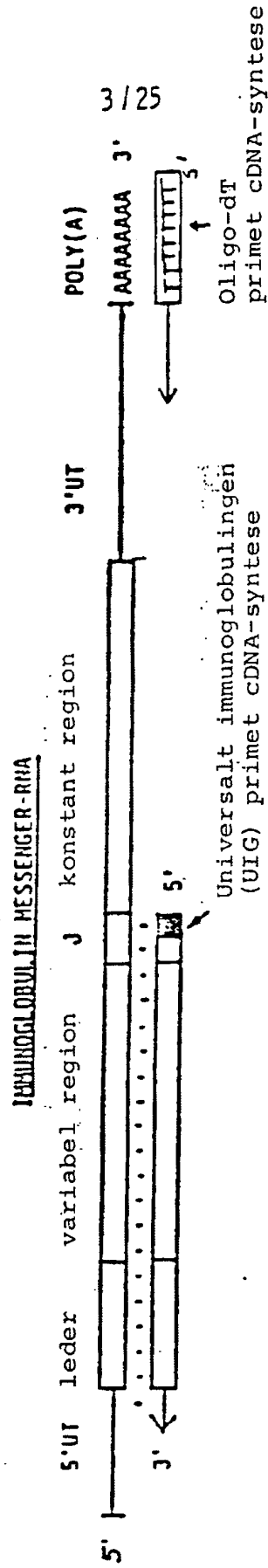
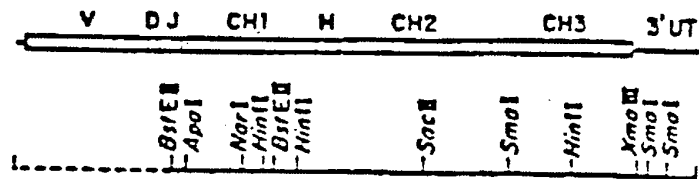


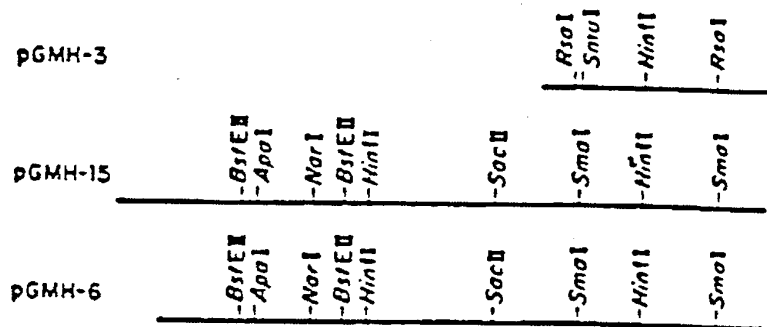
FIG. 4

A. Syntese af humane IgG1-gener

a. Human IgG1's tunge kædestruktur



b. cDNA-kloner



B. En human IgG1 konstant regionkloningsvektor til V-region modulindsættelse

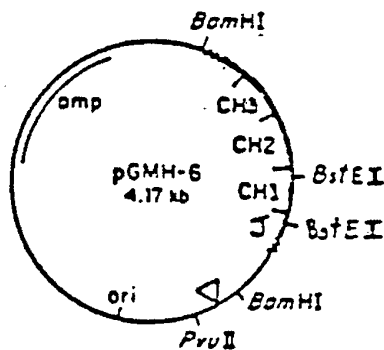


FIG. 5

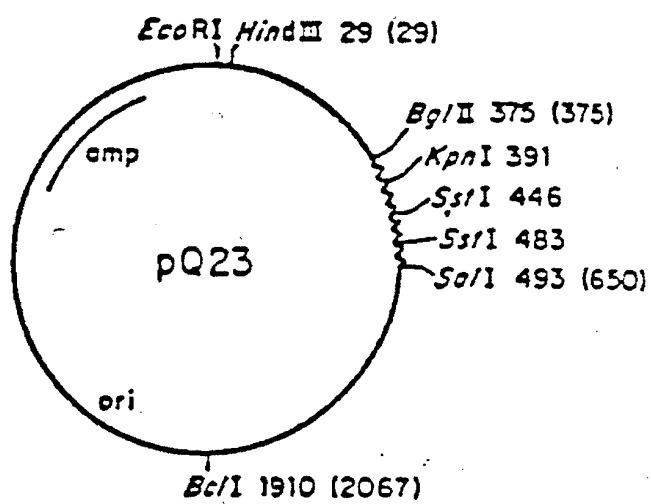
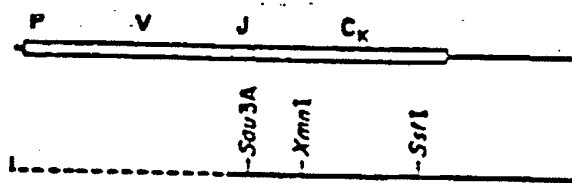


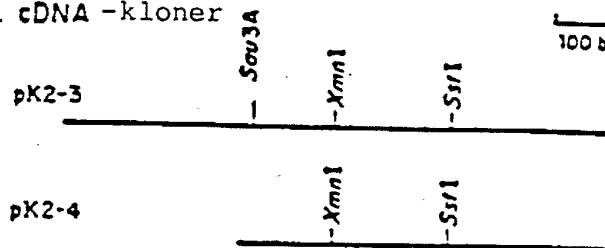
FIG. 6

A. Syntese af humane IgK-gener

a. Human IgK's lette kædestruktur



b. cDNA -kloner



B. Konstruktion af en human C_k-regionkloningsvektor

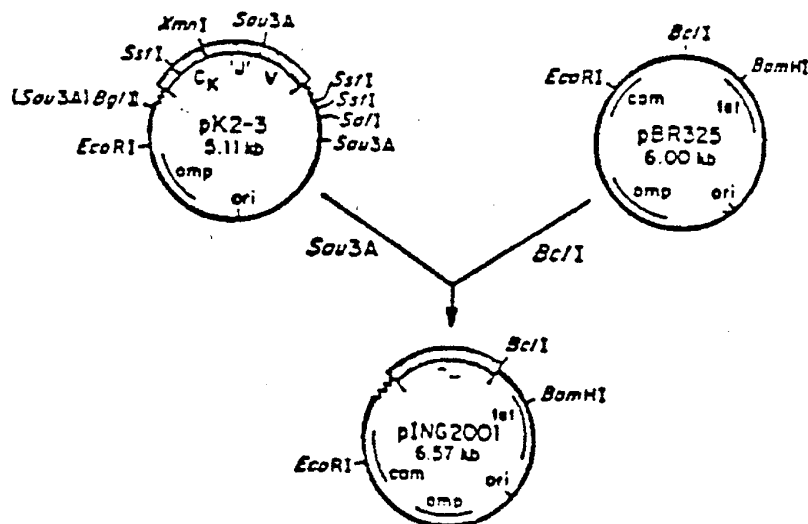
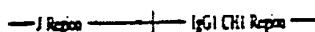


Fig.7

Primere udfornet til Ig-V-regionsyntese

A. Ig-tung kæde J-C-region



Human IgG1 pGMH-4

GATCACCGTCTCTCAG CCTCCACCAAGGGCCCATC
Bst EI

tung musekæde J regioner
og primerer

Forkert matchede

		N	JH1	JH2	JH3	JH4
JH1 (MHH1)	TACTGGTACTTCGGATGTTGGGGCCAGGACACCGGTACCGTCTCTCAG GCCAGTGGCAGAGGAGTGGT	21	0	4	4	1
JH2 (MHE)	TACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCACCACTETECAGTCTCCTCAG GAGAGTGTGACAGGAGTGGT	21	4	1	7	4
JH3 (MHH3)	CCTGGTTTGGTAAETGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTCCAG ACCACTGACAGAGAGGTCGGT	21	4	7	0	5
(MHO-ESTEH)	TCCTTGAGACCACTGGCAGAG	21	3	7	1	5
(MHH-BSTEH (H))	ACCACTGGCAGAG	21	1	4	1	2
(MHH-ESTEH (H))	Bst EI					
JH4 (MHH4)	TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCTCAG GTCAGTGGCAGAGGAGTGGT	21	1	4	5	0

B. Ig kappa kæde J-C-region



human kappa pK2-3

pNG23E

CTGGAGATGAAC GAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
TCATCAAAC GAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
Bcl

tung musekappa J-regioner
og primerer

Forkert matchede

		N	JK1	JK2	JK4	JK3
JK1 (JK1)	TGGACGTTGGTGGAGGACCAAGCTGGAAATAAAC GCAAGCCACTCCCTGG	17	0	3	6	3
JK2 (JK2GLII)	TACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAC CCCTGGTTGACTCTAGATT	21	3	3	5	3
(JK2)	GTGCAAGCCTCCCTCTGG Bst II					
JK4 (JK4)	TTCACGTTGGCTGGGGACAAAGTTGGAAATAAAC GCAAGCCGAGCCCTGT	17	6	4	0	4
(JK4GLII)	GCCCCGTTCAACTCTAGATT Bst II	21	7	6	3	6
JK3 (JK3)	CTCACGTTGGTCTGGACCAAGCTGGAGCTGAAC GCAAGCCAGACCCCTGG	17	3	3	4	0
(NUN)	TGGTTCAGCTTTAATTTG	19	1	0	2	3

FIG. 8

Syntese af V-regionmodulgener af tung kæde

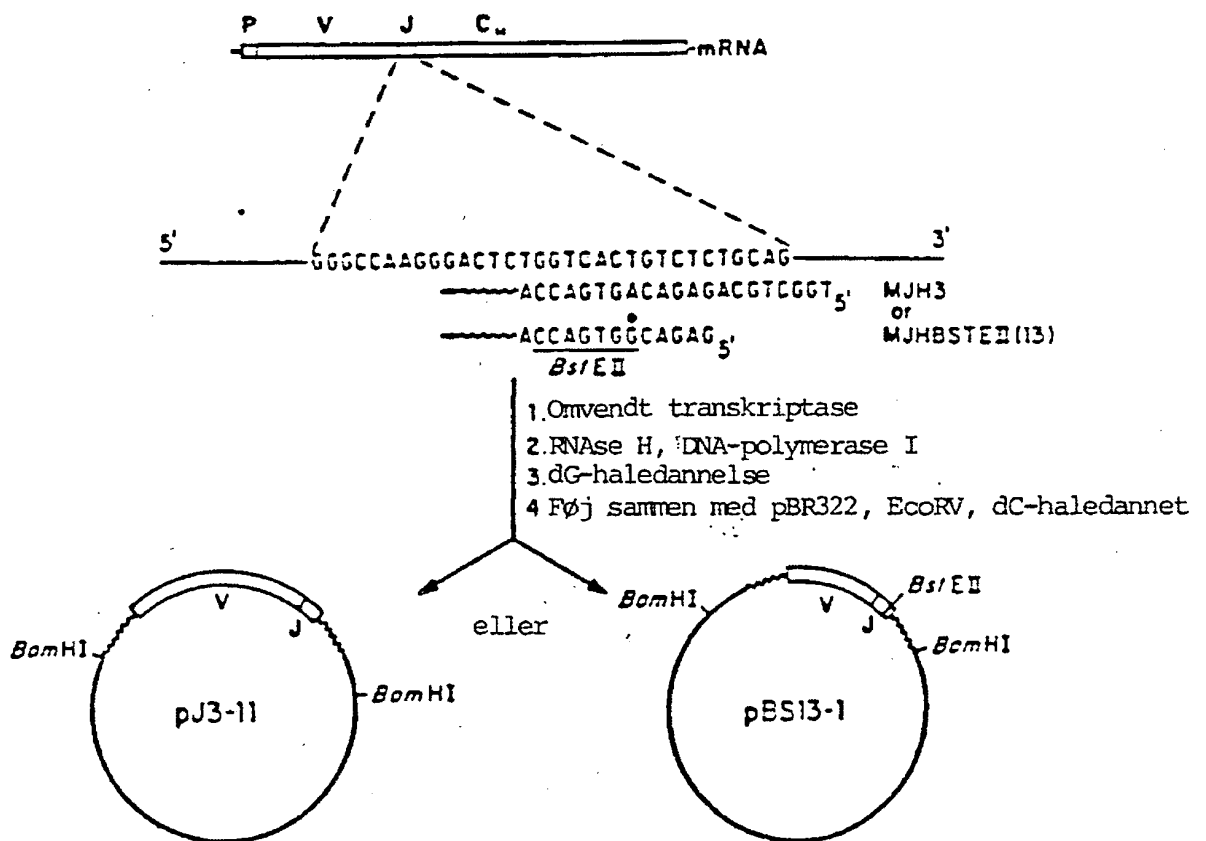


FIG. 9A

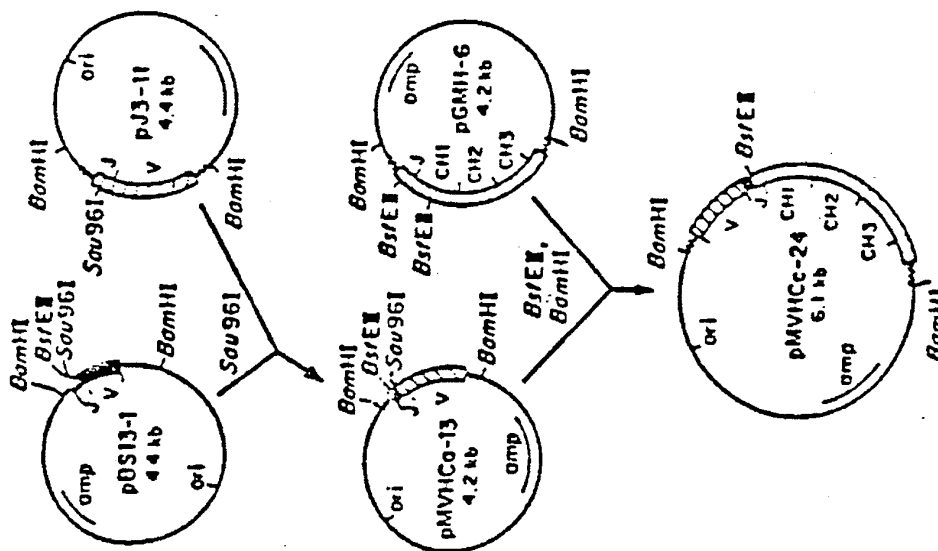


FIG. 9B

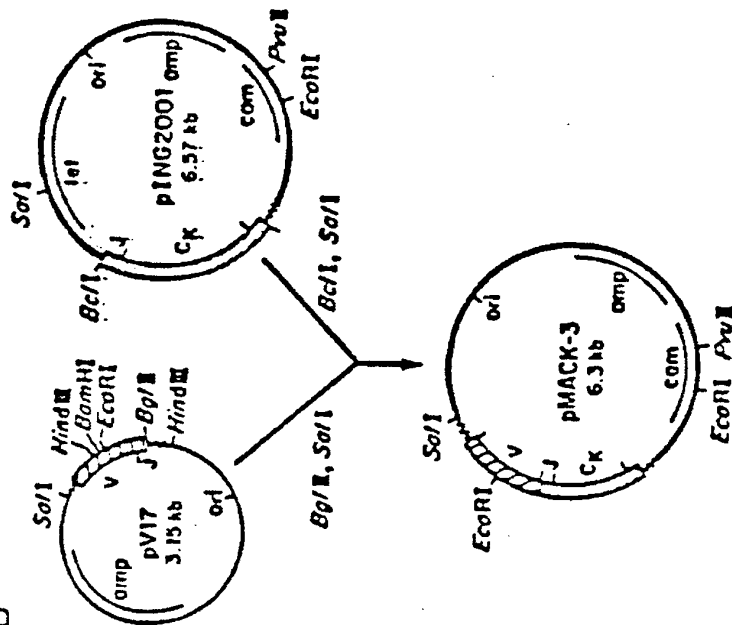


FIG. 10

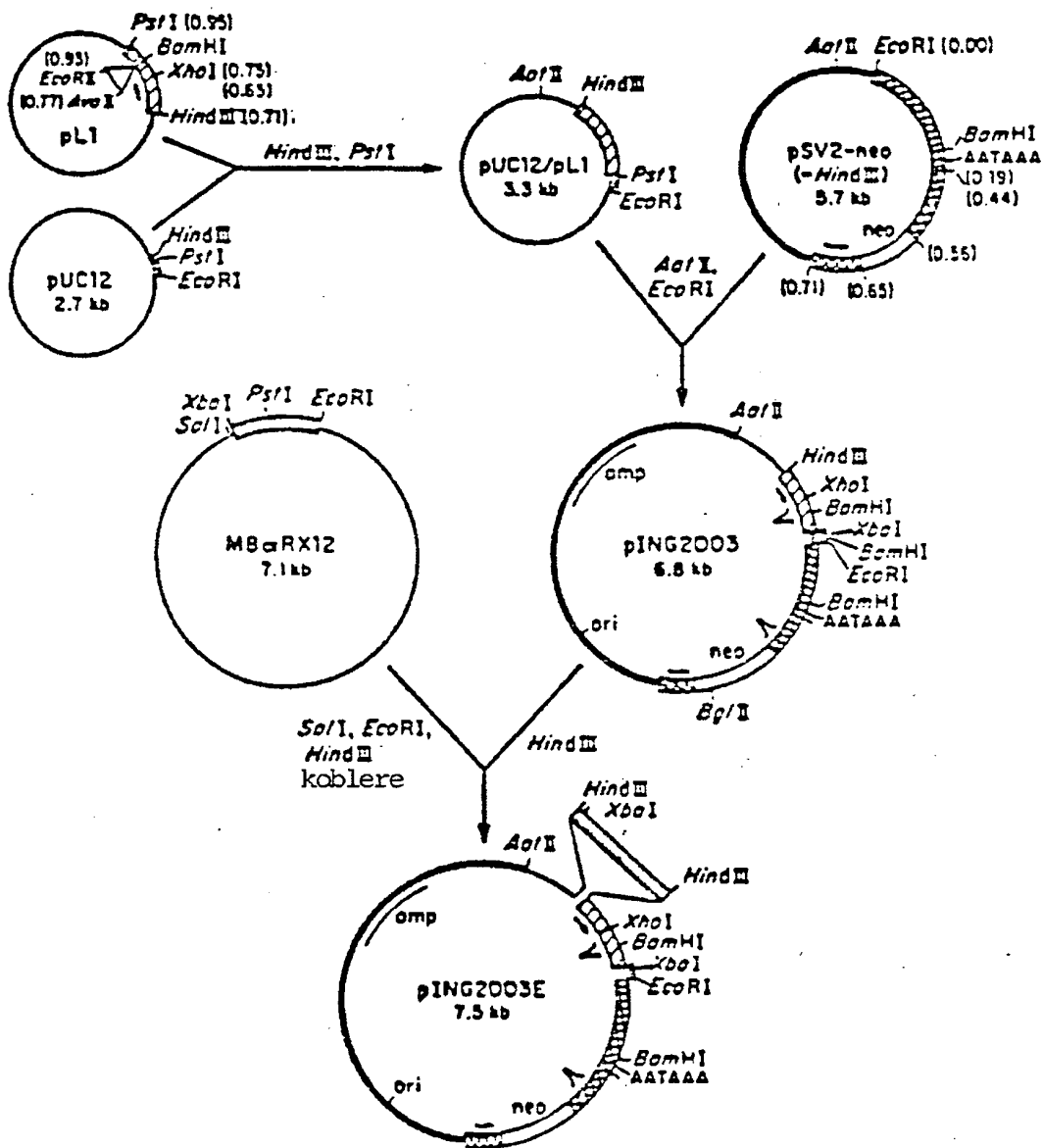
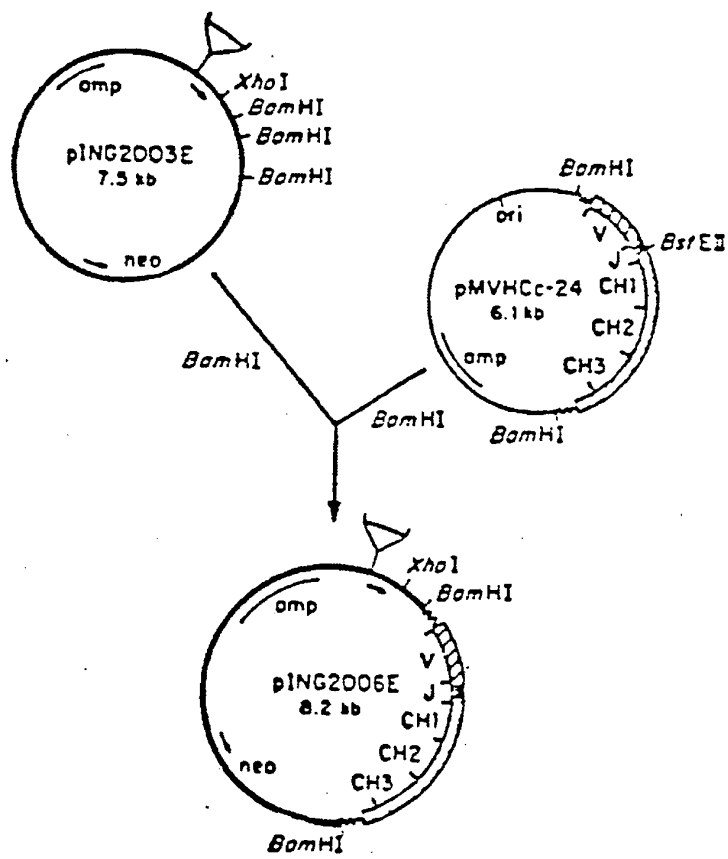


FIG. 11



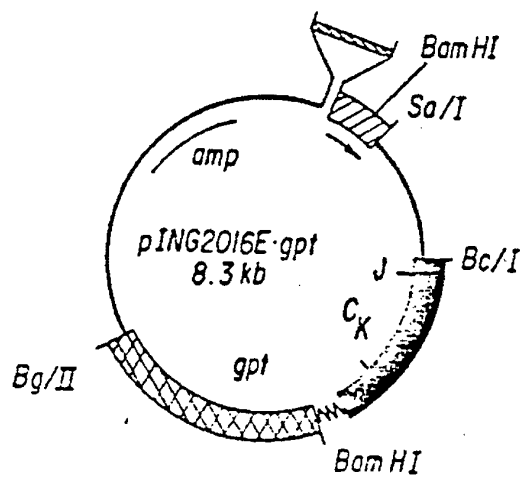
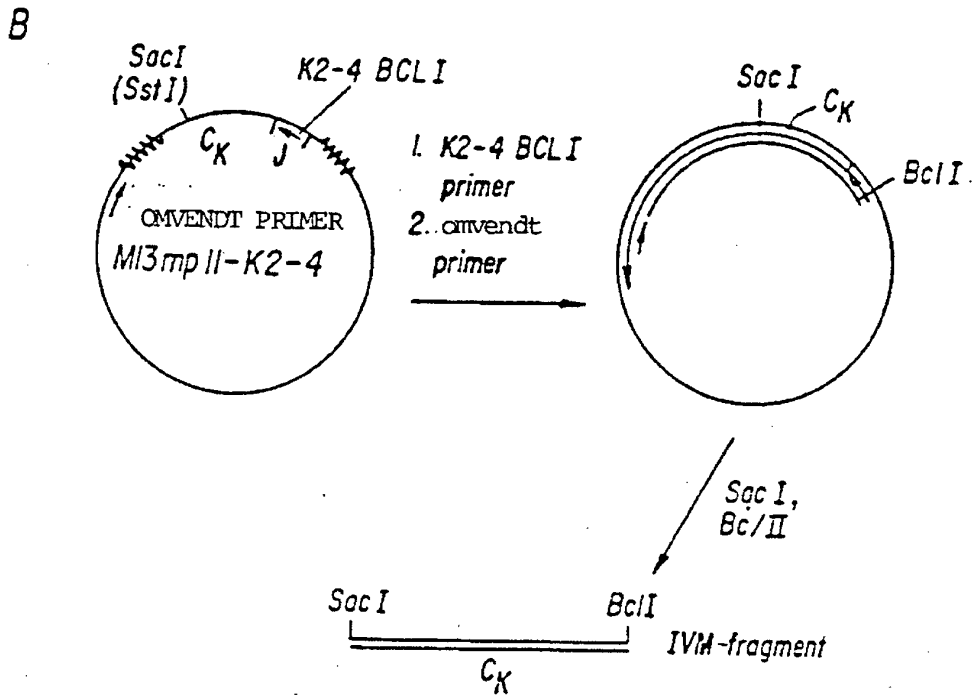
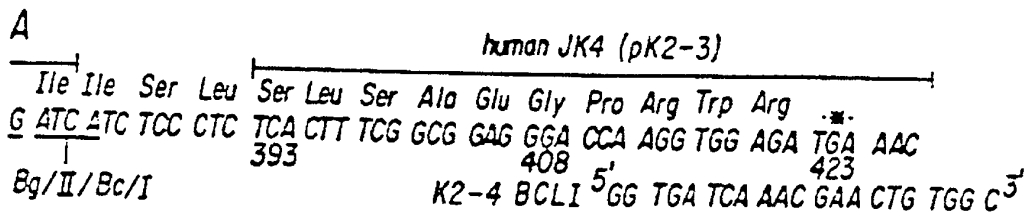


FIG. 13

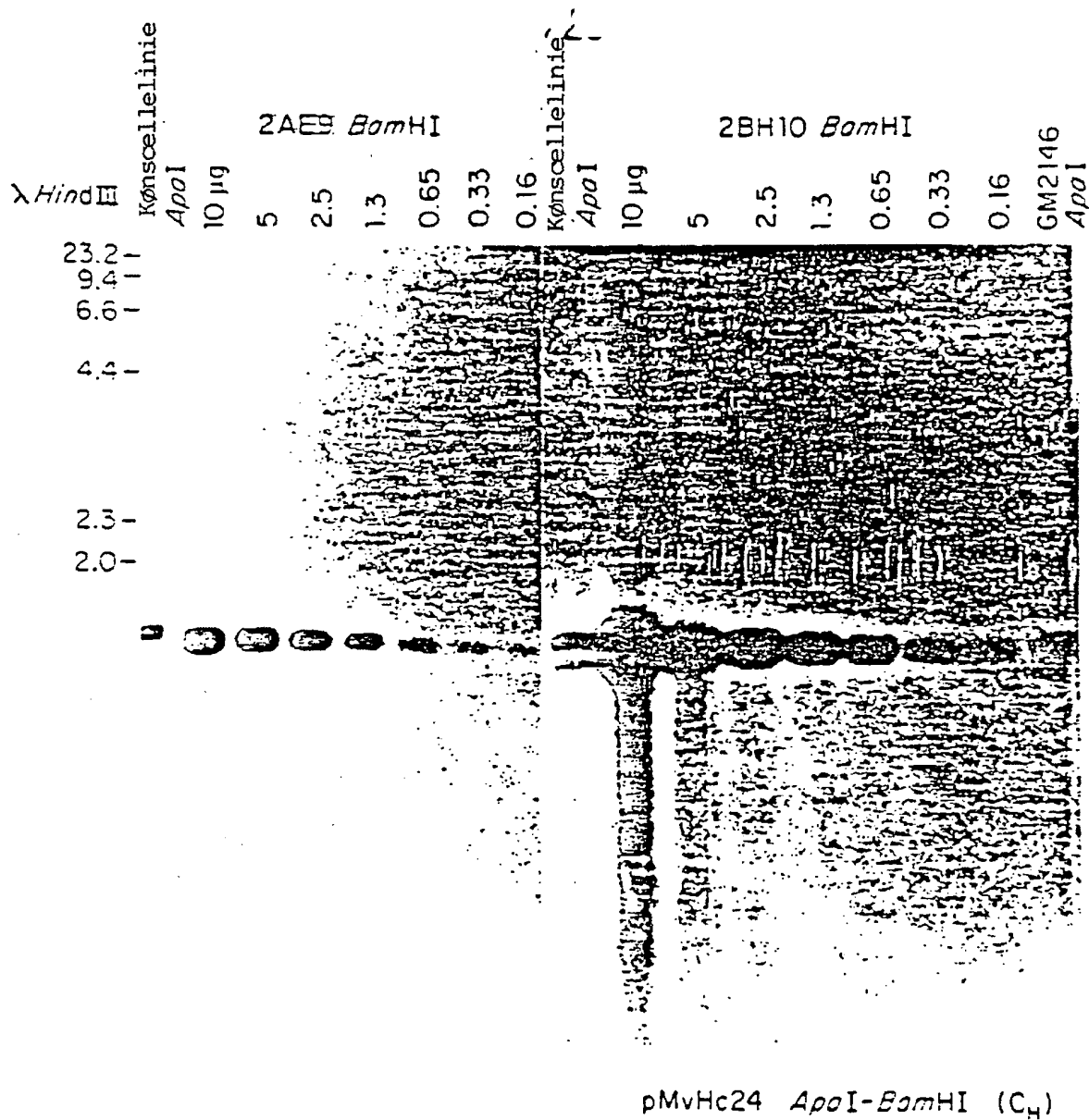


FIG. 15

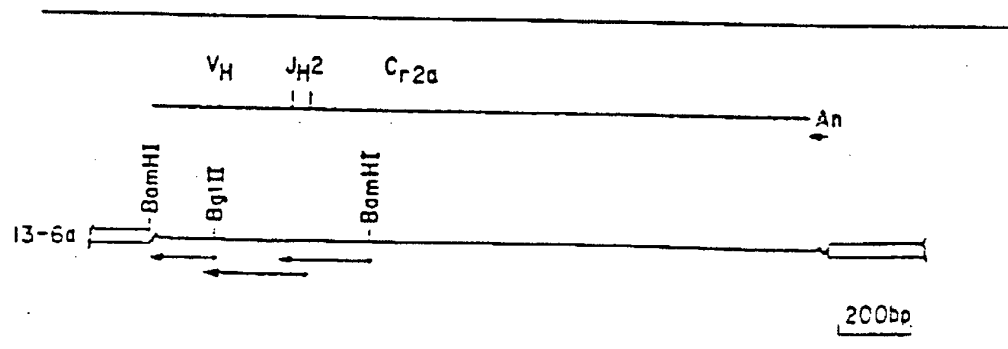
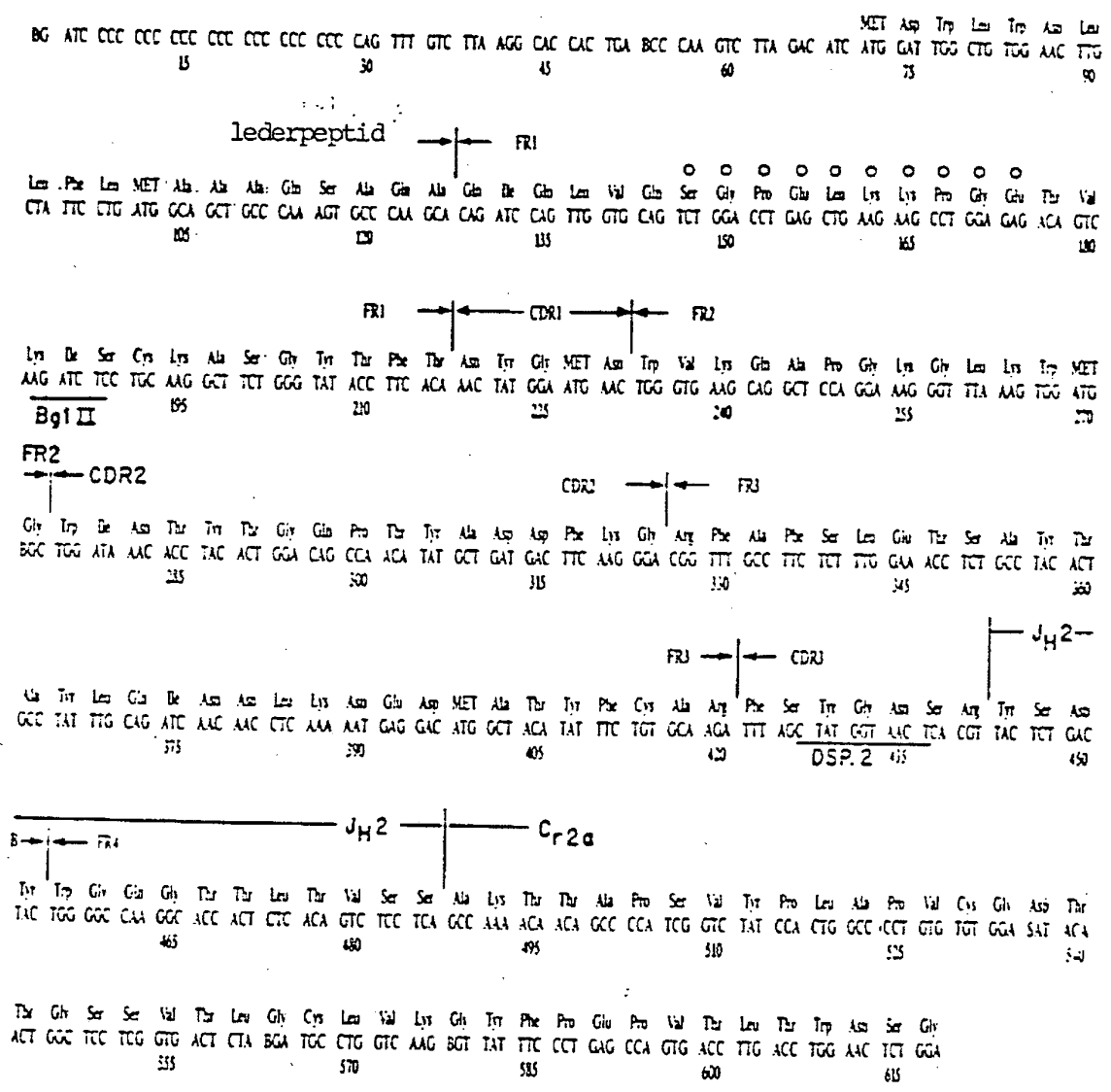


Fig. 16

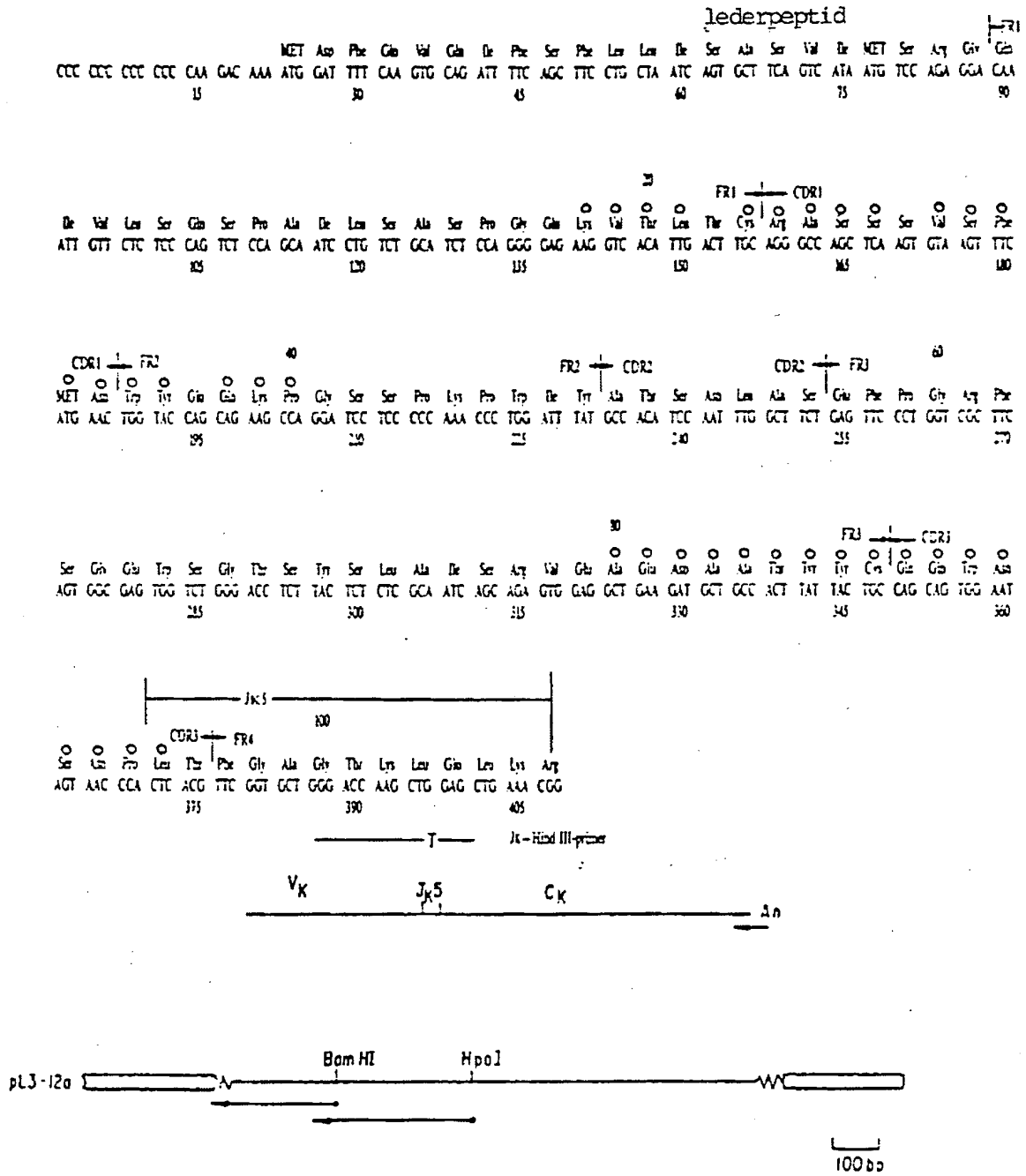


FIG. 18

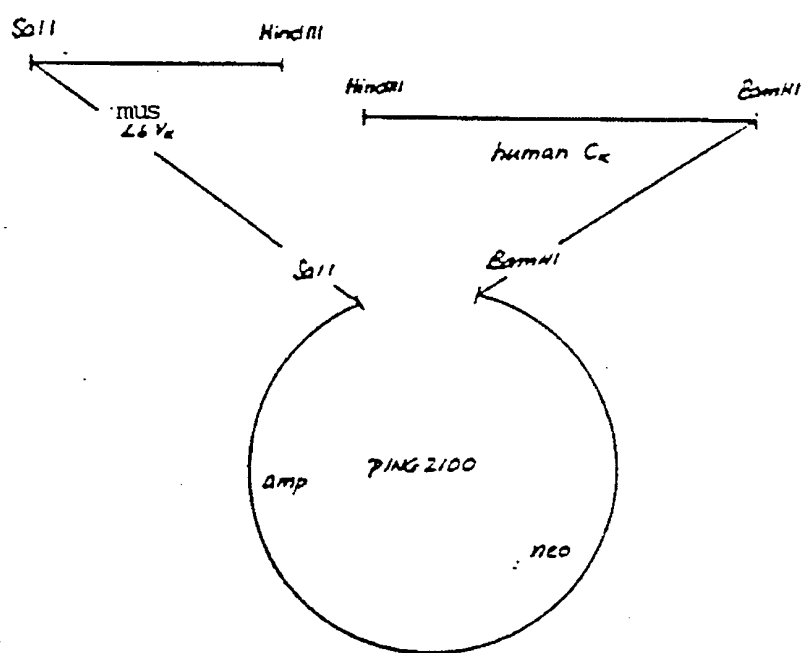


FIG. 19

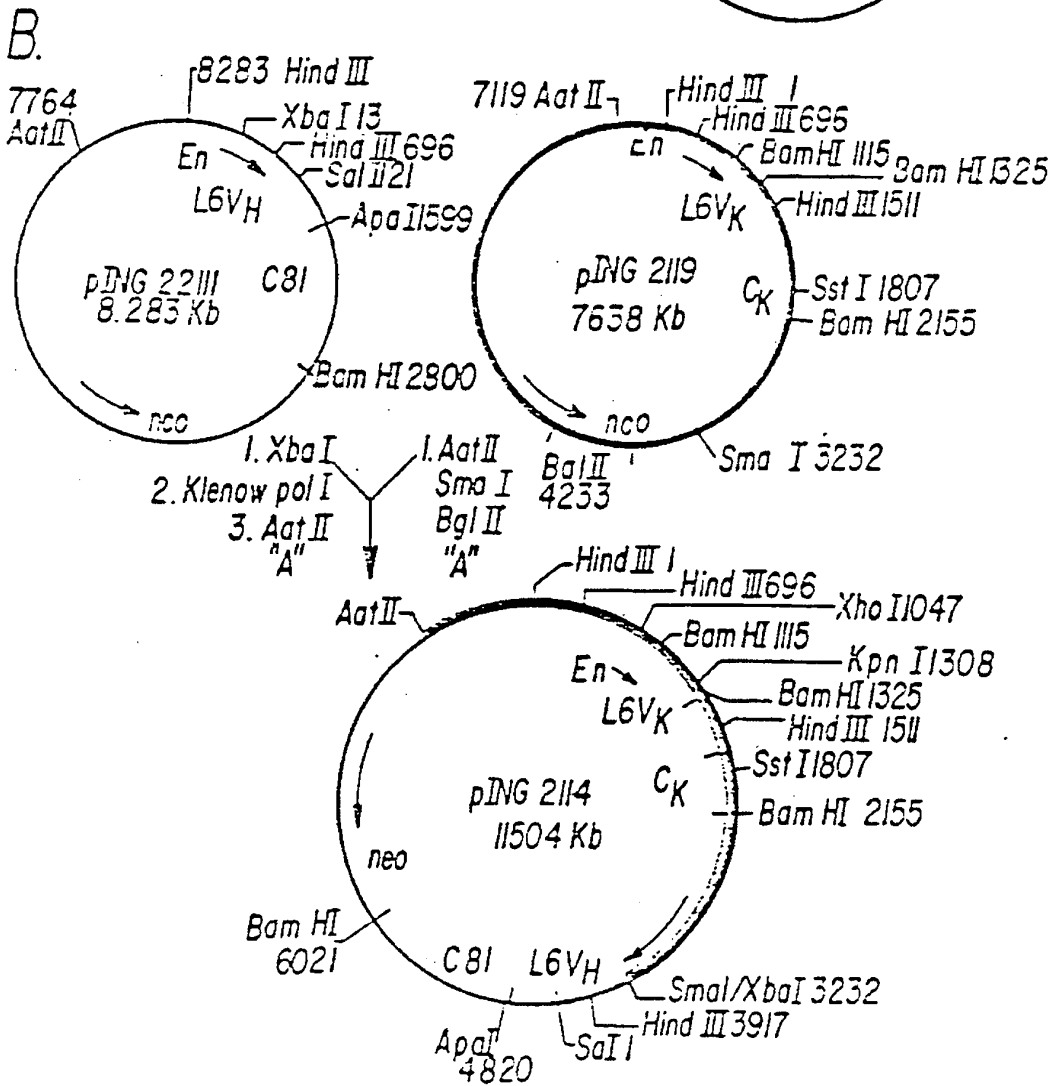
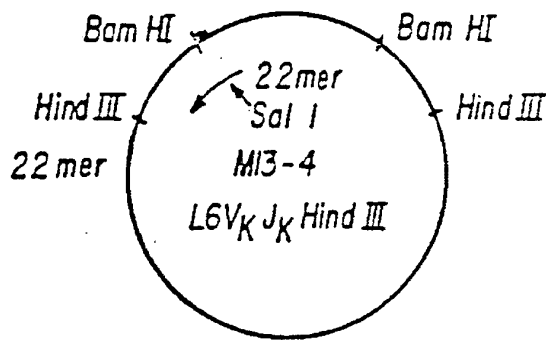
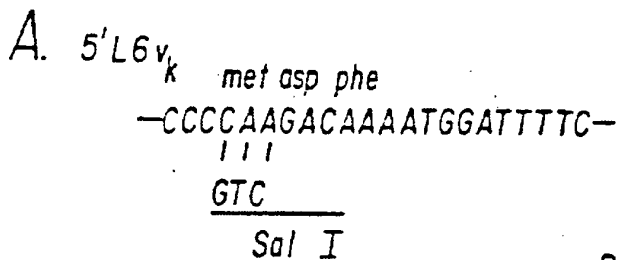


FIG. 20

46 kineer

V4 P13-65 (50) oligo (dT) klon. BAL-31 (deletion 8', CYANIN MUTAGENESIS → P13-3111 ACG
 P13-3112 ACG

Sall ↓ P13-3111 P13-3112
 5' GTCGACTCTAGTTTGTCTTAGGGCACCACCTGAGCCC AAG
TCTTAGACATCATGGAT
 MscI

forbundet
 ACCACTCTCACAGTC TCC TCA ^{MscI} GCC ACC ACA AAG GGC
 ApuI ↓
 CCAAT

V4 P13-120 (50) oligo (dT) klon. JM101 (MUTAGENESIS) → P13-3119 ACG
 P13-3120 GGC

Sall ↓ MscI
 5' GTCGACAAAATGGAT

forbundet
 ACCAAGCTGAG^{Cx}ATGAAA | CGA ACT

FIG.21

247 tunge kædes variable sekvens.

leder

C₃₃GTACCTCTCTACAGTCCCTGAAGACACTGACTCTAACCATG GGA TTC AGC AGG ATC TTT
 met gly phe ser arg ile phe
peptid *NC01* | *FR1* • • • •
 leu phe leu leu ser val thr thr gly val his ser gln ala tyr leu cln
 CTC TTC CTC CTG TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GCT TAT CTA CAG
 • • • • • • • •
 gln ser gly ala glu leu val arg pro gly ala ser val lys met ser cys
 CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGG
 • • • • • • • •
 lys ala ser gly tyr thr phe thr ser thr asn met his trp val lys cln
 AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG GTA AAG CAG
 • • • • • • • •
 thr pro arg gln gly leu glu trp ile gly ala ile tyr pro gly asn gly
 ACA CCT AGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GGA AAT GGT
 • • • • • • • •
 asp thr ser tyr asn gln lys phe lys gly lys ala thr leu thr val asp
 GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC
 • • • • • • • •
 lys ser ser ser thr ala tyr met gln leu ser ser leu thr ser glu asp
 AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAA GAC
 • • • • • • • •
 ser ala val tyr phe cys ala arg val val tyr tyr ser asn ser tyr trp
 TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA GTG GTG TAC TAT AGT AAC TCT TAC TGG

 CDR3 | FR4 *JH1* ----- *FR4* *JH2*
 tyr phe asp val trp gly thr gly thr thr val thr val ser
 TAC TTC GAT GTC TGG GGC ACA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCG₃₀

 BICEH *JH2::EII-PRIMER*

FIG. 23

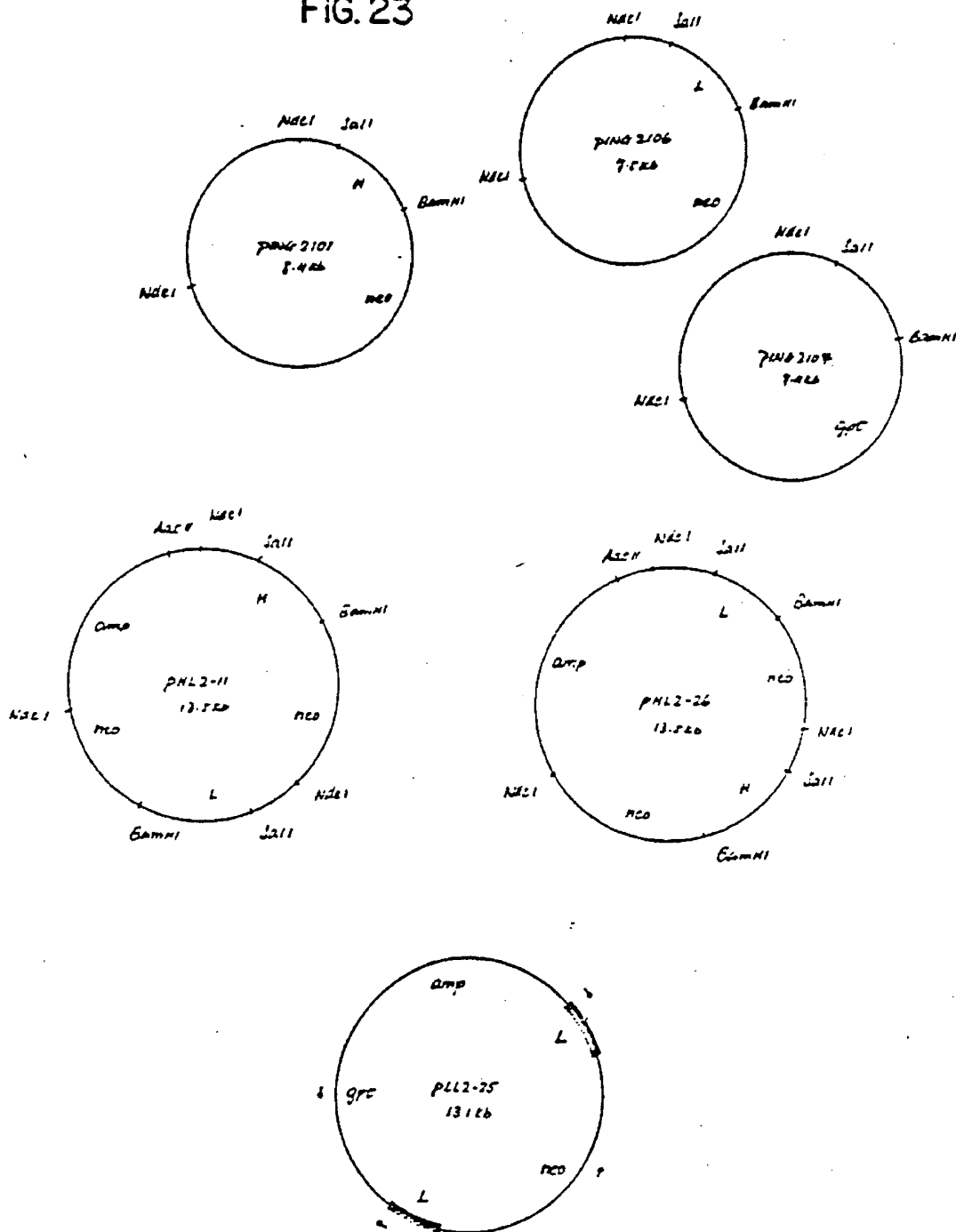


FIG. 24

2177 kimer

V_k PH2-7 (JH) JH81EII klon, NcoI cut 5'ATG- → P162108 NEO

5' ^{SRI}
↓
GTC ^{MEC}ACATGGGA

forbundet ^{MO, HU} ACG GTC ACC GTC TC[Ⓣ]TCA | ^{CH}GCC TCC

V_k PL2-12 (SRI) oligo(AT) klon, JH81EII klon, 5'ATG- → P162108 NEO
P162107 GAT

5' ^{SRI}
↓
GTC ^{MEC}GAC AAA ATG GAT

forbundet ^{MO, HU} ACC AAG CT[Ⓣ]GAG[Ⓣ]ATG AAA | ^{CH}CGA ACT