

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 925638 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 925638

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 5/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 11.12.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 11.12.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 14.06.1993

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

13.12.1991 US 807300

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Akzo N.V., Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, ALANKOMAA, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Haspel, Martin Victor, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Kobrin, Barry Jay, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Crichton, Virginia Zewe, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Kasvainten yhteydessä esiintyvää antigeenia vastaan suunnattu monoklonaalinen vasta-aine 88BV59

Monoklonal antikropp 88BV59 riktad mot en i samband med tumörer förekommande antigen

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

CRL 10624 ATCC

Menetelmä kasvainten yhteydessä esiintyvää antigeenia vastaan suunnatun monoklonaalisen vasta-aineen 88BV59 valmistamiseksi, sitä tuottava solu ja sen tunnistama epitooppi.

5 **Keksinnön kuvaus**

Tämä keksintö koskee menetelmää monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi, ja sitä tuottavaa transformoitua B-solulinjaa, joka on peräisin sellaisten syöpäpotilaiden B-soluista, jotka on aktiivisesti immunisoitu autologisella kasvainantigeenilla. Tätä monoklonaalista vasta-ainetta voidaan käyttää sekä diagnostisissa menetelmissä että ihmisen syöpien hoidossa. Keksinnön kohteena on myös vasta-aineen kanssa reagoiva epitooppi. Tässä kuvataan myös raskas- ja kevytketjun vaihtelevien osien eristys ja sekvenssointi, ja niissä olevien komplementaarisuutta määrittävien alueiden tunnistus.

Keksinnön tausta

Tässä esitetään uusia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, jotka reagoivat spesifisesti antigeenien kanssa, jotka liittyvät tiettyihin kasvaimiin, ja sellaisten transformoituneiden B-solulinjojen tuotantoon, jotka ovat peräisin aktiivisesti immunisoitujen potilaiden perifeerisen veren B-soluista. Edelleen esitetään diagnostisia menetelmiä ja syövän hoitoa, joissa käytetään näitä monoklonaalisia vasta-aineita.

Nykyisin saatavilla olevat syövänhoitokeinot, erityisesti sädehoito ja kemoterapia, pohjautuvat siihen perussyyhyn, että syöpäsolut ovat suhteellisesti herkempiä näille hoidoille kuin normaalisolut. Näitä hoitoja rajoittaa kuitenkin suuresti voimakas toksisuus normaalikudoksille. Vasta-ainemolekyylit sitä vastoin ovat tarkoin spesifisiä antigeeneilleen. Tutkijat ovat näin ollen koettaneet eristää syöpäsoluille spesifisiä vasta-aineita, jotka olisivat kauan etsitty "'maaginen luoti' syövänhoitoon" (Science, 1982, 216:283).

Vasta-aineet ovat proteiinimolekyyliä, joita valmistavat normaalisti B-solu-lymfosyytit, joita tuotetaan luuytimessä ja jotka kulkeutuvat verenkierron mukana. Mitä tahansa elimistöön tulevaa antigeenia vastaan, se on: mitä
 5 tahansa vierasta molekyyliä vastaan yksinkertaisesta orgaanisesta kemikaalista aina monimutkaiseen proteiiniin asti, tuotetaan vasta-aineita, jotka tunnistavat kyseisen tietyn kemiallisen rakenteen ja kiinnittyvät siihen. Sitä ainutkertaista kemiallista rakennetta antigeenin pinnalla,
 10 johon tietty vasta-aine voi sitoutua, kutsutaan nimellä antigeeninen determinantti tai epitooppi. Elimistön B-solu-lymfosyytit, joita nimitetään B-soluiksi, lymfositteiksi tai leukosyyteiksi, ovat olemassa satoina miljoonina erilaisina geneettisesti ohjelmoituina soluina, joista
 15 kukin tuottaa vasta-ainetta, joka on spesifinen eri determinantille. Vasta-aineen tuotantoa stimuloivalla antigeenillä voi olla useita determinantteja pinnallaan. Kun B-solu kohtaa antigeenin, B-solu, joka kantaa pinnallaan vasta-ainetta, joka on spesifinen kyseisen antigeenin pinnalla olevalle determinantille, alkaa jakautumaan. Tämä
 20 klonaalinen lisääntyminen tuottaa useita tytärsoluja, jotka erittävät tätä vasta-ainetta verenkiertoon.

Koska vasta-aineiden antigeenien tunnistus ja niihin sitoutuminen on spesifistä, haluttiin tuottaa suuria
 25 määriä vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä yksittäiselle determinantille, ja jotka näin ollen sitoutuisivat vain niihin antigeeneihin tai kudoksiin, joilla olisi tämä tietty determinantti.

B-solut eivät kasva jatkuvassa viljelmässä, ellei
 30 niitä ole muutettu hybridisoimalla ne "kuolemattoman" solun kanssa, tai ellei niitä ole transformoitu joko virus- tai syöpäperäisellä DNA:lla. Sellaiset B-lymfosyyttisolulinjat, jotka on transformoitu joko spontaanisti tai tarkoituksella lymfotrooppisella viruksella, kuten Epstein-Barrin viruksella (EBV), tuottavat monoklonaalisia vasta-
 35 aineita. Transformaatio voidaan saada aikaan myös käyttä-

mällä muita transformoivia agensseja, kuten virusperäinen DNA ja soluperäinen DNA. Nämä solut, toisin kuin hybridoomasolut, sisältävät normaalin diploidisen määrän ihmiskromosomeja (46).

5 Monoklonaalisia vasta-aineita tuotetaan puhtaassa muodossa, jossa ei ole epäpuhtautena muita immunoglobuliineja. Monoklonaalista vasta-ainetta tuottavien solujen avulla on mahdollista tuottaa käytännöllisesti katsoen rajattomia määriä vasta-ainetta, joka on spesifinen yhdel-

10 le determinantille tietyn antigeenin pinnalla.

 On uskottu, että jos olisi saatavilla vasta-aineita, jotka olisivat spesifisiä tiettyjä syöpäsoluja vastaan, niitä voitaisiin käyttää eri hoito- ja diagnoosimenetelmissä. Sellaiset vasta-aineet inaktivoisivat tai tappaisivat tiettyjä syöpäsoluja pelkästään kiinnittymällä soluun sen determinantin kohdalla, jolle ne ovat spesifisiä. Vaihtoehtoisesti nämä vasta-aineet voivat sitoutua efektorilymfosyyttien tai makrofagien pintaan, ja muuttaa ne kasvaintigeenille spesifisiksi tappajasoluiksi.

20 Monoklonaaliset vasta-aineet voivat myös lisätä kemoterapeuttisten lääkkeiden, toksiinien ja radioaktiivisten isotooppien spesifisyyttä, ja näin lisätä niiden tehoa ja samalla alentaa niiden myrkyllisyyttä olemalla konjugoituja niihin. Vasta-aineita, jotka on konjogoitu radionuklideihin tai metallisiin merkkiaineisiin, voidaan

25 lisäksi käyttää protoniemissioon (PET) ja ydinmagneettiseen resonanssiin (NMR) perustuvassa kuvantamisessa in vivo diagnoosia ja etäpesäkkeiden paikantamista varten. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan myös käyttää, kun

30 halutaan eristää kasvaintigeeneja silmällä pitäen mahdollista käyttöä standardinomaisessa rokotteessa.

 Vakioalueen lisäksi, joka on lajille tunnusomainen, vasta-aineet sisältävät vaihtelevia alueita sekä raskaassa ketjussa (V_H) että kevyessä ketjussa (V_L). Nämä vaihtelevat

35 alueet ovat ne vasta-aineen osat, jotka määrittävät sitoutumisspesifisyyden, ja jokaisen vasta-aineen, joka sitou-

kuin niiden vasta-aineiden vaihtelevat alueet, jotka sitoutuvat eri epitooppeihin. Silmällä pitäen vasta-aineen spesifisyyden hyväksikäyttöä lääkkeiden ja radiometallien kohdistukseen terapiaa ja kuvantamista varten, uskotaan, että etuja voidaan mahdollisesti saavuttaa, jos immuno-

5 konjugaattien valmistuksessa käytetään pelkästään niitä vasta-aineiden osia, jotka ovat aktiivisia sitoutumisessa. Raskas- ja kevytketjujen komplementaarisuuden määrittävien alueiden tunnistus ja sekvenssointi antaa myös tietoa, jonka nojalla voidaan syntetisoida kimeerisiä ja multi-

10 funktionaalisia vasta-aineita. Tästä syystä eristettiin ja sekvenssoitiin vaihtelevat alueet ja määritettiin sen alueen sekvenssi, joka toimii epitooppiin sitoutumisessa.

Tekniikan tason kuvaus

15 Aikaisemmat yritykset saada aikaan monoklonaalisia vasta-aineita, jotka olisivat spesifisiä ihmisen kasvaimille, ovat noudattaneet kahta reittiä B-solujen suhteen: 1) B-soluja on eristetty selllaisten hiirten pernoista, joita oli immunisoitu ihmisen kasvaimia vastaan, US-patenttijulkaisu 4 172 124; ja 2) ihmisen B-soluja on eris-

20 tetty joko syöpäpotilaiden perifeerisestä verestä tai kasvaimia viemäröivistä imusolmukkeista. Kumpikaan lähestymistapa ei ole antanut tyydyttäviä tuloksia.

Ihmisen kasvaimia vastaan immunisoiduilla hiirillä on liian laaja reaktiivisuus. Eli suurin osa aikaansaa-

25 duista hiiren monoklonaalisista vasta-aineista reagoi sellaisten ihmisantigeenien kanssa, jotka ovat läsnä yhtä hyvin normaalissa kuin kasvainkudoksessakin. Vasta-ainetta, joka reagoi pelkästään syöpäsolujen kanssa, on hyvin vai-

30 keaa valita suuresta määrästä tuotettuja vasta-aineita. 20 000 hybridoomaa, jotka olivat peräisin hiiristä, jotka oli immunisoitu ihmisen pienisoluisella keuhkokarsinoomalla, esimerkiksi seulottiin silmällä pitäen reaktiivisuutta syöpäsolujen kanssa (Science, 1982, 216:283). Toisin kuin

35 tämän tutkimusryhmän havaitsema hyvin alhainen frekvenssi

($< 0,4 \%$), aktivoitujen B-solujen hankkiminen tässä keksinnössä käytettävällä menetelmällä tuottaa jopa 16% kuolemattomaksi tehtyjä B-soluja, jotka ovat peräisin immunsoiduista paksusuolipotilaista, ja jotka tuottavat monoklonaalisia vasta-aineita, jotka reagoivat spesifisesti syöpäsolujen kanssa. Lisäksi hiiren B-soluista peräisin olevilla monoklonaalisilla vasta-aineilla on rajoitetut mahdollisuudet silmällä pitäen sovellutusta syövän hoidossa. Toistetun antamisen jälkeen ne stimuloivat ihmisen immuunijärjestelmän tuottamaan "anti-hiiri" -vasta-aineita, joiden on kliinisisissä kokeissa osoitettu vähentävän merkittävästi hiiren monoklonaalisten vasta-aineiden tehoa. Ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö voi kiertää nämä vaikeudet. Pelkkien vaihtelevien alueiden tai pelkkien komplementaarisuuden määrittävien alueiden (CDR:ien) käyttö antaa vielä pienemmän immunogeenisyyden todennäköisyyden, samoin kuin muita etuja. Pienempien molekyylien, kuten $V_H:n$ tai jopa yksittäisen CDR:n, kykyä poistua nopeasti elimistöstä voidaan käyttää hyödyksi, kun suunnitellaan nopeita in vivo -diagnostisia aineita.

Toinen ilmeinen ero ihmisen ja hiiren monoklonaalisten vasta-aineiden välillä on niiden immunohistokemiallinen värjääminen. Aikaisemmat tutkimukset hiiren vasta-aineilla ovat osoittaneet, että kasvainleikkeissä olevat solut värjäytyvät usein heterogeenisesti. Tämä reaktiivisuustapa johtuu joidenkin tutkijoiden mielestä syöpäsolujen antigeenisestä heterogeenisyydestä (Hand ym., Cancer Research, 43:728 - 735, 1983). Toisaalta tällä menettelytavalla kehitetyt ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet olivat homogeenisia mitä tulee niiden reaktiivisuuteen kasvainten kanssa, joiden kanssa ne eivät reagoineet. Uskottavan tuntuinen selitys hiiren monoklonaalisten vasta-aineiden heterogeeniselle värjäämiselle on se, että se heijastaa hiiren immuuniperäistä vaihe- tai solusykli-spezifisten erilaistumisantigeenien tunnistusta, joita syöpä-

solujen pinnalla esiintyy runsaasti, pikemminkin kuin mahdollisia kasvaimeen liittyviä antigeeneja. Ei ole epälogista odottaa, että kun hiiren immunisoi ihmisen syöpäsoluilla, ilmenisi huomattavaa antigeenista kilpailua, mikä johtaisi runsaampiin ja vallitsevampiin kudostyyppi- ja erilaistumisantigeeneihin, jotka kilpailisivat menestyksellä isännän immuunivasteesta suhteellisen vähäisten kasvaimeen liittyvien antigeenien kanssa. Täten ihmisen autologinen immunisointi voi johtaa sellaisten vasta-aineiden ilmaantumiseen, jotka on suunnattu antigeeniryhmää vastaan, joka on normaalisti hiiressä huonosti immunogeeninen. Tämä todistusaineisto viittaa siihen, että ihmiset ja hiiret voivat respondoida erilaisille kasvaintantigeeneille. Tätä teoriaa tukee löydös, jonka mukaan yksikään meidän tuottamistamme 36 ensimmäisestä ihmisen monoklonaalisesta vasta-aineesta ei näyttänyt reagoivan karsinoembryonisen antigeenin (CEA) kanssa, jonka tunnistavat yleisesti ne hiiren monoklonaaliset vasta-aineet, jotka on tehty ihmisen syöpäsoluja vastaan.

Suuri osa aikaisemmista yrityksistä kehittää ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita on käyttänyt B-soluja, jotka on eristetty joko perifeerisestä verestä tai kasvaimia sisältävien potilaiden imusolmukkeista. Uskottiin, että antigeenisen kasvaimen läsnäolo saisi aikaan sen, että kasvaimen sisältävässä yksilössä syntyisi immuuniresponssi tämän syöpää vastaan ja hän tuottaisi spesifisesti immuuneja B-soluja. Täten otettiin B-soluja niistä imusolmukkeista, jotka viemäroivät syöpäsolujen kasvaimia, tai perifeerisessä veressä olevista kiertävistä lymfosyyteistä. Ennen tätä keksintöä kasvainspesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden aikaansaaminen on kuitenkin onnistunut huonosti.

Kun halutaan saada aikaan monoklonaalisia vasta-aineita, jotka olisivat spesifisiä ihmisen kasvaintantigeeneille, pääongelma on ollut kykenemättömyys löytää spesi-

5 fisesti immuunien B-solujen lähde (Science, 1982, 216:
 285). Ihmisessä syöpäsolujen alkuperäisellä fokuksella on
 taipumus kasvaa pitkän aikaa, 1 - 10 % ihmisen eliniästä,
 ennen kuin taudista on mitään ilmeistä kliinistä todistus-
 10 aineistoa. Tässä vaiheessa potilaat ovat immunologisesti
 hyporesponsiivisia kasvaimilleen, tai mahdollisesti immu-
 nologisesti tolerantteja. Täten ennen tätä keksintöä ei
 voitu toistettavasti hankkia ihmisen monoklonaalisia vas-
 ta-aineita, jotka olisivat reaktiivisia syöpäsoluja vas-
 10 taan.

On kehitetty uusi ja tehokkaampi lähestymistapa
 hankkia monoklonaalisia vasta-aineita käyttämällä perifee-
 risen veren B-soluja potilaista, jotka on immunisoitu hei-
 dän omista kasvaimistaan peräisin olevilla soluilla spesi-
 15 fisissä rokotevalmisteissa. Jotta saataisiin aikaan aktii-
 vinen spesifinen immunoterapia, potilaat immunisoitiin
 kantasyöpäsoluilla, eli heidän omista kasvaimistaan peräi-
 sin olevilla soluilla. Tämä lähestymistapa otettiin sen
 teorian perusteella, että syöpäsolut ekspressoivat kas-
 20 vainspesifisiä antigeeneja.

Ihmisten, joissa oli syntynyt objektiivinen immu-
 niresponssi syöpäsoluja vastaan, havaittiin erityisesti
 olevan hyvä aktivoitujen B-solujen lähde. On osoitettu,
 että sellaisten potilaiden perifeerinen veri, jotka on
 25 immunisoitu aktiivisesti heidän omia kasvaimiaan vastaan,
 on sellaisten aktivoitujen B-solujen runsas lähde.

Kliinisisissä tutkimuksissa osoitettiin, että saadaan
 aikaan objektiivinen immuuniresponssi, kun potilaille,
 joilla on tietty syöpä, tehdään ihotestaus, eli viivästy-
 30 nyt ihon yliherkkyys (DCH). Immunisoiduilla potilailla oli
 viivästynyt ihon yliherkkyys omille paksu- ja peräsuolen
 syövilleen. Lisäksi ne monoklonaaliset vasta-aineet, jotka
 olivat peräisin immunisoitujen potilaiden B-soluista, rea-
 goivat muissa potilaissa sellaisten syöpien kanssa, jotka
 35 olivat samaa histologista tyyppiä. Nämä tulokset osoitta-

vat, että potilaan humoraalinen immuuniresponssi, vasta-
 aineiden tuotto, on suunnattu paksusuolen syöpää vastaan
 yleensä eikä ole ainutkertaisesti suunnattu immunisoidun
 potilaan omaa syöpää vastaan. Tämä yleinen vaste on eri-
 5 tyisen tärkeä standardisoidun rokotteen kehittelyä silmäl-
 lä pitäen.

Sellaisten B-solujen tuottaminen, jotka tuottavat
 vasta-aineita, joilla on reaktiivisuutta, joka on spesifi-
 nen kasvainsoluihin liittyvien antigeenien pinnalla olevia
 10 epitooppeja kohtaan, erityisesti solun pinnan antigeenien,
 kuten suurimmassa osassa tapauksista, on edullinen tulos,
 joka oli parhaimmillaankin spekulatiivinen, kun immuni-
 sointitutkimukset aloitettiin. Eläinkokeiden aikana, joi-
 hin ihmisen immunisointimenetelmät perustuivat, havainnoi-
 15 tiin ja mitattiin vain immunisoinnin terapeuttiset vaiku-
 tukset, ei kasvainspesifisten vasta-aineiden tuottoa.

Yleinen immuuniresponssi, johon liittyi koehenkilön
 tilan paraneminen, viittasi solutason responssiin, jossa
 makrofagit ja T-solut aktivoituvat kasvainsoluantigeenien
 20 läsnä ollessa ja tuhoavat kasvainsolut. Vaikka immunisoin-
 ti useimmissa olosuhteissa laukaisisikin ennustettavasti
 vasta-aine-responssin, vasta-aine-responssin ja solutason
 responssin kulku ajan suhteen olisi useimmissa tapauksissa
 erilainen. Lisäksi seikka, että potilaita immunisoitiin
 25 autologisilla kasvainsoluilla, se on: potilaan omilla syö-
 päsoluilla, ja aikaisempien tutkijoiden kokemus, että po-
 tilaan oma kasvain laukaisi vain vähäisen vasta-ainetuo-
 tannon tai ei mitään, teki havainnosta, jonka mukaan immu-
 nisoinnin jälkeen syntyy B-soluja, jotka tuottavat kas-
 30 vainspesifisiä vasta-aineita, odottamattoman edullisen
 tuloksen.

Tämä keksintö on tulosta löydetyistä tavoista,
 joilla voidaan valmistaa onnistuneita rokotteita aktiivis-
 ta spesifistä immunisointia varten; kehittää menetelmiä,
 35 joilla voidaan eristää immunisoituja ihmisen B-soluja; ja

kehittää menetelmiä, joilla voidaan pitää yllä ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita tuottavien solulinjojen jatkuvaa tuotantoa ja monoklonaalisten vasta-aineiden tuotantoa.

5 Keksinnön yhteenveto

Yksi tämän keksinnön tavoite oli kehittää ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, jotka olisivat spesifisesti reaktiivisia kasvaimiin liittyville antigeeneille ja minimaalisesti reaktiivisia ei-kasvainkudoksessa esillä oleville antigeeneille. Sellaiset vasta-aineet tarjoavat keinon, jolla voidaan havaita ja diagnosoida kasvaimia, ja joilla voidaan hoitaa potilaita, joilla on tietty syöpätyyppi. Toinen tavoite oli tunnistaa ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, jolla on nämä ominaisuudet, ja eristää, 10 immortalisoida ja viljellä solulinja, joka tuottaa tätä vasta-ainetta. Tavoitteena oli myös sekvenssoida valitun vasta-aineen vaihtelevat alueet ja eristää ja tunnistaa se raskaiden ja kevyiden ketjujen osa, joka sitoutuu tosiasiassa näiden antigeenien pinnalla oleviin epitooppeihin: 15 komplementaarisuuden määrittävät alueet. 20

Tämä keksintö sisältää EBV:llä transformoidun ihmisen B-solulinjan CO88BV59, joka tuottaa ihmisen IgG₃ κ:n, joka on spesifisesti reaktiivinen ihmisen paksusuolisyövän antigeenin pinnalla olevan epitoopin kanssa, samoin kuin 25 tämän vasta-aineen komplementaarisuuden määrittävien alueiden tunnistamisen ja sekvenssoimisen.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö on spesifisesti ihmisen diploidinen solulinja, immortalisoitu ihmisen B-solulinja, joka transformoitiin altistamalla se EBV:lle, ja jolle on annettu 30 nimeksi CO88BV59. Se tuottaa ihmisen IgG₃ κ -vasta-ainetta, joka on spesifisesti reaktiivinen paksusuolen kasvaimen antigeenin pinnalla olevan epitoopin kanssa, ja joka on määritetty samaan aikaan vireillä olevassa US-patenttihakemuksessa sarjanumero 07/343 475, jättöpäivä 28. helmi- 35

kuuta 1989. Tämä antigeeni tunnistettiin ensimmäiseksi käyttämällä ihmisen IgM-vasta-ainetta 16-88, joka on määriteltä US-patenttijulkaisussa 4 997 762, joka oli tuloksena samaan aikaan vireillä olevasta US-patenttihakemuksesta sarjanumero 07/038 811, jättöpäivä 15. huhtikuuta 1987, joka liitetään tähän kokonaisuudessaan viitteenä. IgG₃ κ 88BV59 ja IgM 16-88 tunnistavat saman syöpään liittyvän antigeenin, mutta reagoivat eri epitooppien kanssa tämän antigeenin pinnalla.

Esimerkki I

Herkistettyjen B-solujen valmistus

A. Potilaiden valinta

Potilaat, joille oltiin tekemässä paksu- tai peräsuolen syövän kirurgista resektiota, valittiin aktiivisen spesifisen immunoterapian satunnaistettuun kokeeseen. Satunnaistaminen tehtiin luokitellen aineisto patologisen vaiheen mukaan ja kaikista potilaista, jotka täyttivät kliiniset kriteerit, hankittiin kasvain. Ehdokkaat tutkimukseen olivat paksu- tai peräsuolen syövästä kärsiviä potilaita, joilla ei ollut aikaisempaa sairauskertomusta syövästä, jotka eivät olleet saaneet aikaisemmin kemoterapiaa tai sädehoitoa, ja jotka olivat sopivassa lääketieteellisessä tilassa noudattaakseen avohoitopotilaan hoito-ohjelmaa. Kokeeseen soveltuvat potilaat olivat niitä, joiden kasvain ulottui suolen seinämän läpi (Astler-Coller B2), joilla oli positiiviset imusolmukkeet (vaiheet C1, C2) tai potilaat, joilla oli metastaatinen tauti (vaihe D). Näiden luokitusten sisällä potilaat valittiin satunnaisesti osallistumaan joko hoidettavien tai ei-hoidettavien ryhmiin. Satunnaistamiskortit tuotettiin tietokoneella ja vedettiin perättäin kustakin kategoriasta leikkauksen jälkeen.

B. Kasvaimen hankkiminen

Kirurgisen resektion jälkeen suolinäyte vietiin heti sairaalan patologiselle osastolle ja avattiin sterii-

leissä oloissa. Syöpäkudos leikattiin irti, sijoitettiin steriileihin putkiin, jotka sisälsivät Hanksin tasapainotettua suolaliuosta (HBSS), joka sisälsi gentamisiinia 50 µg/ml, ja kannettiin heti jäällä laboratorioon käsitte-
 5 lyä ja jäädytystä varten.

C. Kiinteän kasvaimen ja suolen limakalvon hajottaminen

Sovellettiin Petersin ym. (Cancer Research, 39: 1353 - 1360, 1979) kudoksen hajotusmenetelmää käyttäen
 10 steriilejä menetelmiä koko ajan laminaarikaapissa. Syöpäkudos huuhdottiin kolmasti sentrifugiputkessa HBSS:lla ja gentamisiinilla ja siirrettiin petrimaljalle jäällä. Dissektointi kirurginveitsellä poisti ylimääräisen kudoksen ja kasvain jauhettiin paloiksi, joiden halkaisija oli noin
 15 2 - 3 mm. Kudokset sijoitettiin 75 ml:n pulloon, jossa oli 20 - 40 ml 0,14-%ista (200 yksikköä/ml) kollageenaasi tyyppi 1:tä (Sigma C - 0130) ja 0,1 % (500 Kunitzin yksikköä/ml) deoksiribonukleasi tyyppi 1:tä (Sigma D - 0876) (DNAase 1, Sigma D-0876), joka oli esilämmitetty
 20 37 °C:n lämpötilaan. Pullot, joissa oli upotettavat magneettisekoittajat, sijoitettiin 37 °C:n lämpöiseen vesihauteeseen, nopeudella, joka aiheutti aaltojen vierimistä mutta ei vaahtoamista. 30 minuutin inkubaation jälkeen vaapaat solut dekantoitiin kolmen steriilin keskimäärän nainlonverkkokerroksen läpi (166t: Martin Supply Co., Baltimore, Maryland) 50 ml:n sentrifugiputken läpi. Solut sentrifugoitiin 1 200 rpm:llä (250 g) jäädytetyssä sentrifugissa 10 minuutin ajan. Supernatantti kaadettiin pois ja solut resuspendoitiin 5 - 10 ml:aan DNAaasia (0,1 %
 25 HBSS:ssä) ja pidettiin 37 °C:n lämpötilassa 5 - 10 minuutin ajan. Putki täytettiin HBSS:llä, pestiin sentrifugimalla, resuspendoitiin 15 ml:aan HBSS:ää ja pidettiin jäällä. Menettely toistettiin, kunnes saatiin tarpeeksi soluja, yleensä kolme kertaa kasvainsolujen tapauksessa.
 30 Sitten eri digesteistä peräisin olevat solut yhdistettiin,
 35

laskettiin ja solujen elinkyky arvioitiin trypaanisiniekskluusiotestillä. Solut sentrifugoitiin lopullista pesua varten ennen säilyttämistä pakastimessa.

D. Säilyttäminen pakastimessa

5 Optimaalinen säilyttäminen pakastimessa oli tärkein huolenaihe. Rokotevalmistetta varten dissosioitujen kasvainsolujen tiheydeksi säädettiin $5 - 8 \times 10^7/\text{ml}$ HBSS:ssä ja ne lisättiin yhtä suuressa tilavuudessa jäähdytettyyn 2 x jäädäytysliuokseen, joka sisälsi 15 % dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja 4 % ihmisen seerumialbumiinia (HSA). Lopul-
10 linen suspensio, $2 - 4 \times 10^7$ solua/ml, sijoitettiin 1,2 ml:n Nunc-pakastuspulloihin. DCH-solutestausta varten menettely oli sama, paitsi että HSA:ta ei käytetty. Molemissa tapauksessa jäädäytymisen valmistelemiseksi Nunc-putket siirrettiin jäällä Cryo-Med model 990 Biological Free-
15 zer -laitteeseen, jossa oli model 700 Controller -ohjausyksikkö ja model 500 Temperature Recorder -lämmönmittauslaite kontrolloitua jäädäytysnopeutta varten. Pidettiin huolta siitä, että yksittäisten pullojen lämpötila, monitoripullo mukaan lukien, oli yhtäläinen jäädäytysmenetelmän
20 alussa. Pullot jäähdytettiin kontrolloidulla nopeudella $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ lopulliseen $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan. Pullot siirrettiin nestetyypessä nestetyyppisäiliöön.

E. Kliininen protokolla

25 Potilaat, joilla oli kasvaimia, joiden patologinen vaihe oli sovelias, saivat satunnaisesti joko autologisen syöpäsolu-BCG-rokoteen tai joutuivat olemaan ilman jatko-
hoitoa. Vaiheen D potilaat saivat kaikki 5-fluorourasiilikemoterapiaa ja kaikki sellaiset potilaat, joilla oli leesi-
30 oita suoliliepeen puolella (peräsuolen syöpä), saivat 5 040 radia röntgensäteilyä lantion alueelle kaksi viikkoa sen jälkeen, kun immunoterapia oli lopetettu. Rokotteet
aloitettiin 4 - 5 viikkoa kasvaimen resektion jälkeen, jotta immunologinen suppressio, jonka anestesia ja kirur-
35 gia oli saanut aikaan, saisi toipua tarpeeksi kauan. 3 -

4 viikkoa resektion jälkeen sekä kontrollipotilaille että hoidettaville potilaille tehtiin ihotesti standardinomaisilla muistiantigeeneilla samoin kuin asteittaisilla annoksilla heidän autologisia syöpäsolujaan. Käytetyt muistiantigeenit olivat: Sikotauti-ihotestin antigeeni, USP, Eli Lilly, Indianapolis, Indiana; Aplisol, PPD, (puhdistettu tuberkuliiniproteiini johdannainen), Parke-Davis, Detroit, Michigan; Trichophyton, laimennettu 1:30, Center Laboratories, Port Washington, New York; ja Candida albicans, laimennettu 1:100, Center Laboratories, Port Washington, New York, 0,1 ml kutakin sijoitettiin ihonalaisesti käsivarteen ja punotus ja kovettuminen tutkittiin 24 ja 48 tunnin kuluttua.

Potilaat, jotka valittiin hoitoprotokollaan, saivat 3 viikottaista ihonalaista rokoteinjektiota, jotka sisälsivät 10^7 säteilytettyä autologista kasvainsolua ja 10^7 BCG:tä kahdessa ensimmäisessä rokotteessa, ja viimeisessä oli pelkästään 10^7 kasvainsolua. Vasta jäädytetty Tice BCG, joka oli saatu tri Ray Crispeniltä, University of Illinois Medical Center, Chicago, Illinois, varastoitiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan. Ensimmäinen rokote sijoitettiin vasemman reiden etupuolelle noin 10 cm nivustaipeen alle, toinen vastaavaan paikkaan oikeassa reidessä ja kolmas oikean hartialihaksen alueelle.

25 F. Rokotteen valmistus

Menestyksekkäiden rokotteiden kriteerit on luetteloitu taulukossa 1. Ensimmäisen ja toisen rokotteen antopäivänä pullo sulatettiin nopeasti $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpöisessä vesihauteessa, kasvainsolut laimennettiin hitaasti 15 ml:aan HBSS:ää, pestiin kerran sentrifugoimalla 1 200 rpm:llä ja resuspendoitiin 15 ml:aan HBSS:ää. Solulaskennat ja viabiliteettimääritykset tehtiin trypaanisiniokluusiotestiä käyttäen. Viabiliteetti oli välillä 70 - 90 %, keskiarvo 80 %. Solut pestiin kerran sentrifugoimalla 1 200 rpm:ssä ja resuspendoitiin 15 ml:aan HBSS:ää.

Kasvainsolususpensio sijoitettiin jäille ja säteilytettiin 4 020 rad/min, kaikkiaan 20 000 radia. Solususpension tilavuus säädettiin sellaiseksi, että putkessa oli jäljellä 10^7 elinkelpoista syöpäsolua ($1,3 \times 10^7$ syöpäsolua sisällytetään mukaan, koska putkissa ja ruiskuissa voi mahdollisesti tapahtua solukatoa ja koska lymfoidisten solujen virheelliseen tunnistamiseen on noin 20 %:n todennäköisyys). Solut sentrifugoitiin, supernatantti poistettiin ja 10^7 BCG:tä lisättiin 0,1 ml:n tilavuudessa. HBSS:ää lisättiin tarpeeksi paljon, jotta lopullinen tilavuus oli 0,2 ml. Kolmas rokote valmistettiin vastaavalla tavalla, mutta BCG jätettiin pois.

Rokotesuspensio vedettiin "20 gauge" -kokoisen neulan läpi 1,0 ml:n tuberkuliiniruiskuun. "20 gauge" -kokoisen neula korvattiin "27 gauge" -neulalla ihonalaista injektiota varten ja neula sijoitettiin jäille klinikalle kuljetusta varten.

Potilaita tarkkailtiin huolella kunkin rokotteen jälkeen silmällä pitäen punotusta ja kovettumista injektiokohdissa, kuumetta, imusolmuketautia tai mitä tahansa haitallista reaktiota. Ensimmäiset kaksi rokotuskohtaa haavautuivat 2 - 3 viikon kuluttua, mutta paranivat aina 10 - 12 viikon sisällä.

Esimerkki II

Ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita tuottavien solujen tuotanto

A. Immunisoitujen B-solujen poistaminen potilaista ja käsittely

Potilaista otettiin verinäyte toisen immunisoinnin aikana, viikko ensimmäisen immunisoinnin jälkeen, ja kolmannen rokotuksen aikana, viikko toisen immunisoinnin jälkeen. Laskimoverta kerättiin aseptisesti säilöntäaineetoman hepariinin läsnä ollessa (O'Neill, Jones and Feldman, St. Louis, Missouri) niin, että lopullinen konsentraatio oli 17 yksikköä/ml. Veri säilytettiin huoneenlämpötilassa

ja siirrettiin laboratorioon nopeasti muutaman tunnin kuluessa keräämisestä.

Veri, joka oli laimennettu 1:2 kalsiumittomalla ja magnesiumittomalla HBSS:llä, pantiin kerrokseksi (4 ml) 5 lymfosyyttierotusaineen (3 ml) päälle (LSM, Litton Bionetics) ja sentrifugoitiin 15 ml:n sentrifugiputkessa 30 minuuttia 400 x g:ssä. Välikerroksen solut poistettiin, ne laimennettiin kolmella tilavuudella HBSS:ää ja ajettiin sakaksi sentrifugissa (1 000 rpm 10 minuuttia). Perifeerisen veren lymfosyytit resuspendoitiin 10 ml:aan seerumivapaata Hepes-puskuroitua Dulbeccan MEM:iä (DMEM), laskettiin ja viabiliteetti määritettiin.

EBV-transformaatiomenetelmä

Immunisoiduista potilaista peräisin olevat perifeerisen veren B-solut altistettiin tarkoituksella transformoiville agensseille, mikä johti jatkuvasti kasvaviin solulinjoihin, jotka tuottavat monoklonaalisia vasta-aineita. On käytetty EBV:tä transformoivana agenssina, vaikkakin voidaan käyttää mitä tahansa tehokasta lymfotrooppista virusta tai muuta transformoivaa agenssia, joka kykenee transformoimaan B-solut niin, että ne kasvavat jatkuvassa viljelmässä ja tuottavat silti monoklonaalisia vasta-aineita, jotka olivat spesifisiä kasvaimeen liittyville antigeeneille.

Meidän menetelmällämme heparinisoitu veri erotettiin LSM-gradientilla ja mononukleaarinen solufraktio kerättiin välikerroksesta. Mononukleaarista solufraktiota voidaan joko käyttää tässä vaiheessa tai säilöä pakastimeen myöhempää transformaatiota varten.

Lymfositit, joko tuoreet tai pakastetut, joko fraktioimattomat tai sellaiset, joista jotkin ei-B-solut oli poistettu, laskettiin ja $2 - 6 \times 10^6$ solua ajettiin solusakaksi. Sakaksi ajettut solut resuspendoitiin 5 ml:aan vasta kerättyä Epstein Barr -virusta, joka oli laimentamattoman B95-8-supernatanttinesteen muodossa, joka oli

kerätty 4 - 6 päivää vanhasta B95-8-solujen viljelmästä, kirkastettu sentrifugoimalla 2 000 rpm 15 minuuttia 4 °C:n lämpötilassa ja suodatettu 0,8 mikronin suodattimen läpi sen varmistamiseksi, että kaikki solut oli poistettu.

5 B95-8-solulinja hankittiin tri G. Tostadolta, Division of Biologics, FDA. Soluja ja EBV:tä inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 90 minuuttia viruksen adsorptiota varten. Viruksen adsorption aikana soluja ravisteltiin ajoittain.

Solut maljattiin kuoppiin, jotka sisälsivät säteilytettyjä feeder-soluja (kuten J774). Hiiren makrofagilinjaa J774 (ATCC, Rockville, Md.) säteilytettiin (20 000 radia) ja pakastettiin sitten. Tätä menetelmää varten feeder-solut sulatettiin ja sitten maljattiin (5×10^3 solua/kuoppa) 96-kuoppaisiin maljoihin päivää ennen B-solulinjan EBV-transformaatiota.

10
15

Soluviljelyelatusainetta vaihdettiin kahdesti viikossa jopa 6 - 8 viikon ajan. Supernatantinesteen seulonta kaivoista, joissa näkyi huomattavaa solujen kasvua, jolla tavalla saatiin seulottua ne solut, jotka valmistsivat ihmisen immunoglobuliinia, ja valittujen solulinjojen viljely suoritettiin US-patenttijulkaisussa nro 4 828 911 kuvattujen menetelmien mukaisesti monoklonaalista vastaainetta tuottavien solujen valikoimista ja viljelyä varten.

20

Solut, jotka valittiin ihmisen immunoglobuliinin tuottamista varten, viljeltiin ja kasvainreaktiivisuutta selektoitiin seulomalla ihmisen kasvainsiirrännäisiä vastaan. 88B59 seulottiin blokkia vastaan, joka käsitti neljä pakastettua, karvattomista hiiristä peräisin olevaa ihmisen paksusuolikarsinoomasiirrännäisleikettä. Käytettiin siirrännäisleikkeitä ja vasta-aineen suoraa leimaamista, jotta ihmisen immunoglobuliinin läsnäolo vältettäisiin.

25
30

C. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotanto

Ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta tuottavat solut kasvatettiin RPMI 1640 -elatusaineessa (Gibco, Grand

35

Island, New York), johon oli lisätty fetaalinaudan seerumia (10 %), L-glutamiinia (3 mM) ja gentamisiinia (5 µg/ml). Elatusaineeseen lisättiin joissakin tapauksissa lisäksi 25-%:ista D-glukoosia (lopullinen pitoisuus 0,25 %).

5 Soluja pidettiin 37 °C:n lämpötilassa (35 - 38 °C) kosteutetussa ilmakehässä, jossa oli 7,5 % CO₂ ilman seassa. Vasta-aine kerättiin hyvin metaboloituneesta käytetystä elatusaineesta ajamalla sentrifugilla elatusaine soluttomaksi (esim. sentrifugoimalla 500 rpm 15 minuutin ajan).

10 Esimerkki III

Monoklonaalisten vasta-aineiden reaktiivisuus normaaleille ja kasvainkudoksille

Suurimmalla osalla vasta-aineista sitoutuminen normaaliin paksusuolen limakalvoon oli vähentynyt oleellisesti.

15 Vasta-aineet, jotka olivat reaktiivisia parafiinileikkeiden kanssa, testattiin myös silmällä pitäen reaktiivisuutta normaalikudoksen kanssa. 88BV59 osoitti negatiivista reaktiivisuutta seuraavien normaalien ihmiskudosten kanssa: munasarja, kohtu, kives, vagina, lisämunuaisrauhaset,

20 eturauhanen, kilpirauhanen, kateenkorva, imusolmukkeet, perna, luuydin, sydänlihas, aivokuoren solut, iho, lihas ja hemopoieettiset solut. 88BV59 osoitti pientä reaktiivisuutta seuraavien kudosten kanssa: paksusuoli (harjareunus ja pinnan rauhaset), ohutsuoli (harjareunus

25 ja pinnan rauhaset), maha (mahan kuopakkeet ja pinnan rauhaset), ruokatorvi (rauhaset), haima (jokin tiehyen ja eksokriininen rauhasepiteeli), munuainen (50 % kokoojaputkista), kohdun kaula [epiteelisisusta (2/3 kudoksista oli positiivisia)], rinta (rakkulat ja tiehyiden epiteeli),

30 keuhko (jotkin alveolisolut ja bronkiaaliset solut), aivo [(astrozyytit (2/3 kudoksista oli positiivisia)], selkäydin (hermosyyhuovasto), iho (50 % rauhasista ihossa) ja maksa (sappitiehyet). 88BV59:n reaktiivisuus ihmisen kasvainsolulinjojen kanssa esitetään taulukossa 2. Taulukko 3

esittää 88BV59:n reaktiivisuuden kasvainkudosnäytteiden kanssa.

Sen lisäksi, että keksintö tarjoaa monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat reaktiivisia syöpäsolun pinnan antigeenien kanssa in vivo -diagnoosia ja syövän immunoterapiaa varten, se tarjoaa monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat hyödyllisiä koettimina, joilla voidaan eristää ja karakterisoida antigeeneja, jotka ovat relevantteja ihmisen syöpää koskevan immunitetin suhteen. Nämä antigeenit voivat lopulta osoittautua hyödyllisiksi syöpärokotteena. Lisäksi vasta-ainetta tuottavien diploidisten solujen aikaansaaminen lisää geneettisen stabiilisuuden ulottuvuuden sellaisten ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden tuotantoon, jotka ovat reaktiivisia kasvainsolun pinta-antigeenien suhteen.

Edellä kuvattu kuvaa uusien monoklonaalisten vasta-aineiden muodostamista, jotka ovat spesifisiä tietyille kasvaimille, monoklonaalisia vasta-aineita tuottavia solulinjoja ja menetelmiä niiden valmistamiseksi. Ymmärretään, että tässä kuvattujen menetelmien monet variaatiot ja modifikaatiot ovat ammattimiehen saatavilla, ja että sellaisten variaatioiden ja modifikaatioiden ajatellaan olevan tämän keksinnön suojapiirin sisällä.

Tämä keksintö on suunnattu erityisesti solulinjaan, joka tuottaa IgG₃ κ ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta 88BV59, joka talletettiin American Type Culture Collection -talletuslaitokseen, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, 13. joulukuuta 1990. 88BV59 tunnistettiin käyttämällä antigeenia, joka oli reaktiivinen ihmisen IgM 16-88:n suhteen, joka oli tuotettu diploidisella solulinjalla LiCo 16-88, kuten opetetaan US-patenttijulkaisussa 4 997 762, joka seurasi US-patenttihakemuksesta 038 811, jättöpäivä 15. huhtikuuta 1987, lohkohakemus USSN 697 078:sta, jättöpäivä 31. tammikuuta 1985. Talletettu solulinja tunnistetaan seuraavasti:

Tunniste**Talletusnumero**

Ihmisen B-soluperäinen solulinja
CO88BV59-1

CRL 10624

5 **Esimerkki IV**

88BV59:n kloonaukseen ja sekvenssointi

Kokonais-RNA, joka oli peräisin (diploideista) CO88BV59-soluista, valmistettiin Chomczynskin ja Sacchin menetelmällä (Analytical Biochemistry, vol. 162:156 - 159, 1987). Lyhyesti: solut ajettiin sakaksi, räjäytettiin sisäänpään neljämolaarisella guanidiini-isotiosyanaatilla, joka oli 25 mM natriumsitraatin suhteen, pH 7,0, 0,5 % sarkosyylin suhteen ja 0,1 M 2-merkaptotoetanolin suhteen, ja RNA uutettiin sen jälkeen kun oli lisätty 0,02 M natriumasetaattia, pH 4,0, 1 tilavuus fenolia ja 0,2 tilavuutta kloroformia. Näytteitä sentrifugoitiin 10 000 g:ssä 20 minuuttia 4 °C:n lämpötilassa ja vesifaasi siirrettiin tuoreeseen putkeen ja saostettiin uudestaan yhdellä tilavuudella isopropanolia tunnin ajan -20 °C:n lämpötilassa. Kun solusakat oli resuspendoitu guanidiini-isotiosyanaattipohjaiseen liuokseen ja saostettu uudelleen isopropanolilla, solusakat pestiin 75-%:isella etanolilla ja resuspendoitiin 0,5-%:iseen SDS:ään. Oligo-dT-selluloosakromatografia (Aviv ja Leder, PNAS, volyymi 69:1408 - 1412, 1972) suoritettiin, jotta saataisiin selektoitua polyA (+) -lähetti-RNA standardimenetelmällä.

A. cDNA-synteesi

1,2 µg 88BV59 poly A (+):aa yhdistettiin 1 µg:aan Promega NotI oligo-dT-alueadapteria (5' CAATTCGCGGCCGC (T)₁₅3') kuumentamalla 70 °C:n lämpötilaan ja jäädyttämällä nopeasti jäällä. (500 µM)₄ dNTP:itä ja 200 yksikköä Life Technologies Inc:in Moloneyn hiiren leukemiaviruksen RNaa-si H -käänteistranskriptasaa (Superscript)TM lisättiin ja inkuboitiin 50 mM Tris-HCl:ssä, pH 8,3, joka oli 75 mM KCl:n, 3 mM MgCl₂:n ja 10 mM DTT:n suhteen, 60 minuuttia

37 °C:n lämpötilassa. Toisen juosteen synteesi suoritettiin lisäämällä 187 µM dNTP:t, 40 yksikköä *E.colin* DNA-polymeraasi I:tä, 15 yksikköä *E. colin* DNA-ligaasia ja 1,4 yksikköä *E. colin* RNAaasi H:ta 19 mM Tris-HCl:ssä, pH 6,9, joka oli 90 mM KCl:n, 4 mM MgCl₂:n, 125 µM:n β-Nad:n ja 50 mM ammoniumsulfaatin suhteen. Kun oli inkuboitu 16 °C:n lämpötilassa kaksi tuntia, reaktio pysäytettiin 50 mM EDTA:lla ja cDNA puhdistettiin fenoliuuttamisella ja etanolisaostuksella. Kaksijuosteisen cDNA:n 5'-pää tasattiin lisäämällä 10 yksikköä T₄-DNA-polymeraasia 225 µM dNTP:ien ollessa läsnä 0,3-kertaisessa toisen juosteen cDNA:n synteesin puskurissa. Kun oli inkuboitu 37 °C:n lämpötilassa kymmenen minuuttia, reaktio pysäytettiin 20 mM EDTA:lla, joka oli 0,2-%:inen SDS:n suhteen, uutettiin fenolilla ja saostettiin etanolilla. Tuloksena oleva tasoitettu, täytetty kaksijuosteinen cDNA resuspendoitiin H₂O:hon ja sitä käytettiin jatkossa.

Promegan Ribaclone™ EcoRI -linkkeriligaatiosysteemi I:tä käytettiin metyloimaan mitkä tahansa sisäiset EcoRI-kohdat kaksijuosteisessa cDNA:ssa ja tämän jälkeen lisäämään EcoRI-kohdat tasoitettuihin, kaksijuosteisiin cDNA-päihin. cDNA:han lisättiin 10 yksikköä EcoRI-metylaasia ja (100 µM) S-adenosyyli-L-metioniinia 100 mM Tris-HCl:ssä, pH 8,0, joka oli 10 mM EDTA:n suhteen, ja inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa 15 minuuttia. Kun oli tehty lämpöinaktivaatio 70 °C:n lämpötilassa kymmenen minuutin ajan ja fenoliuutto, metyloitu cDNA saostettiin etanolilla. Toiseen puoleen metyloitua cDNA:ta lisättiin EcoRI-linkkerit 30 mM Tris-HCl:ssä, pH 7,8, joka oli 10 mM MgCl₂:n, 10 mM ATP:n, 1 mM DTT:n ja 100 µg/ml BSA:n suhteen, ja 25 Weissin yksikköä T₄-DNA-ligaasia katalysoi EcoRI-linkkerien, jotka olivat läsnä 50-kertaisena molaarisena ylimääränä, lisäämistä cDNA-päähän, kun inkuboitiin yli yön 15 °C:n lämpötilassa. Kun ligaatioreaktio oli inaktivoitu lämmöllä 70 °C:n lämpötilassa kymmenen minuutin ajan, cDNA diges-

toitiin restriktioentsyymeillä sekä EcoRI että NotI (kumpaakin 20 yksikköä) 37 °C:n lämpötilassa 2 tuntia. EDTA ja SDS lisättiin (20 mM) ja vastaavasti (0,2 %)_f, ja fenoliuuton jälkeen vesifaasi vietiin Sepharacryl[®]-S-400-sentrifugipylväiden läpi ylimääräisten linkkereiden ja hyvin pienten cDNA-molekyylien poistamiseksi. Kun oli lisätty ammoniumasetaatti (2 M)_f ja 2 tilavuutta etanolia, cDNA saostettiin ja resuspendoitiin 10 µl:aan dH₂O:ta.

B. Kirjaston muodostaminen

5 µl 88B59-cDNA:ta ligoitiin 1 µg:aan Promega Corporationin λgt11:n NotI-EcoRI-käsivarsia ja tuloksena oleva DNA pakattiin *in vitro* -faagipartikkeleihin käyttämällä Gigapak Gold[™]:ia (Stratagene Corporation, La Jolla, CA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Faagiin pakattu DNA maljattiin 150 mm:n agarmaljoille tiheydellä noin 50 000 per malja.

Ihmisen IgG₃:n raskaan ketjun vakioalueelle spesifinen koetin saatiin suoraan ligoitumattomasta 88B59-cDNA:sta. Oligonukleotidi, joka oli komplementaarinen aminohapoille 115-121 IgG₃:n raskaan ketjun CH₁-alueelle, se on: 5' TCCACCAAGGGCCCATCGGTC 3', joka ulottui 3'-suuntaan, ja toinen oligonukleotidi, joka oli komplementaarinen aminohapoille 222-217, se on: 5' TTTCTTGTCCACCTTGGTGT 3'. joka ulottui 5'-suuntaan, syntetisoitiin Milligen-syntetisaattorissa ja puhdistettiin valmistajien ohjeiden mukaisesti. 100 pM oligonukleotideja käytettiin hyödyksi standardinomaisessa polymeraasiketjureaktiossa (PCR[™]) käyttämällä Cetusin Ampli-Taq[™]-polymeraasia, jossa oli 1 µl 88BV59-cDNA:ta, ja jossa denaturoitiin 94 °C:n lämpötilassa 1 minuutti ja alukkeiden annettiin hybridisoitua 52 °C:n lämpötilassa yksi minuutti ja alukkeita jatkettiin 72 °C:n lämpötilassa yksi minuutti. PCR tuotti 291-emäspärin pituisen, ihmisen IgG₃ CH₁:lle spesifisen fragmentin. Fragmentti radioleimattiin ³²P:llä Boehringer Mannheimin satunnaisalukkeita käyttävällä tarvikesarjalla (Boehringer

Mannheim, Indianapolis, IN) valmistajan menetelmän mukaisesti ja 500 000 faagia seulottiin ^{32}P -leimatulla IgG₃-fragmentilla. Plakkihybridisaatio suoritettiin 6 x SSC:ssä, joka oli 1 x Denhardtin reagenssin ja 0,01 % SDS:n suhteen, ja 50 µg/ml denaturoidun taimenen sperman DNA:n suhteen, 65 °C:n lämpötilassa 18 tuntia. Lopulliset pesut tehtiin 0,1 x SSC:ssä, joka oli 0,1 % SDS:n suhteen, 61 °C:n lämpötilassa.

Oligonukleotidi, joka oli komplementaarinen kohdille 109 - 114 ihmisen Cx-geenissä, se on: 5' ACTGTGGCTGCAC-CATCT 3', syntetisoitiin ja 5'-pää leimattiin T4-polynukleotidikinaasilla (New England Biolabs, Beverly, MA), ja käytettiin hyödyksi seulottaessa 150 000 plakkia. Hybridisaatio oli identtinen raskaaseen ketjuun verrattuna, paitsi että se suoritettiin 42 °C:n lämpötilassa 16 - 18 tunnin ajan. Lopulliset pesut kevytketjun koettimelle tehtiin 1 x SSC:ssä, joka oli 0,1 % SDS:n suhteen, 42 °C:n lämpötilassa.

Positiiviset kloonit tunnistettiin molemmista kirjastoista autoradiografian jälkeen ja joko seitsemän (kevyelle ketjulle) tai kahdeksan (raskaalle ketjulle) yksittäistä plakkia eristettiin kolmen plakkipuhdistuskierroksen jälkeen. Suoritettiin PCR-monistus, joka käytti hyödyksi Promega Corporationin λ gt11:n etusuunnan ja käänteisiä alukkeita, joiden annettiin hybridisoitua 42 °C:n lämpötilassa, jolloin käytettiin erää 1 ml:n lysaatista kustakin λ -kloonista. Inserttien koot määritettiin agarosi-geelielektroforeesilla.

C. Faagi-DNA:n subkloonaus

Itsenäiset faagit, joilla oli kullakin odotetun kokoinen insertti täyspitkille IgG₃- tai κ-kevytketjuille, kasvatettiin 40 ml:n viljelmissä m.o.i-arvolla 100 solua per yksi faagi 37 °C:n lämpötilassa 6 tunnin ajan. Solu-roskan poiston jälkeen supernatantit digestoitiin 1 µg/ml DNAaasilla ja RNAaasilla 37 °C:n lämpötilassa 2 tunnin

ajan ja faagit saostettiin 5-%:isella polyetyleeniglykolilla ja 0,5 M natriumkloridilla 2 tunnin ajan 4 °C:n lämpötilassa. Faagit ajettiin sakaksi sentrifugilla ja kloroformiuuttamisen jälkeen, joka poisti ylimääräisen polyetyleeniglykolin, faagi-DNA uutettiin kahdesti yhtä suurella tilavuudella fenolia, jota seurasi yksi kloroformiuutos. Kahden etanolitilavuuden lisääminen mahdollisti λ -DNA:n kiertämisen lasisauvan ympärille ja sen siirron ja liuottamisen 10 mM Tris-HCl:ään, pH 7,4, joka oli 1 mM EDTA:n suhteen. λ -DNA:t katkaistiin EcoRI:llä ja NotI:llä (20 - 40 yksikköä kumpaakin) 37 °C:n lämpötilassa 2 tunnin ajan. Ig-cDNA-insertit puhdistettiin 0,7-%:isista alhaisessa lämpötilassa sulavista agarosigeeleistä FMC-Bioproduktin, Rockland, ME, menetelmien mukaisesti. pGEM11fz(-) (Promega Corporation, Madison, WI) -vektori katkaistiin kahdesta kohdasta EcoRI:llä ja NotI:llä ja kun entsyymit oli inaktivoitu lämmöllä, 5'-pään fosfaatit poistettiin vasikan suoliston emäksisellä fosfataasilla (CIAP) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) inkuboimalla 0,5 yksikköä CIAP:ia 37 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia 10 mM Tris-HCl:ssä, pH 8,0, joka oli 0,1 mM EDTA:n suhteen. Etanolisaostuksen jälkeen vektori ligoitiin geelissä puhdistetun insertin kanssa huoneenlämpötilassa 2 - 3 tunnin ajan, ja ligaatio transformoitiin kompetentteihin TG-1-soluihin (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL) Maniatiksen ym. mukaisesti. Kloonit, jotka sisälsivät immunoglobuliinin raskaan ja kevyen ketjun insertit, tunnistettiin pienen mittakaavan plasmidikasvatuksella ja analysoimalla EcoRI:llä ja NotI:llä katkaistut plasmidi-DNA:t ja erottamalla ne agarosigeeleissä, kuten on kuvattu Maniatiksen ym. teoksessa.

D. PCR-pohjainen faagi-DNA:n subkloonaus

Itsenäisten faagi-inserttien PCR-monistus, jossa käytettiin hyväksi λ gt11:n etusuunnan ja käänteisiä alukkeita (Promega Corporation, Madison, WI), joiden annet-

tiin hybridisoitua 42 °C:n lämpötilassa, tuotti faagin,
 jolla oli odotetun kokoiset täyspitkät immunoglobuliinin
 raskaan ja kevyen ketjun cDNA:t. PCR-tuotteet digestoi-
 tiin EcoRI:llä ja NotI:llä, puhdistettiin ja ligoitiin
 5 pGEM11fz(-)-vektoriin, joka oli katkaistu EcoRI:llä ja
 NotI:llä. Transformanteista peräisin oleva DNA, jossa oli
 joko Ig H tai L-insertit, valmistettiin Maniatiksen ym.
 mukaisesti ja sekvenssoitiin käyttämällä dideoksimenetel-
 mää ja Sequenase™-entsyymiä (US Biochemical Corporation,
 10 Cleveland, OH) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Promega
 Corporationin T7-polymeraasin promoottorille spesifistä
 oligonukleotidia, joka sijaitsi heti 5'-pään suunnassa
 immunoglobuliini-inserteistä, käytettiin sekvenssoitaessa
 sekä VH- että VL-cDNA:iden 5'-osa. V_H-alueen jatkosekvens-
 soinnissa käytettiin oligonukleotidia, joka oli komplemen-
 taarinen aminohapoille 113 - 110 ihmisen J_H:ssa (se on:
 5' TGAGGAGACGGGTGACC 3'). Tämän jälkeen syntetisoitiin
 erilliset oligonukleotidit, jotka olivat komplementaarisia
 aminohapoille +1 - +6 sekä V_H:ssa että V_L:ssä. PCR-subkloo-
 20 nausta varten käytettiin kappa-kevytketjun oligonukleoti-
 dia, joka oli komplementaarinen Cκ-vakioalueen aminoha-
 poille 214 - 209, samoin kuin sen soveliasta Vκ:n aminoha-
 poille 1 - 6 spesifistä oligonukleotidia. Muokattu Fab'
 raskasketjun fragmentti, joka käsitti aminohapot 1 - 241,
 25 saatiin PCR:n pohjalta, jossa käytettiin oligonukleotidia,
 joka oli komplementaarinen aminohapoille 241 - 236, ja
 toista, joka oli komplementaarinen aminohapoille 1 - 6
 V_H:ssa. Vastaavasti Fab-konstruktia varten Fd-raskasket-
 jun fragmentti saatiin aikaan PCR:llä, jossa käytettiin
 30 oligonukleotidia, joka oli komplementaarinen aminohapoille
 222 - 216, ja edellä mainittua 5'-pään VH-aminohappojen
 1 - 6 oligonukleotidia. Kaikki aminohappojen numeroinnit
 perustuvat Kabatin ym. sääntöihin (Sequences of Proteins
 of Immunological Interest, Fourth Edition, NIH, 1987).
 35 Soveliaat restriktioentsyymikohdat sijoitettiin kunkin

oligonukleotidin 5'- ja 3'-päähän, mikä mahdollisti subkloonauksen bakteeriekspressiovektorin pSWV_HPOLY muokattuun versioon, joka oli lahja Greg Winteriltä, MRC, Cambridge, Englanti.

5 Yksittäiset subkloonit, kaksi Fab:lle ja kaksi Fab':lle, analysoitiin ja sekvenssoitiin käyttämällä dideoksimenetelmää Sequenasella™.

pSWV_HPOLY:ssä olevan Fab'-cDNA:n 5'- ja 3'-pää on muokattu sisällyttämällä soveliaita restriktiokohtia PCR:llä ja käyttämällä hyödyksi pSWV_HPOLY Fab'-cDNA:ta tehtiin PCR, jotta tämä koko koodittava cDNA-jakso saataisiin siirrettyä pET-järjestelmään (Novagen Corporation, Madison, WI).

15 Koko kevytketjun ja Fab'-raskasketjun sekvenssi määritettiin pET-järjestelmän Fab:ia silmällä pitäen ja koko Fab:n sekvenssi pSWV_HPOLY:ssä määritettiin itsenäisesti kahdelle eri subkloonille. Kuviossa 1 esitetään kaavio, joka kuvaa näiden kloonien sekvenssoinnissa hyödynnettyä strategiaa. Taulukko 4 esittää todellisen nukleotidisekvenssin ja kahden oligonukleotidin sijainnin, joita käytettiin, kun johdettiin 88BV59:n raskas- ja kevytketjujen sekvenssiä. Koko raskasketjun sekvenssi leaderista aminohappoon 242 esitetään kuviossa 1. 88BV59 käyttää V_HIII:aa ja D-aluetta, joka on kenties peräisin intra-D-D-rekombinaatiosta ja/tai geenikonversiosta somaattisen mutaation myötä. Se on radikaalisti erilainen kuin mikään sukusolulinjan D-alue. Se käyttää hyödyksi sukusolulinjaa J_{H3}.

25 Kuviossa 2 88BV59-kappakevytketjun sekvenssi osoitetaan CDR:ien ja vakioalueen eksonin sijainnilla. 88BV59 hyödyntää VkI:tä ja Jk5:ttä. NH2-pään ensimmäiset 22 tähdettä vahvistettiin aminohapposekvenssoinnilla.

30 On huomionarvoista, että kysteiini aminohappokohdassa 59 on läsnä 88BV59 V_H:n sisällä. Tämä kysteiini on vahvistettu sekä monien kloonien PCR-pohjaisista sekvensseistä että myös biologisesti monistetusta subklooni-λ-

faagista. Yhdelläkään toisella ihmisen vaihtelevan alueen raskasketjulla ei ole kysteiiniä tässä kohdassa, eli Kabatin kohdassa 59. Muilla harvinaisilla immunoglobuliineilla, eli $\leq 1\%$, on kuitenkin kysteiinejä jotka sijaitsevat niiden CDR:ien sisällä, mikä on määritetty joko aminohappo- tai DNA-sekvenssoinnilla.

Taulukko 1

Menestyksekkäiden rokotteiden kriteerejä aktiivista spesifistä immunoterapiaa silmällä pitäen

Adjuvantti

- 5 a) BCG (Phipps, Tice, Connaught); Lyofilisoitu, pakastettu [annosriippuvuus $> 10^6$ ($10^7 - 10^8$)]
 b) C. parvum (Wellcome Labs) [annosriippuvuus $> 7 \mu\text{g}$ ($70 \mu\text{g} - 700 \mu\text{g}$)]

Kasvainsolut

- 10 a) Entsymaattinen dissosiaatio
 1) Kollagenaasi tyyppi I (1,5 - 2,0 U/ml HBSS)
 2) DNAaasi (450 D.U./ml HBSS)
 3) 37 °C sekoittaen
 b) Säilytys pakastimessa
 15 1) Pakastus kontrolloidulla nopeudella (-1 °C/min)
 (7,5 % DMSO, 5 % HSA, HBSS)
 2) Viabiliteetti 80 %
 c) Röntgensäteilytys
 1) Tehtiin kasvaimia aiheuttamattomiksi 12 000 -
 20 20 000 R:n annoksella.

Komponentit ja annostus¹

- a) Adjuvantin suhde kasvainsoluihin - 10:1 - 1:1 (optimi)
 b) 10^7 kasvainsolua (optimi)
 c) 2 - 3 ihonsisäistä rokotusta viikon välein. Kolmas ro-
 25 kotus sisältää pelkästään kasvainsoluja.

¹ BCG-infektion kemoprofylaksia isoniatsidilla valinnainen.

BCG - Bacillus Calmette Guerin

HBSS - Hanksin tasapainotettu suolaliuos

30 DMSO - dimetyylisulfoksidi

HSA - ihmisen seerumialbumiini

R - radeja

PBS - fosfaattipuskuroitu suolaliuos

EDTA - etyleenidiamiinitetraetikkahappo

Taulukko 2

Ihmisen monoklonaalinen vasta-aine 88BV59

Epäsuora immunofluoresenssi asetonilla kestävyi-
dyillä kasvainsolulinjoilla^a

5	Solulinja	Kasvaintyyppi	Fluoresenssin intensiteetti
	Ht-29	Paksusuolen karsinooma	3+
	SKCO-1 ^c	Paksusuolen karsinooma	3+
	LS174	Paksusuolen karsinooma	4+
10	WiDr	Paksusuolen karsinooma	E.T. ^e
	HCT-8	Paksusuolen karsinooma	-
	Bt-20 ^b	Rintakarsinooma	3+
	Ep ^b	Rintakarsinooma	2+
	MCF-7	Rintakarsinooma	4+
15	SKBR-III	Rintakarsinooma	-
	CaLu-1 ^c	Keuhkon adenokarsinooma	4+
	A2780	Munasarjakarsinooma	-
	Ovcar3 ^c	Munasarjakarsinooma	4+ (30%) ^d
	WI-38	Normaaleja fibroblasteja	-

20

a) Fluoresenssin intensiteetti: 4+ vahva, 3+ keskinkertainen, 2+ heikosta keskinkertaiseen, 1+ heikko, - negatiivinen. 88BV59:n konsentraatio oli 10 µg/ml. Värjäys ihmisen IgG-kontrollilla konsentraationa 10 µg/ml oli negatiivinen kaikissa soluissa.

25

b) Värjää etusijassa mitoosivaiheen soluja.

c) Värjäys näyttää filamenttityyppisen sytoskeletonin värjäytymiskuvion.

30

d) Solujen prosenttiosuus, joilla oli osoitettu fluoresenssin intensiteetti, oli 100 % ellei toisin mainita.

e) E.T. = ei testattu.

Taulukko 3

88BV59:n reaktiivisuus eri kasvaintyyppien kanssa

	Kasvaintyyppi	Reaktiivisten kudosten määrä	Testattujen kudosten konaismäärä	Prosenttiosuus
5	Paksusuoli	74	84	88
	Rinta	22	23	99
	Munasarja	16	20	80
	Haima	14	17	88
10	Keuhko			
	Adenokarsinooma	6	6	100
	Suomuinen solu	7	8	88
	Pieni solu	0	1	0
	Eturauhanen	4	6	67
15	Melanooma	0	9	0

Taulukko 4

	Nimi	Sekvenssi	Nukleotideja (VH=+1)	Aminohappoja (VH=+1)
5	H15-1	5'GGAGTTTGGGCTGAGCTG3'	-55→-38	-19→-13 V _H - leaderissa
	H15-C	5'ACCTCCCAGGCTGGACCAC3'	46→28	17→11 V _H :ssa
	H15-A	5'GCAGGTACAGCGTGTCTTG3'	244→224	81→74 V _H :ssa
10	H15-B	5'GGAAGTAGTCCTTGACCAGG3'	474→455	149→142 CH ₁ :ssä
	CH1-5'	5'TCCACCAAGGGCCCATCGGT3'	379→399	115→121 CH ₁ :ssä
	H204→208	5'CTACACCTGCAACGTGAATC3'	614→633	205→212 saranaos.
15				
	Nimi	Sekvenssi	Nukleotideja (VK= +1)	Aminohappoja (VK= +1)
	VK 48-43	5'TAGATCAGGAGCTTAGGGGC3'	146→127	49→43
20	VK 10-16	5'GTCTGATCTGTAGGAGACAG3'	33→53	11→18
	VK 82-88	5'GCAACTTATTACTGTCAACAG3'	250→270	84→90
	K 170-177	5'AGCAAGGACAGCACCTACA3'	507→526	168→175

Patenttivaatimukset

1. Transformoitu ihmisen B-solu CO88BV59, jolla on ATCC:n talletusnumero CRL 10624.

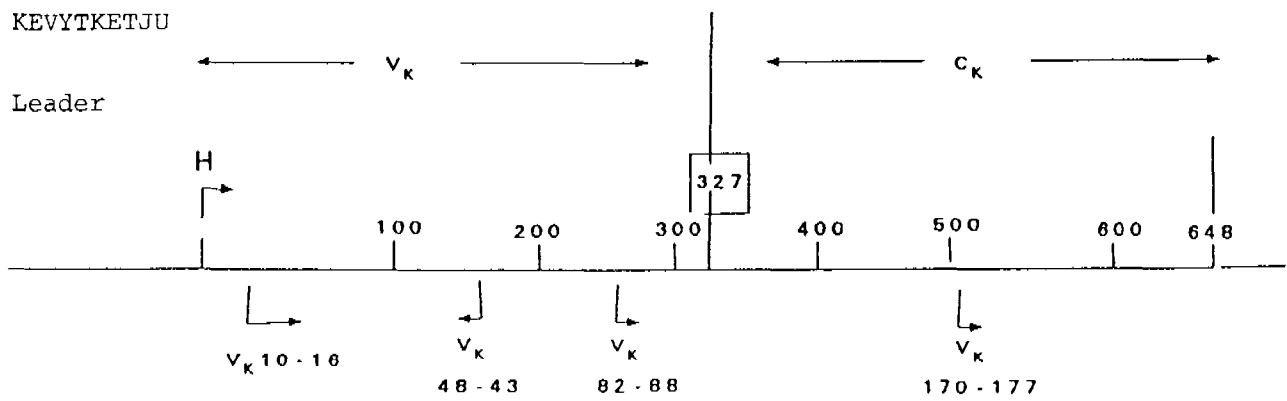
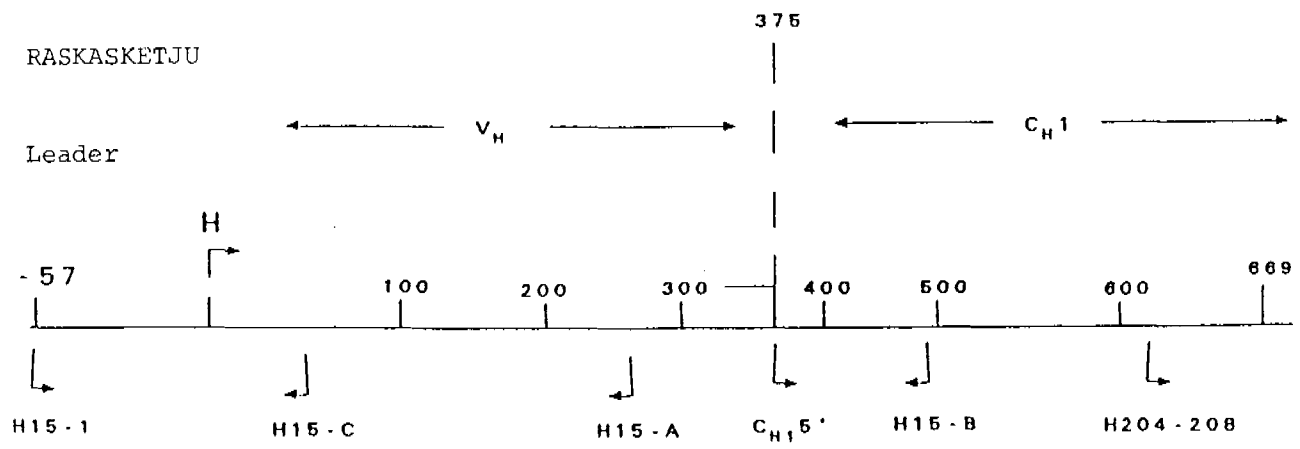
5 2. Menetelmä monoklonaalisen vasta-aineen 88BV59 tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään ihmisen transformoitu B-solu CO88BV59, jolla on ATCC:n talletusnumero CRL 10624 nestealustassa ja kerätään talteen nestealusta.

10 3. Eristetty ja puhdistettu epitooppi, t u n n e t t u siitä, että se reagoi patenttivaatimuksessa 2 esitetyn vasta-aineen kanssa.

Patentkrav

1. Transformerad human B-cell CO88BV59 med ATCC-deponeringsnumret CRL 10624.
- 5 2. Förfarande för framställning av en monoklonal antikropp 88BV59, k ä n n e t e c k n a t av att man odlar en transformerad human B-cell CO88BV59 med ATCC-deponeringsnumret CRL 10624 i ett vätskeformigt medium och tar tillvara det vätskeformiga mediet.
- 10 3. En isolerad och renad epitop, k ä n n e t e c k n a d av att den är reaktiv med antikroppen som definieras i krav 2.

Kuvio 1



88BV59-1 RASKASKETJU

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCCAG | VAR →
 MetGluPheGlyLeuSerTrpValPheLeuValAlaLeuLeuArgGlyValGlnCysGln 1
 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCC
 ValGlnLeuValGluSerGlyGlyGlyValValGlnProGlyArgSerLeuArgLeuSer 21
 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA | CDR1 →
 CysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerSerTyrGlyMethHisTrpValArgGlnAlaPro 41
 GGCAAGGGGCTGGATTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATGAATATTGTGCA | CDR2 → 52a
 GlyLysGlyLeuAspTrpValAlaValIleSerTyrAspGlySerAsnGluTyrCysAla 60
 GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTACCTG
 AspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsnThrLeuTyrLeu 80
 82 82a 82b | CDR3 →
 CAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACCGCTGTCTATTACTGTGTGAAAGAAGGGTTT
 GlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaValTyrTyrCysValLysGluGlyPhe 97
 100 100a 100b 100c 100d 100e 100f 100g 100h
 GGTTCAGTAGTGGTTATTACTCATCTTGCTTTTGTATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC
 GlySerValValValIleThrHisLeuAlaPheAspValTrpGlyGlnGlyThrMetVal 109
 | CH1 →
 ACCGTCTCTTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG
 ThrValSerSerAlaSerThrLysGlyProSerValPheProLeuAlaProCysSerArg 129
 AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 SerThrSerGlyGlyThrAlaAlaLeuGlyCysLeuValLysAspTyrPheProGluPro 151
 GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGNGTGACACCTTCCCNCTGTGTC
 ValThrValSerTrpAsnSerGlyAlaLeuThrSerGlyValHisThrPheProAlaVal 177
 CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG
 LeuGlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerSerValValThrValProSerSerSerLeu 198
 GGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
 GlyThrGlnThrTyrThrCysAsnValAsnHisLysProSerAsnThrLysValAspLys 221
 | HINGE → | END FAB'
 AGAGTTGAGCTCAAAACCCCACTTGGTGACACAACTCACACATGCCACGGTGCCAGAG
 ArgValGluLeuLysThrProLeuGlyAspThrThrHisThrCysProArgCysProGlu 241C
 CCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGAC
 ProLysSerCysAspThrArgProProCysProArgCysProGluProLysSerCysAsp 241W
 ACACCTCCCCCATGCCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCATGC
 ThrProProProCysProArgCysProGluProLysSerCysAspThrProProProCys 241QQ
 CCACGGTGC
 ProArgCys 242

V_H-alueella Kabatin ja Wun säännön mukaisesti on merkitty aminohapot 1 - 113

C_H-alueella on merkitty Kabatin ja Wun säännön mukaisesti aminohapot 114 - 242

88BV59-1 KAPPA-KEVYTKETJU

CGAGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGAC
 ArgGlyProAlaGlnLeuLeuGlyLeuLeuLeuLeuTrpLeuProGlyAlaArgCysAsp 1

ATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 IleGlnLeuThrGlnSerProSerPheLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThrIle 21

CDR1 ⇒
 ACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGG
 ThrCysArgAlaSerGlnGlyIleSerSerTyrLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGly 41

CDR2 ⇒
 AAGGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCTCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGG
 LysAlaProLysLeuLeuIleTyrAlaAlaSerSerLeuGlnSerGlyValProSerArg 61

TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA
 PheSerGlySerGlySerGlyThrGluPheThrLeuThrIleSerSerLeuGlnProGlu 81

CDR3 ⇒ 95A
 GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATGGTTACCCTCGGATCACCTTCGGCCAA
 AspPheAlaThrTyrTyrCysGlnGlnLeuAsnGlyTyrProArgIleThrPheGlyGln 100

CON ⇒
 GGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
 GlyThrArgLeuGluIleLysArgThrValAlaAlaProSerValPheIlePheProPro 120

TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
 SerAspGluGlnLeuLysSerGlyThrAlaSerValValCysLeuLeuAsnAsnPheTyr 140

CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
 ProArgGluAlaLysValGlnTrpLysValAspAsnAlaLeuGlnSerGlyAsnSerGln 160

GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
 GluSerValThrGluGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerLeuSerSerThrLeuThr 180

CTCAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
 LeuSerLysAlaAspTyrGluLysHisLysValTyrAlaCysGluValThrHisGlnGly 200

CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
 LeuSerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCys 214