



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



FI000117703B

(10) FI 117703 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

31.01.2007

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

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

940336

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

24.01.1994

(24) Alkupaivä - Löpdag

24.07.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

10.03.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US92/06194

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

25.07.1991 US 735064 P

23.03.1992 US 856281 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Idex Pharmaceuticals Corporation, 11011 Torreyana Road, San Diego, CA 92121-1104, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Newman,Roland A., 43111 Robbins Street, San Diego, CA 92122, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Hanna,Nabil, 3255 Fortuna Ranch Road, Olivenhain, CA 92024, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Raab,Ronald W.,§ 2468 Tulipan Way, San Diego, CA 92111, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kimeerisen vasta-aineen tuottamiseksi ja sitä koodaava nukleiinihappo
Förfarande för produktion av en chimär antikropp och för denna kodande nukleinsyra

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism:69030 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, nro 11, June 1991, Watanabe et. al., "Immunization of siman immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys with soluble human CD4 elicits an antiviral response", p. 4616-4620, Nature, vol. 332, 24 March 1988, Reichmann et al., "Reshaping human antibodies for therapy", p. 323-327, Seminars in Oncology, vol. 13, nro 2, June 1986, Houghton ja Scheinberg, "Monoclonal Antibodies: Potential Applications to the Treatment of Cancer", p. 165-179, Cellular Immunology, vol. 131, nro 1, November 1990, Truneh et al., "Humoral Response of Cynomolgus Macaques to Human Soluble CD4: Antibody Reactivity Restricted to Xeno-Human Determinants", p. 98-108, Journal of Immunological Methods, vol. 95, 1986, Van Meurs ja Jonker, "Production of primate monoclonal antibodies", p. 123-128

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Julkistetaan kimeerisiä vasta-aineita, jotka sisältävät vanhan mantereen apin-
osan ja ihmisosan, tällaisia vasta-aineita koodittava nukleiinihappo, monoklonaalisia vanhan mantereen apinavasta-aineita ja menetelmiä niiden tuottamiseksi ja käyttämiseksi.

Uppfinningen avser chimeriska antikroppar, vilka innehåller en del av en apa från gamla världen och en del av en människa, nukleinsyra, som kodar för sådana antikroppar, monoklonala antikroppar från en apa från gamla världen och förfaranden för deras framställning och användning.

Menetelmä kimeerisen vasta-aineen tuottamiseksi ja sitä koodaava nukleiinihappo

Keksinnön aihepiiri

5 Tämä hakemus on osittaista jatkoa Newmanin et al. US-patenttihakemukseen sarjanro 07/856 281, joka jätettiin 23. maaliskuuta 1992 ja on osittaista jatkoa US-patentti-hakemukseen sarjanro 07/735 064, joka jätettiin 25. heinäkuuta 1991, joiden muodostama kokonaisuus piirroksin
10 mukaan lukien sisällytetään täten viitteenä osaksi tätä hakemusta. Tämä keksintö koskee menetelmää kimeerisen vasta-aineen tuottamiseksi ihmisantigeenille sekä vasta-aineita koodaavaa yhdistelmänukleiinihappoa. Vasta-aineet ovat käyttökelpoisia ihmisen terapiaan.

15 **Keksinnön tausta**

Hiiren monoklonaalisia vasta-aineita käytetään ihmisen sairauksien diagnoosiin sekä ratkaistaessa biologisen tutkimuksen perusongelmia. Näitä reagensseja käytetään myös kliinisisissä kokeissa terapeuttisina aineina ihmisen sekä akuutteihin että kroonisiin sairauksiin, mukaan lukien leukemiat, lymfoomat, kiinteät kasvaimet (esim. paksusuolen, rinnan, hepatiitti), aids ja autoimmuunisairaudet.

On luotu kimeerisiä hiiri-ihmisvasta-aineita ja
25 niiden on osoitettu osoittavan hiirikantavasta-aineen sitoutumisominaisuuksia sekä säilyvään ihmisalueeseen liittyviä efektorifunktioita. Katso esim. Cabilly et al., US-patenttijulkaisu 4 816 567; Shoemaker et al., US-patenttijulkaisu 4 978 745; Beavers et al., US-patenttijulkaisu
30 4 975 369; ja Boss et al., US-patenttijulkaisu 4 816 397, jotka kaikki sisällytetään viitteenä osaksi tätä hakemusta. Yleensä nämä kimeeriset vasta-aineet rakennetaan valmistamalla genomigeenikirjasto DNA:sta, joka on uutettu ennalta olemassa olevista hiirihybridoomista. Nishimura et al., Cancer Research 47 (1987) 999. Kirjasto seulotaan
35 sitten vaihtuva aluegeenien suhteen sekä raskaista että

kevyistä ketjuista, jotka osoittavat oikeanlaisia vasta-
ainefragmenttiuudelleenjärjestäytymiskuvioita. Kloonatut
vaihtuva aluegeenit ligatoidaan sitten ilmentämisvektoriin,
joka sisältää tarkoituksenmukaisen raskaan tai ke-
vyen ketjun säilyvä alue-ihmisgeenin kloonattuja kasette-
ja. Kimeeriset geenit ilmennetään sitten valituissa solu-
linjassa, tavallisesti hiiren myeloomasolulinjassa.

Tällaisia kimeerisiä vasta-aineita on käytetty ihmisen
terapiassa. Ihmisvastaanottaja on kuitenkin muodostanut
näiden kimeeristen vasta-aineiden vastaisia vasta-
aineita lukuisissa tapauksissa. Tällaiset kimeerisen vasta-
aineen vastaiset vasta-aineet ovat tuhoisia terapian
jatkamiselle kimeerisellä vasta-aineella.

Erlich et al., Clinical Chemistry 34 (1988) 1681,
Erlich et al., Hybridoma 7 (1988) 385, Erlich et al.,
Hybridoma 6 (1987) 151, ja Erlich et al., Human Antibody
Hybridomas 1 (1990) 23 (joita ei myönnä esillä olevaa
hakemusta edeltäväksi tekniseksi tasoksi) ilmoittavat,
että ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden odotetaan
olevan parempia kuin hiiren monoklonaaliset vasta-aineet
ihmisen terapiaan in vivo. He olettavat myös, että ihminen
sietäisi ei-ihmiskädellisvasta-aineita, esim. simpanssin
monoklonaalisia vasta-aineita, koska ne ovat rakenteellisesti
samankaltaisia kuin ihmisvasta-aineet.
Koska ihmisvasta-aineet ovat ei-immunogeenisiä reesus-
apinoissa (eli ne eivät indusoi vasta-ainevastetta), he
ennustavat, että kädellisvasta-aineet ovat ei-immunogeenisiä
ihmisissä. He ilmoittavat, että vasta-aineiden testaaminen
ihmisissä on tarpeetonta, jos kädellisvasta-aineessa on
säilyvä aluerakenne, joka on identtinen ihmisen immunoglobuliinin
säilyvä aluerakenteeseen nähden, tai ainakin rakenne, joka ei
poikkea ihmisen immunoglobuliinista enempää kuin eri ihmisvasta-
aineet poikkeavat toisistaan. Täten he esittävät, että simpanssivasta-
aineet saattavat olla käyttökelpoisia ihmisen terapiassa.

Yhteenveto keksinnöstä

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää kimeerisen vasta-aineen tuottamiseksi, jolle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. Keksin-
5 tön keksintö koskee myös yhdistelmä-DNA-nukleiinihappoa, jolle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 19 esitetään. Tässä yhteydessä kuvataan menetelmiä vanhan mantereen apinan (jota kutsutaan tässä "apinaksi", esim. paviaani tai makaki) immu-
globuliinin vaihtuvaa aluetta koodittavien geenien anti-
10 geenia sitovien osien monistamista ja kloonauk-
sta, näiden geenien fuusiota kloonattuihin ihmisen tai simpanssin säilyvää aluetta koodittaviin geeneihin (ja ihmisen tai simpanssin kehyksiä koodittaviin geeneihin tarvittaessa) ja niiden ilmentämisestä ihmis-apinayhdistelmä-DNA-vasta-ainei-
15 na tai simpanssin apinayhdistelmä-DNA-vasta-aineina. Lisäksi kuvataan tällaisten yhdistelmä-DNA-vasta-aineiden (joka ilmaisu sisältää vasta-aineet, jotka on tuotettu fuusioimalla DNA:ta kahdesta eri vasta-ainegeenistä) käyttöä immunoterapeuttisina aineina ihmissairausten hoitamiseksi. Keksin-
20 tön keksintö perustuu siihen havaintoon, että kehityksellisesti etäiset apinat [esim. paviaani- tai makakiapinat (mukaan lukien cynomologus- ja reesus-apinat)] vastoin kuin simpanssit eivät ainoastaan ole riittävän erilaisia kuin ihmiset, jotta ihmisantigeenien vastaisia vasta-ai-
25 neita on mahdollista tuottaa näissä apinoissa, jopa suhteellisen säilyviä ihmisantigeenejä, esim. CD4 ja CD54, vastaan, vaan ovat riittävän samankaltaisia kuin ihmiset, jotta niillä on ihmisvasta-aineisiin nähden samanlaisia vasta-aineita, jolloin ei esiinny isännän anti-vasta-aine-
30 immuunivastetta viettäessä tällaisia apinavasta-aineita, tai niistä saatuja yhdistelmä-DNA-vasta-aineita, ihmiseen.

Vastoin kuin jotkut aiemmat ihmisen terapiassa käytetyt vasta-aineet esillä olevan keksinnön mukaisesti valmistetuilla vasta-aineilla ei ole useita huonoja puolia, esim. 1)
35 immunogeenisyys ja ihmis-antivasta-aine- (HAA-) vasteen in-

duktio toistuvassa annossa, joka on välttämätön kroonisten sairautilojen hoitamiseksi, 2) suhteellisen lyhyt puoliintumisaika ihmisvasta-aineisiin verrattuna, ja 3) efektorifunktioiden puuttuminen ihmissolujen tai -komplementin kanssa. Näiden huonojen puolien puuttuminen on esillä olevalla keksinnöllä saavutettu merkittävä etu ihmisterapialle vasta-aineilla. Esimerkiksi ihmisen kroonisten sairauksien kyseessä ollen, mukaan lukien autoimmuunisairaudet, tai mikä tahansa sairaus, jossa vasta-aineen pitkittynyt anto on välttämätön, yksi pääesteistä toistuvaan vasta-aineterapiaan on isännän vaste terapeutiseen vasta-aineeseen. HAA-vasteet ovat usein ennustamattomia potilaasta toiseen. Tällaiset vasteet kohdistuvat pääasiassa, vaikkakaan ei yksinomaan, vastaan vasta-ainemolekyylin säilyvää aluetta, ja ilmetessään ne usein sulkevat pois kaiken jatkoterapian tuolla vasta-aineella, tai toisella saman isotyyppin vasta-aineella, tai vähentävät tällaisen terapian tehokkuutta.

Mahdollisesti HAA-ongelmat voitaisiin kiertää käyttämällä ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita. Tämän lähestymistavan ongelmana ovat kuitenkin eettiset, kliiniset ja immunologiset rajoitukset, jotka liittyvät ihmiskohteiden immunointiin monilla valituilla antigeeneillä (esim. ihmisantigeenit, joka ilmaisu kattaa minkä tahansa proteiinien, polypeptidien tai niiden ihmisessä esiintyvän ekvivalentin antigeeniset tai immunogeeniset osat) vasta-aineiden muodostamiseksi. Hakijan lähestymistapaan tämän ongelman kiertämiseksi sisältyy vasta-aineiden muodostaminen, joilla on tarkoituksenmukainen spesifisyys ja haluttu efektorifunktio, ja niiden käyttö yhdistelmä-DNA-vasta-aineiden tuotannossa. Nämä yhdistelmä-DNA-vasta-aineet sisältävät yleensä tarkoituksenmukaisen osan immunoidusta apinasta saadun vasta-aineen vaihtuvasta alueesta, ja säilyvän alueen ihmis- tai simpanssivasta-aineesta. Täten monoklonaalisten vasta-aineiden spesi-

fisyydet ja korkeat affiniteetit säilytetään, ja tarkoituksenmukainen ihmisen tai simpanssin säilyvä alue, joka osoittaa haluttuja efektorifunktioita, voidaan vaikeuksitta valita.

5 Esillä oleva keksintö liittyy edelleen menetelmään apinaimmunoglobuliinigeenien monistamiseksi, esim. polymeraasiketjureaktiolla (PCR), apinaimusoluista uute-
tusta RNA:sta käyttäen synteettisiä oligonukleotidialuk-
keita, jotka ovat spesifisiä raskaan ja kevyen ketjun
10 vaihtuva alue-geeniryhmille. Monistetut geenit tai tar-
koituksenmukaiset osat (esim. komplementaarisuusmääritys-
alue- (CDR-) koodausalueet; katso Winter, GB-patenttiha-
kemusjulkaisu nro 218 863 8A, joka täten sisällytetään
viitteenä osaksi tätä hakemusta) kloonataan ilmentämis-
15 vektoriin, joka sisältää ihmisen tai simpanssin säilyvä
aluegeenin, apina-ihmisyhdistelmä-DNA-vasta-aineen tuot-
tamiseksi, tai vektoriin, joka sisältää simpanssin säilyvä
aluegeenin, apina-simpanssiyhdistelmä-DNA-vasta-aineen tuot-
tamiseksi, jolla on haluttu isotyyppi. Nämä vasta-aineet
20 edustavat immunoterapeuttisia aineita, jotka kykenevät
paikantamaan ja/tai tappamaan tarkoituksenmukaisia kohde-
soluja (esim. kasvainsoluja) annon in vivo jälkeen.

Täten ensimmäisenä näkökohtana keksintö käsittää
menetelmän apinavasta-ainegeenin vaihtuvan alueen anti-
25 geenin tunnistavan osan kloonaukseksi. Tämän menetelmän
mukaan hankitaan nukleiinihappo, esim. RNA, apinasta, muo-
dostetaan RNA:sta cDNA (käyttäen käänteiskopioijaentsyy-
miä), hankitaan aluke, joka on komplementaarinen cDNA-
sekvenssiin nähden, joka koodittaa vasta-ainegeenin
30 5'-johtosekvenssiä, saatetaan tuo cDNA ja aluke kosketuk-
siin hybridikompleksin muodostamiseksi ja monistetaan cDNA
nukleiinihapon tuottamiseksi, joka koodittaa apinavasta-
ainegeenin vaihtuvaa aluetta.

"Antigeenin tunnistavalla osalla" tarkoitetaan api-
35 navasta-aineen vaihtuvan alueen yhtä tai useampaa osaa,

joka on/jotka ovat vastuussa sitoutumisesta vasta-aineen kohdeantigeeniin (tai epitooppiin tai idiotyyppiin) tai sen tunnistuksesta. Esimerkiksi siihen sisältyvät CDR-alueet (katso alla) tai sisältyy vaihtuva alue kokonaisuudessaan, tai mikä tahansa yhdistelmä näistä kahdesta alueesta, mukaan lukien mahdolliset muutokset koodausalueilla, jotka voidaan suorittaa alueen tekemiseksi enemmän ihmisen kaltaiseksi kuin apinan kaltaiseksi muuttamatta vasta-aineen spesifisiä sitoutumisominaisuuksia. Jos vain
10 osaa vaihtuvasta alueesta kokonaisuudessaan käytetään, jäljellä olevat osat, esim. ns. "kehys", otetaan toisesta vasta-aineesta, edullisesti ihmis- tai simpanssivasta-aineesta (katso alla sekä edellä viitattu ja tähän osaksi viitteenä sisällytetty alan tekninen taso).

15 Ilmaisuja "vaihtuva alue", "johtosekvenssi", "säilyvä alue" ja "kehys" käytetään niiden alalla tavanomaisesti tulleeella tavalla, mistä esimerkkejä annetaan jäljempänä ja edellä viitatussa ja tähän viitteenä sisällytetyssä alan teknisessä tasossa.

20 Edullisissa suoritustavoissa johtosekvenssi on noin 60 emäksen ihmis-, simpanssi- tai apinajohtosekvenssi, josta esimerkkejä annetaan kuviossa 1.

 Hakija on havainnut, että apinan, simpanssin ja ihmisen vaihtuva aluejohtosekvenssit ovat riittävän samankaltaisia, jotta yhdelle rakennetut alukkeet ovat sopivia toisen monistamiseen. Menetelmässä RNA:ta monistetaan riittävästi riittävän määrän nukleiinihappoa tuottamiseksi tuon nukleiinihapon sijoittamiseksi vektoriin myöhempiä kloonauksia varten.

30 Toisena näkökohtana keksintö käsittää menetelmän ihmisantigeenin vastaisen vasta-aineen tuottamiseksi, joka vasta-aine ei ole immunogeeninen ihmisissä. Menetelmässä tuotetaan apinassa apinavasta-aine ihmisantigeenille ja eristetään apinanukleiinihappo, joka koodittaa apinavasta-aineen vaihtuvan alueen antigeenin tunnistavaa
35

osaa. Hankitaan ihmisnukleiinihappo, joka koodittaa vasta-aineen säilyvää ihmisaluetta, ja se ligatoidaan apinanukleiinihappoon yhdistelmä-DNA-nukleiinihapon muodostamiseksi. Tämä yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo ilmennetään sitten halutun vasta-aineen tuottamiseksi. Vaihtoehtoisesti simpanssin säilyvää aluetta koodittavaa nukleiinihappoa voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-vasta-aineen muodostamiseksi. Ihmisen ja simpanssin säilyvien alueiden aminohapposekvensseissä on vähän, jos lainkaan, eroja (eli ne ovat homologisia), ja ihmisen ja apinan välillä olevia eroja voidaan vaikeuksitta muuttaa vakiotekniikoilla, jos apinan säilyvää aluetta koodittavaa nukleiinihappoa käytetään yhdistelmä-DNA-vasta-aineen muodostamiseksi. Se kaikki, mikä on kriittistä keksinnössä, on, että tuotetaan vasta-aine, joka on vähemmän immunogeeninen kuin apinan säilyvä alue, jolloin mitään merkittävää immuunivastetta ei seuraa viettäessä yhdistelmä-DNA-vasta-aine ihmiseen. (Tällaisia vasta-ainealueita kutsutaan tässä homologisiksi alueiksi.) Täten yhdistelmä-DNA-vasta-aine suunnitellaan ja rakennetaan funktionaalisesti samaksi kuin ihmisvasta-aine sen aminohapposekvenssin osalta, eli siinä on säilyvä alue, joka on homologinen ihmisen tai simpanssin vasta-aineen säilyvään alueeseen nähden. Yhteenvetona vasta-aine on siinä määrin ihmisvasta-aine kuin on välttämätöntä sen mahdollisuuden vähentämiseksi, että vasta-aineelle esiintyy epätoivottava immunologinen vaste, ja sisältää antigeeniin sitoutuvan osan apinavasta-aineesta.

"Ei-immunogeenisellä" tarkoitetaan, että vasta-aine ei tuota riittävän suuruista vasta-ainevastetta vähentääkseen vasta-aineen jatkuvan annon tehokkuutta valtaosassa ihmisiä riittävän pitkään aikaan terapeuttiseen tehokkuuteen pääsemiseksi, esim. verrattuna kimeeriseen hiiri- tai hiiri-ihmisvasta-aineeseen. Edullisesti ei havaita mitään vasta-ainevastetta.

Edullisissa suoritusmuodoissa menetelmän mukaan immortalisoidaan apinasolu, joka on vastuussa apinavastaa-
aineen tuottamisesta, esim. hybridoomafuusiolla, viraali-
sella transformoinnilla Herpes papiolla, yksi-B-solukloo-
5 nauksella (jota kutsutaan myös "tilapäiseksi immortali-
soinniksi"), ja tuotetaan yhdistelmä-DNA-immunoglobuliini-
nikir-jasto. Muissa edullisissa suoritusmuodoissa menetel-
män mukaan apinasta valitaan B-solu joko ääreisveri-imu-
solusta, pernasta, luuytimestä tai imusolmukkeesta; vali-
10 taan kloonin, joka tuottaa tarkoituksenmukaista vasta-ai-
netta; immortalisoidusta solulinjasta otetaan talteen
tuota vasta-ainetta koodittavat immunoglobuliinigeenit; ja
uudelleenilmennetään geenit tuottajasolulinjassa (eli so-
lulinjassa, joka aikaansaa ihmisterapiassa käyttökeli-
15 poiseksi riittävää vasta-ainetuotantoa).

Kolmantena näkökohtana tässä esitetään yhdistelmä-
DNA-vasta-aine, joka on muodostettu joko ihmisen tai sim-
panssin säilyvästä alueesta ja apinan vaihtuvan alueen an-
tigeenin tunnistavasta osasta.

20 Liittyvänä näkökohtana tässä esitetään ihmisanti-
geenin vastainen monoklonaalinen vasta-aine, tai Fab:n,
(Fab)²:n, kevyt ketju- tai raskas ketjudimeeri, tai sen minkä
tahansa minimaalinen yhdistelmä-DNA-fragmentti, kuten Fv
tai SCA (yksiketjuvasta-aine), tai sen muun immunologisesti
25 aktiivinen fragmentti (esim. CDR-alue), jonka on muodostanut
immortalisoitu apinan B-solu. Tällaiset fragmentit ovat
käyttökelpoisia immunosupres-siivisina aineina. Vaihtoehtoi-
sesti keksinnön mukaisesti valmistettavaan vasta-aineeseen
voi olla kiinnittynyt efektori- tai reportterimolekyyli.
30 Esimerkiksi keksinnön mukaisesti valmistettavaan vasta-
aineeseen voi olla kiinnittynyt makrosykli raskasmetalli-
atomin, tai toksiinin kuten risiini, kelatoimiseksi kova-
lenttisella siltarakenteella. Lisäksi täydellisen vasta-

ainemolekyylin Fc-fragmentin tai CH₃-alueen voi korvata entsyymi- tai toksiinimolekyyli, ja osa immunoglobuliini-ketjusta voi olla sitoutunut polypeptidiefektori- tai reportterimolekyyliin. Myös bispesifisiä vasta-aineita voidaan rakentaa vakiomenettelyillä.

Seuraavana näkökohtana tässä yhteydessä esitetään farmaseuttisia koostumuksia, joissa edellä kuvattuja vasta-aineita annetaan terapeuttisiin tai ennalta ehkäiseviin käyttöihin. Tällaiset vasta-aineet voidaan myös antaa
10 käyttöön immunotoksiineina, eli molekyyleinä, joille on tunnusomaista kaksi osaa ja jotka ovat erityisen käyttökelpoisia valittujen solujen tappamiseksi in vitro tai in vivo. Yksi rakenneosa on sytotoksinen aine, joka on tavallisesti kohtalokas solulle siihen kiinnittyessään tai
15 imeytyessään. Toinen rakenneosa, joka tunnetaan "kuljetusvälineenä", antaa käyttöön keinon myrkyllisen aineen toimittamiseksi nimenomaiseen solutyyppiin, kuten syöpäsoluihin. Nämä kaksi rakenneosaa sidotaan tavallisesti kemiallisesti toisiinsa jollain lukuisista hyvin tunnetuista kemiallisista tai geneettisistä menettelyistä. Esimerkiksi
20 sytotoksisen aineen ollessa proteiini ja toisen rakenneosan ollessa ehyt immunoglobuliini kytkeminen voidaan suorittaa käyttämällä heterobifunktionaalisia ristikytkijöitä, esim. karbodi-imidi, glutaarialdehydi ja muut vastaavat. Erilaisten immunotoksiinien tuottaminen on alalla hyvin tunnettua.

Seuraavana liittyvänä näkökohtana keksintö käsittää ihmis-apinayhdistelmä-DNA-vasta-ainetta koodittavan nukleiinihapon. Edullisissa suoritustavoissa nukleiinihappo koodittaa ihmisen tai simpanssin säilyvää aluetta ja apinan vaihtuvan alueen antigeenin tunnistavaa osaa; ja nukleiinihappo on puhdistettu, eli erotettu, biologisista ainesosista, joiden kanssa se luonnollisesti esiintyy, tai edullisemmin se annetaan käyttöön homogeenisena liuoksena.

Edelleen seuraavana näkökohtana tässä esitetään CDR-oksastettu vasta-aine, joka on muodostettu ainakin yhdestä komplementaarisuuden määräävästä alueesta (CDR), toisin sanoen aminohappotähteet (käyttäen Kabatin tavan-
5 omaista aminohappoleimaussysteemiä) 31 - 35 (CDR 1), 50 - 65 (CDR 2) ja 95 - 102 (CDR 3) spesifioidusta raskaasta ketjusta, ja aminohappotähteet 24 - 34 (CDR 1), 50 - 56 (CDR 2) ja 89 - 97 (CDR 3) spesifisoidusta kevyestä ketjusta vanhan mantereen apinan vaihtuvasta alueesta, ja im-
10 munoglobuliinin vaihtuvan alueen kehys toisesta lajista. CDR-oksastettu vasta-aine pystyy sitoutumaan samaan anti-geeniin kuin alkuperäinen apinavasta-aine. Vasta-aineen säilyvä alue saadaan ihmis- tai simpanssi-immunoglobuliinista. Metodiikkaa tämän näkökohdan suorittamiseksi kuvaavat yleisesti Jones et al., Nature 321 (1986) 522.
15 Tällaisia CDR-oksastuksia voidaan haluttaessa muuttaa sen varmistamiseksi, että ne vaikuttavat enemmän ihmisen kaltaisilta, jolloin kielteisen reaktion vasta-aineelle synnyttämisen todennäköisyys laskee.

20 Edullisissa suoritustavoissa menetelmän mukaan immortalisoidaan tai valitaan makakisolu, joka tuottaa makakivasta-ainetta, ja immunoglobuliinigeenit otetaan talteen solusta; vasta-ainetuotannosta vastuussa olevat vasta-ainegeenit kloonataan ja sekventoidaan; valitaan ih-
25 misen vaihtuvan alueen kehyssekvenssi (edullisesti sellainen jolla on likeisin homologia makakin vaihtuvan alueen kehukseen nähden); ja korvataan ihmis-CDR-sekvenssit makaki-CDR-sekvensseillä, jolloin ihmiskehysalueeseen voidaan tehdä vähäisiä modifikaatioita vasta-aineen affiniteetin säilyttämiseksi sen antigeenin suhteen.
30

"Vähäisillä modifikaatioilla" tarkoitetaan, että vähemmän kuin kaikkiaan noin 6 aminohappoa kehyksessä voidaan korvata muilla aminohapoilla. Tavallisesti tällaisia korvauksia tai modifikaatioita suoritetaan vain
35 silloin, kun nuo aminohapot osallistuvat konformationaa-

lisiin vuorovaikutuksiin, jotka pitävät kehyksen tarkoituksenmukaisessa muodossa, jotta vasta-aine tunnistaa halutun antigeenin. Tällaiset modifikaatiot heijastavat yleensä apinavasta-aineessa esiintyviä ihmisvasta-aineeseen verrattuna poikkeavia aminohappoja. Esimerkiksi ihmisvasta-aineen aminohapposekvenssi, joka on juuri ennen raskaan ketjun CDR-3:ea, 92 - 94, on yleensä kysteiini-alaniini-arginiini (arginiinin tiedetään tulevan korvatuksi vähäisessä osassa vasta-aineita seriinillä tai treoniinilla); joissakin vasta-aineissa apinassa sekvenssi on kysteiini-alaniini-seriini; täten tässä esimerkissä saattaa olla edullista käyttää seriiniä aminohapon 94 kohdalla (katso kuvio 9D).

Seuraavana näkökohtana tässä esitetään menetelmä sellaisen ihmisen hoitamiseksi, jolla on tietty antigeeni, esim. sairauteen liittyvä antigeeni. Menetelmän mukaan annetaan terapeuttisesti tehokas määrä tuolle tietylle antigeenille spesifistä yhdistelmä-DNA-vasta-ainetta, jolloin yhdistelmä-DNA-vasta-aine on vasta-aine, jossa on joko ihmisen tai simpanssin säilyvä alue ja apinan vaihtuvan alueen antigeenin tunnistava osa.

Edeltävien näkökohtien edullisissa suoritusmuodoissa antigeeni on kasvaintantigeeni, immuunihäiriötilaan liittyvä antigeeni, autoimmuunivasteeseen liittyvä antigeeni, isäntäsolulla ilmentyvä reseptori, tai antigeeni, joka valitaan ihmisantigeneista CD58, VLA4 ($\alpha 4\beta 1$ -integriini), CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, ihmisen T-solureseptori, CD3, CD8, CD23, CD41, CD44, CD45, CD71, TNF α , TNF β , Tn-antigeeni, IL-1, IL-8, CDa, adheesiomolekyylit, esim. VCAM, CD54, CD28, CD11a, CD11c, CD18 ja CD11b, neu-onkogeenituote, MDR-1 (P-glykoproteiini), TGF α ja sen reseptori ja PDGF; ja yhdistelmä-DNA-vasta-aine on aktiivinen joko epätoivottavien solujen (esim.

anti-CD4) tuhoamiseksi (tappamiseksi tai poistamiseksi) vaikuttamalla komplementin kanssa, tai tappajasolujen kanssa, tai on aktiivinen sytotoksisena aineena tai Fc-reseptorisitoutumisen aikaansaamiseksi fagosyytillä.

- 5 Vaihtoehtoisesti vasta-aine salpaa tai stimuloi reseptorifunktioita, tai neutraloi aktiivisia liukoisia tuotteita, kuten yksi tai useampi interleukiini, TNF ja C5a.

Tässä kuvataan edelleen farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät vasta-aineita tai niiden fragmentteja. Nämä koostumukset tai tuotteet voidaan kätevästi antaa
10 käyttöön liuosten muodossa, jotka sopivat annettaviksi ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tai nenän kautta tai suun kautta. Vasta-aineen tarkoituksenmukaisia valmisteita voidaan sekoittaa muiden aineiden tarkoituksenmukaisiin
15 valmisteisiin, mistä seuraa kliinisen käyttökelpoisuuden lisääntyminen.

Keksinnön muita piirteitä ja etuja tulee ilmeiseksi sen edullisten suoritusmuotojen seuraavasta kuvauksesta, sekä patenttivaatimuksista.

20 **Kuvaus edullisista suoritusmuodoista**

Ensin kuvataan lyhyesti piirroksia.

Piirrokset

Kuvio 1 on taulukko 20 kodonista 9 erilaisessa Ig-raskas ketju-johtosekvenssissä ja 10:ssä apinan Ig-ras-
25 kas ketju-johtosekvenssissä;

kuvio 2 on diagrammi eri Ig-ketjujen rakenteesta, ja siinä esitetään johtoalueiden sekä vaihtuvien ja säilyvien alueiden suhteelliset asemat sekä monistamisessa käytettyjen restriktiokohtien ja alukkeiden asemat;

30 kuvio 3 on diagrammi raskas ketju-kasettivektorista ihmisvasta-aineiden tai kimeeristen vasta-aineiden ilmentämiseksi;

kuvio 4 on diagrammi ihmisvasta-aineiden tai kimeeristen vasta-aineiden ilmentämiseksi suunnitellusta
35 kevyt ketju-kasettivektorista ;

kuviot 5 ja 6 ovat diagrammeja vektoreista, jotka on suunniteltu immunoglobuliinin ilmentämiseksi kappa- tai vastaavasti lambda-kevyt ketju-cDNA:sta. Näissä vektoreissa immunoglobuliinigeenit on järjestetty tandem-konfiguraatioon ja valikointimerkkinä on käytetty neomysiinifototransferaasia;

10 kuvioissa 7-1, 7-2 ja 8 esitetään erilaisten, keksinnössä käyttökelpoisten johtosekvenssialukkeiden nukleinihapposekvenssit (nämä alukkeet kuviossa 8 vastaavat alukkeita, jotka on luetteloitu sekvensseinä tunnusnumerot 1 - 12 infra);

kuvioissa 9A - 9H verrataan ihmis- ja apina-alueita VH1-, VH2-, VH3-, VH4- ja VH5-sekvensseissä sekä vastaavasti VKI- ja VKII- ja VlambdaIII-sekvensseissä;

15 kuviossa 10 verrataan ihmis- ja apina-VH3-sekvenssejä, jolloin yksi vertailu suoritetaan ihmis-VH2-sekvenssiin;

kuvio 11 on graafinen esitys keksinnön mukaisen vasta-aineen sitoutumisesta ihmis-CD4-antigeeniin;

20 kuvio 12 on graafinen esitys 1F3:n sitoutumisen inhibitiosta kuviossa 10 esitetyn vasta-aineen toimesta;

kuviot 13 ja 14 ovat osia anti-CD4 VH- ja vastaavasti VL-alueiden nukleotidisekvensseistä;

25 kuvio 15 on anti-CD54-aktiivisuutta esittävä kuvaaja; ja

kuvio 16 on plasmidi-ilmentymispiirteitä vertaileva histogrammi.

Apinavasta-aineet

30 Vanhan mantereen apinoita ovat apinat, joita kutsutaan paviaani- ja makaki-apinoiksi (mukaan lukien reesus-apina ja cynomolgus-apina). Tämä keksintö antaa käyttöön patentoitavaksi vaaditun keksinnön käytön yksityiskohtia eri apinageenien kanssa. Nämä esimerkit eivät rajoita keksintöä ja niitä voidaan vaikeuksitta soveltaa muihin vanhan mantereen apinoihin.

Kuviossa 2 esitetään diagrammina immunoglobuliinin raskasta, kappa-kevyttä ja lambda-kevyttä ketjua koodittavien geenien yleinen rakenne. Kukin näistä ketjuista muodostuu ATG-aloituskodonista, jota seuraa noin 60 emäksen johtosekvenssi, immunoglobuliinin vaihtuvaa aluetta koodittava alue ja tuon immunoglobuliinin säilyvä alue. Esimerkkejä raskaiden ketjujen erilaisista johtosekvensseistä, tai signaaliptideistä, esitetään kuviossa 1. Nämä sekvenssit ja niiden vastine apinassa voidaan määrittää alan keskimääräisillekin taitajille tutuilla tavanomaisilla tekniikoilla sekä kuten jäljempänä kuvataan.

Kuvion 1 alemmassa osassa esitetyt sekvenssit ovat ihmisen johtosekvenssejä. Hakijat ovat havainneet, että näihin johtoalueisiin nähden komplementaaristen alukkeiden rakentaminen tekee mahdolliseksi Ig-geenien apinoistamisen. Samoin apinajohtosekvensseihin nähden homologisia alukkeita (katso esim. kuvion 1 ylempi osa) voidaan käyttää apinan immunoglobuliinigeenien monistamisessa ja myös ihmisen immunoglobuliinigeenien monistamisessa.

Käyttämällä tällaisia alukkeita tavanomaisissa monistamisenmenettelyissä erilaisia apinaimmunoglobuliinigeenejä koodittavia geenejä voidaan vaikeuksitta eristää ja määrittää vasta-aineiden vaihtuvia alueita koodittavat sekvenssit. Esimerkkejä tällaisista menettelyistä annetaan jäljempänä. Tulokset jäljempänä esitetystä analyysistä esitetään kuvioissa 9A - 9H ja kuviossa 10. Yllättäen hakija totesi, että huolimatta kyvystä tuottaa vasta-aineita suhteellisen säilyville ihmisantigeeneille apinoissa näin tuotettujen vasta-aineiden vaihtuvan alueen kehyssekvenssejä ei kyetty erottamaan ihmisvasta-aineiden vastaavista. Toisin sanoen apinoille havaittu immunoglobuliinisekvenssin vaihtelevuuden määrä oli samankaltainen kuin ihmisille havaittu, eikä ollut mahdollista määrittää,

mikä vasta-aine oli peräisin ihmisestä tai apinasta itse lähdeettä analysoimatta.

5 Täten esimerkiksi kuviossa 10 ihmisen VH3-alueen aminohapposekvenssiä verrattiin apinaan. Ihmisvasta-aineet osoittivat keskenään 83 - 98 %:n homologiaa, kun taas apinan vasta-aineiden homologia ihmis-VH3-alueeseen nähden oli 90 - 95 %. Sitä vastoin ihmisen VH2-alueen homologia ihmisen VH3:een nähden oli 60 %. (Tässä piirroksessa kuten muissakin piirroksissa saman aminohapon esiintyminen missä tahansa asemassa on esitetty viivalla, kun taas erilaisen aminohapon läsnäolo on esitetty tavanomaisella yhden kirjaimen koodilla. Asemat, joille ei voida määrätä mitään konsensus-aminohappoa, on merkitty X:llä.) Samoin homologia 10 VH1:n, VH2:n, VH3:n, VH4:n ja VH5:n sekä VKI:n ja VKII:n ja V λ III:n suhteen esitetään vastaavasti kuvioissa 9A - 9H. Jälleen havaittiin merkittävä apinan ja ihmisen immunoglobuliinialueen välinen homologia kussakin vaihtuvassa alueessa mukaan lukien immunoglobuliini-J-alueiden sekvenssit. Tällainen korkea homologia on samankaltainen kuin ihmisvasta-aineiden kesken havaittu. 20

Metodiikka, joilla sekvenssit määritettiin, esitetään jäljempänä esimerkeissä. Alan keskimääräisetkin taitajat huomaavat, että nämä esimerkit eivät rajoita tätä keksintöä ja ekvivalenttisia tuloksia ja monoklonaalisia ja kimeerisiä vasta-aineita voidaan saada samankaltaisilla, alan keskimääräisillekin taitajille tutuilla menetel- 25 lyillä. Katso esim. US-patenttijulkaisut 4 816 567; 4 978 745; 4 975 369; 4 816 397, supra. Esimerkiksi siten kun apinan vaihtuvaa aluetta koodittava geeni on kloonattu, tällainen geeni ligatoidaan vaikeuksitta apinan tai ihmisen säilyvää aluetta koodittavaan geeniin, ja fuusioidut geenit ilmentetään tuottajasolulinjassa halutun vasta-aineen tuottamiseksi. Jäljempänä annetaan esimerkkejä tällaisista menettelyistä. 30

Seuraavissa esimerkeissä menetelmän ensimmäisessä vaiheessa eristetään kokonais-RNA apinan ääreisveri- tai pernasoluista. Immunoitujen apinoiden B-soluja voidaan saada ääreisverestä tai imusolmukkeista ja niitä voidaan 5 käyttää suoraan tai niitä voidaan edullisesti monistaa. Monistamiseen voi kuulua Herpes papio-virustransformointi, fuusiointi heterologiseen myeloomasoluun ja sitä seuraava valinta, tai yksittäisten B-solujen kloonuas rajaa-
vasti laimentaen stimuloitujen ihmisen T-solujen läsnä
10 ollessa.

Kokonais-RNA muutetaan sitten yksisäikeiseksi (ss-) cDNA:ksi käyttäen käänteiskopioijaentsyymiä ja ei-spesifisiä (oligo-dT- tai satunnaisheksameeri-) tai spesifisiä (immunoglobuliini-CH1- tai CK- tai Clambda-säilyvä alue-) 15 oligonukleotidialukkeita. Tällä reaktiolla tuotettua yksisäikeistä cDNA:ta monistetaan käyttäen polymeraasiketjureaktiota, jossa ss-cDNA:ta yhdessä deoksinukleotiditri-
fosfaattien, DNA-polymeraasin (esim. lämpöstabiilin polymeraasin) ja spesifisten alukkeiden kanssa käytetään ras-
20 kaan tai kevyen ketjun vaihtuvan alueen immunoglobuliini-
geenien monistamiseksi. Käytetyt alukkeet ovat yksisäikeisiä ja synteettisiä, kooltaan 20 - 40 emäksen oligonukleotidejä, jotka sisältävät joitakin degeneraattiemäksiä, jotka sitoutuvat immunoglobuliinin 5'-johtosekvensseihin.
25 Kuusi erilaista 5'-johtosekvenssialuketta [katso kuvio 7 - 1, mukaan sisältyy restriktioentsyymikohta (esim. SalI)] suunniteltiin ja rakennettiin apinan raskaan ketjun vaihtuva alueryhmien monistamiseksi niiden samankaltaisuuden nojalla ihmisen raskaan ketjun vaihtuva alue-geeniryhmiin nähden. Kunkin kuudesta 5'-johtosekvenssialukkeesta
30 kanssa käytetään 3'-aluketta, joka on spesifinen oleellisen isotyyppin (esim. IgG, IgM, IgA tai IgE) säilyvä alue-
alueeseen nähden ja sisältää myös restriktioentsyymikohdan (esim. NheI). Samoin apinan kappa- ja lambda-kevyille ket-

juille käytetään muita alukepareja tarkoituksenmukaisen kevyt ketju-vaihtuvan alueen monistamiseksi (kuvio 7 - 2).

Muita alukesarjoja voidaan käyttää erilaisten, yksittäisten restriktiokohtien mukaan sisällyttämiseksi PCR:llä monistetun DNA:n kohdennetun kloonauksen mahdollistamiseksi tarkoituksenmukaiseen ilmentämisvektoriin, jossa on sama restriktiokohta. Voidaan käyttää myös alukesarjaa, joka sitoutuu MluI-kohdan sisältävän vasta-aiheen raskas ketju-johtosekvenssin 3'-päähän, tai alukesarjaa, joka sitoutuu kehyksen XhoI-kohdan sisältäviin 23 ensimmäiseen emäkseen, ja jollaista kuvataan kuviossa 7 - 1. Apinaimmunoglobuliinin raskaan ja kevyen ketjun vaihtuvan alueen geenit voidaan kloonata sukkulavektoriin suoraan PCR-monistamisen jälkeen myöhempien molekyylinipulaatioiden mahdollistamiseksi tarvittaessa tai ne voidaan kloonata suoraan ilmentämisvektoriin, joka sisältää ihmisen raskaan tai kevyen ketjun säilyvän alueen geenejä. Immunoglobuliinigeenien molekyylikonfiguraatio ilmentämisvektorissa voi olla genominen, jolloin immunoglobuliinipromoottori/tehostinalueet ja muut säätelyalueet ovat läsnä kuten myös silmukkaluovuttaja/akseptorisekvenssit introni/eksoniliitoskohdissa. Vaihtoehtoisesti kimeerisiä immunoglobuliinigeenejä voidaan insertoida cDNA-konfiguraatioon käyttäen heterologisia viruspromoottori/tehostin-sekvenssejä.

Esimerkki 1: Apinavasta-aineiden sekvenssi

Kuvioissa 7 ja 8 esitetään restriktiokohdat käsiteltävät tai vastaavasti niitä vailla olevat alukkeet, joita käytettiin immunoglobuliinigeenien PCR-monistuksessa apina- ja/tai ihmis-cDNA-sekvensseistä. Käytettyjen menetel-lyjen yksityiskohdat esitetään jäljempänä. RNA eristettiin apinoiden perna-, ääreisveri- ja imusolmukesoluista käyttäen tavanomaista guanidiniumisotiosyanaattimenetelmää. Sitten tällä menetelmällä eristettyä kokonais-RNA-fraktiota käytettiin templaattina myöhempiin monistamis-

- reaktioihin. RNA-erää inkuboitiin, kun läsnä oli 200 yksikköä Moloney-hiirileukemiaviruksen käänteiskopioijaentsyymiä ja ei-spesifisiä (oligo-dT- tai satunnaisheksameeri-) tai spesifisiä (immunoglobuliini-IgG-CH1-alue- tai kappa-ketju-säilyvä alue-CK-) oligonukleotidialukkeita (50 - 100 pikomoolia), ei-koodittavan yksittäisen cDNA-säikeen muodostamiseksi. Sitten tällä reaktiolla tuotettua yksisäikeistä cDNA:ta monistettiin käyttäen polymeeraasiketjureaktiota (PCR). Yksisäike-cDNA-erää inkuboitiin yhdessä deoksinukleotiditrifosfaattien (20 µM), lämpöstabiilin DNA-polymeraasin (2 - 5 yksikköä) ja ihmisperäisten synteettisten oligonukleotidialukkeiden (50 pikomoolia) kanssa joko raskaan tai kevyen ketjun vaihtuvan alueen immunoglobuliinigeenien monistamiseksi.
- Useita edustavia cynomolgus-immunoglobuliinin raskaan ja kevyen ketjun vaihtuvan alueen sekvenssejä monistettiin lukuisista geeniryhmistä käyttäen kuviossa 8 esitettyjä alukkeita. Nämä monistetut sekvenssit kloonattiin plasmidivektorin p-Bluescript (pBS, saatavana Stratageneltä, CA) EcoRV-kohtaan ja niitä käytettiin DNA-sekventoinnissa. DNA-sekventointi suoritettiin käyttäen kloonatun insertin sisältävää plasmidi-DNA:ta kaksisäikeisenä DNA-templaattina ja tavanomaista ketjupääsekkventointimenetelmää.
- Edustavia cynomolgus-apinaimmunoglobuliinisekvenssejä esitetään kuvioissa 9A - 9H. Kuvioihin 9A - 9H on sisällytetty konsensus-aminohapposekvenssi ihmisen vaihtuvan alueen geeneille, jotka edustavat kutakin pääasiallisista vaihtuva aluegeeniryhmistä. Esitetään kunkin apinasekvenssin prosentuaalinen homologia ihmisen konsensus-sekvenssiin nähden pois sulkien säilyvä aluealueet ja CDR-alueet. Homologia-aste ihmis- ja apinasekvenssien välillä tietyssä ryhmässä on yhtä korkea kuin kahden ihmissekvenssin välillä tuossa ryhmässä. Tämän vuoksi on mahdotonta erottaa pelkästään sekvenssivertailujen nojalla vaihtuvan

alueen immunoglobuliinisekvenssit, jotka ovat peräisin vanhan mantereen apinoista, ja ne, jotka ovat peräisin ihmisistä.

RNA:n eristäminen

- 5 Apina-antigeenispesifisiä B-soluja saatiin useilla tavoilla: fuusioimalla immunoidun apinan imusolmukesoluja ihmis/hiiri-heteromyeloomafuusiopartnerisolulinjaan K5H6/B5, ja sitten seulomalla hybridoomasolulinjat, virustransformoimalla saadut B-solut tai käyttämällä in vitro yksi-B-solukloonaustekniikoita. Viimemainituksessa tapauksessa yksittäisen apina-B-solun kasvua tuettiin in vitro kanssaviljelemällä vasta-aineella stimuloitujen ihmisen T-solujen kanssa. Yksittäinen B-solu sijoitettiin 10 96-kuoppaisen kudosisviljelylevyn kuhunkin kuoppaan yhdessä 15 noin 150 000 anti-CD3-stimuloidun, mytomysiini-C:llä käsitellyn ihmis-T-solun kanssa. Kahden viikon inkuboinnin jälkeen yksittäinen B-solu oli laajentunut ainakin 200 differentioituneeksi plasmasoluksi. Näiden kuoppien viljelelysupernatantista määritettiin immunoglobuliinin läsnäolo ELISA-tekniikalla käyttäen vuohen anti-apinaimmunoglobuliiniseppäusvasta-ainetta.

- Solut joko antigeenispesifisistä virustransformoiduista soluista tai hybridoomista kasvatettiin riittäviin määriin RNA:n uuttamiseksi. Immunoglobuliinille positiiviset kuopat yksi-B-solukloonaustekniikasta in vitro poistettiin, pestiin kahdesti kylmällä fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella, pH 7,5, ja sentrifugoitiin (1 000 x g, 10 min). Pestyt solut suspendoitiin 100 µl:aan lyysiliuosta (4 M guanidiniumisotiosyanaatti, 25 mM natriumsitraatti, pH 7,0, 0,5 % natriumsarkosiinia, 0,1 M 2-merkaptotaetanolii). 10 µl 2 M natriumasetaattiliuosta, pH 4,0, lisättiin ja sekoitettiin. Proteiini poistettiin lisäämällä 100 µl vedellä kyllästettyä fenolia, sekoittamalla ja lisäämällä 20 µl kloroformi/isoamyylialkoholia 35 (49:1). Vorteks-sekoituksen ja 15 minuutin inkuboinnin

jäissä jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 10 000 x g:ssä 20 minuutin ajan. Vesifaasi siirrettiin uuteen putkeen, siihen sekoitettiin sama tilavuus isopropanolia ja inkuboitiin 1 tunnin ajan -20 °C:ssa. Sakka otettiin talteen sentrifugoimalla 10 000 x g:ssä 15 minuutin ajan, se pestiin 70-%:isella etanolilla, sentrifugoitiin jälleen ja pelletti kuivattiin Speedivac-laitteessa (Savant). Kuivattu RNA uudelleenliuotettiin toisen kerran 100 µl:aan lyysipuskuria. Sama tilavuus isopropanolia lisättiin ja inkuboitiin -20 °C:ssa 1 tunnin ajan. Sakka otettiin talteen sentrifugoimalla 10 000 x g:ssä 15 minuutin ajan ja pestiin 70-%:isella etanolilla. Pelletti kuivattiin Speedivac-laitteessa (Savant) ja varastoitettiin -20 °C:seen 70-%:iseen etanoliin käyttöön asti.

Yksisäikeisen cDNA:n synteesi

Yhdestä kuopasta peräisin olevista soluista uutettu kokonais-RNA liuotettiin 32 µl:aan kahteen kertaan tislattua vettä, johon lisätään 1 µl (50 - 100 pikomoolia) aluketta (joko satunnaisheksameeri-, oligo-dT- tai 3'-immunoglobuliinispesifisiä alukkeita) ja 10 µl 5X käänteiskopioijaentsyymipuskuria (0,25 M Tris-HCl, pH 8,3, 0,375 M KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM ditiotreitoli). Seosta kuumennettiin 65 °C:ssa 5 minuutin ajan, minkä jälkeen se sijoitettiin jäihin 2 minuutiksi. Kuumennuksen jälkeen lisättiin 1 µl RN-asiinia (Promega), 5 µl 5 mM deoksinukleotiditrifosfaattien liuoksia ja 1 µl (200 yksikköä) Moloney-hiirileukemiaviruskäänteiskopioijaentsyymiä (BRL) ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 1,5 tunnin ajan. Kun käänteiskopioijaentsyymireaktio oli saatettu loppuun, yksisäikeinen cDNA/RNA-seos uutettiin fenoli/kloroformilla ja käytettiin 1 ml:n G-25 Sephadex-kierrekolonnin läpi. Tämän kolonnin läpäisevää materiaalia käytettiin templaatti-ss-cDNA:na PCR-monistamisessa.

ss-cDNA:n monistaminen

3 - 10 µl ss-cDNA:ta sekoitettiin 10 µl:aan 10X PCR-puskuria (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl₂), 1,6 µl 1,25 mM deoksinukleotiditrifosfaattien liuoksia, 50 pikomoolia spesifisistä immunoglobuliini-5'-aluketta, 50 pikomoolia spesifisistä immunoglobuliini-3'-aluketta ja 2 - 5 yksikköä lämpöstabiilia DNA-polymeraasia (Synthetic Genetics). Reaktioutilavuus nostettiin 100 µl:ksi lisäämällä vettä ja päälle asetettiin 100 µl mineraaliöljyä. Reaktioseosta inkuboitiin seuraavissa lämpötiloissa spesifioidun ajan.

94 °C 1 min

48 °C 2 min

72 °C 2 min.

Tämä sykli toistettiin 30 - 35 kertaa. Monistettuja tuotteita tarkasteltiin agarosigeelielektroforeettisesti käyttäen 1,2-%:ista agarosigeeliä ja molekyylipainostandardeja. Monistetut immunoglobuliinin vaihtuvan alueen geenit olivat suunnilleen 350 - 500 ep:n merkkien välissä. Sitten PCR:llä monistettuja tuotteita käytettiin kloonauksessa tarkoituksenmukaiseen plasmidivektoriin.

Esimerkki 2: Apinavasta-ainegeenien kloonauks

Koska apinan vaihtuvan alueen geenisekvenssejä ei voida cDNA-tasolla erottaa ekvivalenttisen geeniryhmän ihmisjäsenistä, immuunivasteet kimeerisille apina/ihmisvasta-aineille, mikäli niitä on, eivät todennäköisesti mitenkään poikkea niistä, joita sadaan ihmisvasta-ainemolekyylejä vastaan.

PCR-tekniikkaa voidaan käyttää spesifisten restriktioentsyymikohtien mukaan sisällyttämiseksi, mukaan lukien (mainittuihin kuitenkin rajoittumatta) SalI, BglII, KpnI ja NheI, vanhan mantereen vaihtuva aluesekvensseihin PCR-monistamisreaktiossa käyttäen kuviossa 6 esitettyihin perustuvia alukkeita. Ennalta olemassa olevia kloonattuja geenejä monistettiin niiden spesifisestä

vektorista käyttäen näitä alukkeita spesifisen restriktiokohdan sisällyttämiseksi mukaan, jota käytettiin sitten geenin kloonaukseksi ilmentämisvektoriin. Vaihtoehtoisesti näitä alukkeita käytettiin monistamiseksi suoraan solu-RNA:sta.

5 Rakennetut ilmentämisvektorit ovat kahta tyyppiä. Ensimmäinen (katso kuviot 3 ja 4) mahdollistaa apinoista kloonattujen cDNA-immunoglobuliini-vaihtuvien alueiden insertoinnin kasettivektoriin, käyttäen yksittäisiä restriktiokohtia, jossa immunoglobuliinigeeniainekset ovat 10 järjestäytyneet genomikonfiguraatioon. Tämän tyyppin vektori sisältää immunoglobuliinipromoottorin, jolloin kaksi eksonia muodostaa immunoglobuliinijohtosekvenssin, kaksi kloonauskohtaa SpeI ja NheI, alavirran silmukkaluovuttajasekvenssejä, immunoglobuliinitehostin alueen, ihmisen säilyvän alueen geenin (raskas tai kevyt ketju) ja alavirran polyadenylaatioosignaaleja. Lisäksi ne sisältävät 15 bakteeriperäisen replikaatioalkukohdan, β -laktamaasigeenin valintaan bakteereissa ja neomysiinifosfotransferaasigeenin G418-valintaa, tai ksantiini-guaaniinifosforibosyyliitransferaasi- (gpt-) geenin mykofenolihappovalintaan 20 nisäkässoluissa. Raskaan ja vastaavasti kevyen ketjun ilmentämisvektorit käyttävät neomysiinifosfotransferaasi- (Neo-) ja ksantiini-guaaniinifosforibosyyliitransferaasi- 25 (gpt-) geenejä valikointimerkkeinä.

Toisen tyyppin ilmentämissysteemissä (katso kuviot 5 ja 6) käytetään immunoglobuliinigeenejä cDNA-konfiguraatiossa. Toisin sanoen introneita tai silmukointikohtia ei esiinny 5'-johtosekvenssin ja 3'-säilyvä alue-sekvenssien välillä. Tämän tyyppin vektorissa käytetään heterologisia viruspromoottori/tehostin-sekvenssejä, jotka ohjaavat tandem-tapaan järjestäytyneitä immunoglobuliinin raskaan ja kevyen ketjun geenejä, polyadenylaatiosekvenssejä ja valikoitavaa nisäkässolumerkkiä (Neo). Neo-geeniä voidaan 35 modifioida sen translaation heikentämiseksi, esim.

vaihtamalla kodoni ylävirtaan ja geenin aloituskohdan vieressä ACC:stä TCT:ksi. Lisäksi dihydrofolaattireduktaasi- (dhfr-) geeni on läsnä myöhempään geenimonistamiseen metotreksaatilla. cDNA-konfiguraatiossa oleviin ilmentämisvektoreihin kloonattavat apinan immunoglobuliinin vaihtuvan alueen geenit monistettiin joko ennalta olemassa olevista kloonatuista sekvensseistä sukkulavektorissa (PBS) tai suoraan RNA:sta alukkeilla, jotka sisälsivät joko restriktiokohdat SalI tai MluI ja NheI raskaalle ketjulle tai BglII ja KpnI tai BsiWI kappa- tai lambda-kevyille ketjuille. Muitakaan mahdollisia yksittäisiä restriktiokohtia ei kuitenkaan suljeta pois.

Kimeeriset raskaan ja kevyen ketjun immunoglobuliinigeenit liitettiin mukaan erikseen tai peräkkäin (rakenteet, joilla on genomikonfiguraatio) tai samaan vektoriin (rakenteet, joilla on cDNA-konfiguraatio) elektroporaatiolla tuottajasolulinjaan. Elektroporaatiota käytettiin linearisoitujen DNA-rakenteiden viemiseksi joko kinnalaisen hamsterin munasarja- (CHO-) soluihin tai hiiren myeloomasoluihin, mitä seurasi transfektanttien yksisolukloonaus 96-kuoppaisilla kudosisviljelylevyillä. Elektroporaatio-olosuhteilla käyttäen BTX-100- (BTX, San Diego) elektroporaatiolaitetta ja 1 ml:n kertakäyttöistä muovikyvetiä saatiin transfektanttien optimaalisia lukuja tietyistä määrästä vektori-DNA:ta. CHO-soluja, jotka oli adaptoitu kasvamaan suspensiossa seerumivapaassa kasvualustassa (CHO-S SFM II vailla hypoksantiinia ja tymidiiniä, Gibco) käytettiin virussäätelyelementtejä sisältävissä rakenteissa.

30 Ig:n vaihtuvan alueen geenien alakloonaus

PCR-reaktion tuotteet uutettiin fenoli/kloroformilla ja käytettiin 1 ml:n Sephadex G-25-kierrekolonnin läpi. Jos DNA-fragmentti oli määrä kloonata pää tasattuna plasmidiin, kokonais-PCR-reaktioseokseen (100 µl) lisättiin 1 µl 1 M MgCl₂-liuosta, 0,5 ml deoksinukleotiditri-

fosfaattien 1,25 mM liuosta ja 1 µl Klenow-DNA-polymeraasia (5 yksikköä) ja inkuboitiin 37 °C:ssa 15 minuutin ajan mahdollisten 5'-ylijäämäpäiden täyttämiseksi. Ennen kloonausta pää tasattuna plasmidiin 5'-päätt fosforyloitiin seuraavasti: kokonaisreaktioseokseen lisättiin 5 µl 10 mM ATP-liuosta, 1 µl T4-polynukleotidikinaasia (10 yksikköä) ja inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Sisäisiä restriktiokohtia sisältäviä monistettuja fragmentteja leikattiin ensin tarkoituksenmukaisella restriktioentsyymillä ja niitä käytettiin suoraan ligatoinnissa fosforyloimatta. Kummassakin tapauksessa kloonattava fragmentti uutettiin fenoli/kloroformilla ennen ligatoimista tarkoituksenmukaiseen vektoriin.

Ligatointireaktiota varten 10 % fosforyloitua tai restriktioentsyymillä leikattua, PCR:llä monistettua fragmenttia sekoitettiin noin 2 ng:aan tarkoituksenmukaista vektoria (kokonaistilavuus 8 µl), jota oli edeltäpäin pilkottu restriktioentsyymillä (-entsyymeillä). Kloonaukseen tasatuin päin käytettiin EcoRV:llä pilkottua pBluescript-plasmidia. Kloonaukseen tarttuvain päin käytettiin vektoria TCAE 5.2 tai 6.0 tai pGenex-H tai pGenex-L, jota oli leikattu tarkoituksenmukaisilla restriktioentsyymeillä. 1 µl 10X ligatointipuskuria (500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP, 10 mM ditiotreitol), 1 µl T4-DNA-ligaa-

sia (1 yksikkö) lisättiin ja reaktion annettiin kestää 14 °C:ssa yön yli. Ligatoidulla materiaalilla transformoitiin transformoitumiskelpoisia E. coli HB101-soluja käyttäen transformoinnin tavanomaista kalsiumkloridimenetelmää. Transformoidut bakteerit valikoitiin kasvun perusteella ampisilliiniä sisältävillä LB-agar-maljoilla. Yksittäisiä pesäkkeitä valittiin ja niitä kasvatettiin yön yli ampisilliiniä sisältävässä LB-kasvualustassa ja plasmidi-DNA uutettiin käyttäen tavanomaista alkalisen lyysin menetelmää. Restriktioanalyysin jälkeen immunoglobuliini-

inserttejä sisältävien kloonien määrittämiseksi valmistettiin DNA sekventointiin.

Kloonattujen geenien sekventointi

5 Kloonatut immunoglobuliinin vaihtuvan alueen geenit sekventoitiin käyttäen tavanomaista ketjupäämenetelmää. Kloonatun insertin sisältävää kaksisäikeistä plasmidi-DNA:ta käytettiin sekventointitemplaattina. Ennen sekventointia kaksisäikeinen DNA denaturoitiin kemiallisesti. DNA sekventoitiin käyttäen T7-DNA-polymeraasia Sequenase (United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH), radioleimattua α -deoksiATP:tä ja seuraavia sekventointialukkeita: 5'-CAGAGCTGGGTACGTCCTCA-3' ja 5'-GCCCCC-AGAGGTGCTCTTGG-3' immunoglobuliinin G raskaan ketjun vaihtuvalle alueelle 5' $\rightarrow$ 3'- ja vastaavasti 3' $\rightarrow$ 5'-suunnassa ja 5'-CAGAGCTGGGTACGTGAACC-3' ja 5'-GGCTTGAAGC-TCCTCAGAGG-3' immunoglobuliinin lambda kevyen ketjun vaihtuvalle alueelle 5' $\rightarrow$ 3'- ja vastaavasti 3' $\rightarrow$ 5'-suunnassa. Reaktiotuotteet erotettiin 6-%:isissa polyakryyliamidigeeleissä ja luettiin.

20 Tulokset lukuisten vanhan mantereen apinoiden immunoglobuliinien raskaan ja kevyen (ketjun) vaihtuvien alueiden geenien sekventoinnista on koottu kuvioihin 9A - 9H. Cynomolgus-immunoglobuliinigeenien kloonausta ja sekventointia ei ole aiemmin kuvattu kirjallisuudessa. Tämän vuoksi myöskään homologian astetta ihmisen ja cynomolgus-apinan V-alueen geenien välillä ei ole ollut mahdollista määrittää. Yksittäisen simpanssin vaihtuvan lambda-geenin ja sen ihmisgenomivastineen välisen homologian on kuvattu osoittavan vain 2 %:n eroa kehysalueilla.

30 Transfektointi ja valinta

Kloonattujen raskaan ja kevyen ketjun vaihtuvien alueiden geenien sekventoinnin jälkeen ne alakloonattiin sopiviin vektoreihin niiden ilmentämiseksi. Nämä voivat olla immunoglobuliinisäätelyelementtejä sisältäviksi rakennettuja vektoreita genomikonfiguraatiossa (kuten esi-

tetään kuvioissa 3 ja 4) tai virussäätelyelementtejä sisältäviksi rakennettuja vektoreita cDNA-konfiguraatiossa (kuviot 5 ja 6). Tarkoituksenmukaisia restriktiokohtia (SpeI ja NheI) voidaan suunnitella ja rakentaa PCR-monistamisalukkeisiin alustavassa monistamisvaiheessa tai vastakkaisesti restriktiokohtia sisältäviä monistamisalukkeita voidaan käyttää immunoglobuliinigeenien monistamiseksi sukkulavektoreista, joihin ne on kloonattu. Vaihtoehtoisesti immunoglobuliinin vaihtuvan alueen geenejä voidaan kloonata suoraan ilmentämisvektoreihin PCR-monistuksen RNA:sta jälkeen, jolloin alakloonaus tulee tarpeettomaksi.

Elektroporaatio

Elektroporaatiota käytettiin joko raskaan ja kevyen ketjun genomirakenteiden kotransfektoimiseksi tai raskaan ja kevyen ketjun genomirakenteiden transfektoimiseksi peräkkäin Sp2/0-soluihin. Peräkkäisissä transfektoinneissa kimeerisen kevyt ketjurakenteen elektroporaatiota seurasi valinta mykofenolihapossa. Seulomalla viljelysupernatantit 96-kuoppaisilla levyillä kasvaneista klooneista kevyen ketjun tuotannon suhteen käyttäen ihmisen kevyen ketjun säilyvän alueen vastaista antiseerumia ja ELISA-tekniikkaa oli mahdollista valita runsaimmin kevyttä ketjua ilmentävät kloonit. Kevyt ketjutransfektantien myöhemmällä elektroporaatiolla vektorilla, joka sisälsi kimeerisen apina/ihmis-raskas ketju-immunoglobuliinirakenteen, oli mahdollista valita transfektoomat, jotka ilmensivät kimeerisen vasta-aineen, jolla oli haluttu spesifisyys ja isotyyppi.

Kevyt ketjurakenne pGenex-L (kuviot 3 ja 4) transfektoitiin hiiren myeloomasolulinjaan Sp2/0 elektroporaatiolla seuraavasti. Sp2/0-soluja pitoisuutena $1 \times 10^7/\text{ml}$ transfektointipuskurissa (272 mM sakkarosi, 7 mM natriumfosfaatti, pH 7,4, 1 mM MgCl_2) sekoitettiin 50 μg :aan pGenex-L:ää, joka sisälsi tarkoituksenmukaisen kloonatun

kevyt ketjugeenin ja joka oli edeltäpäin tehty lineaariseksi pilkkomalla restriktioentsyymillä PvuII. Solut sijoitettiin 1 ml:n kertakäyttöiseen muoviseen spektrofotometrikyvettiin ja levyelektrodit työnnettiin kyvetiin 3,5 mm:n päähän toisistaan. Käyttäen BTX-100-transfektointilaitetta (BTX, Inc.) soluille annettiin 500 mikrosekuntia kestävä virtasykäys siten, että noin 50 % soluista kuoli. Tämä arvo määritettiin ennen transfektointia sykäyttämällä soluja DNA:n puuttuessa kasvavilla volttiluvuilla ja mittaamalla 24 tunnin kuluttua elossa olevien solujen lukumäärä. Volttiluku esitettiin graafisesti solujen eloonjäännin funktiona ja 50 %:n solukuolemaa vastaavaa volttilukua käytettiin kaikissa myöhemmissä elektroporaatiokokeissa. BTX-100-laitetta käytettäessä optimaaliseksi arvoksi havaittiin sykäys, jonka amplitudi oli 200 ja joka kesti 500 mikrosekuntia. Solujen sykäyttämisen jälkeen niiden annettiin toipua jäissä 15 minuutin ajan, minkä jälkeen ne siirrettiin 96-kuoppaisille kudosviljelylevyille Dulbeccon modifioituun Eagles-kasvualustaan (DMEM), joka sisälsi 5 % vasikansikiöseerumia ja 10 % Sp2/O:lla käsiteltyä kasvualustaa. Soluja maljattiin pitoisuuteen, jossa solukasvua todettiin noin yhdessä kolmesta kuopasta valikoinnin sopivalla lääkeaineella jälkeen. Tämä parametri määritettiin kullekin elektroporaatiokokeelle maljaamalla vaihtelevia lukumääriä elektroporaation läpikäyneitä soluja kuoppaa kohden (1 000 - 10 000) ja valikoimalla solujen suhteen, joihin oli tullut sisällytetyksi plasmidi. Solukasvua osoittavien kuoppien lukumäärä kullakin levyllä laskettiin 2 - 3 viikon kuluttua valikoinnista. Täten määritettiin sopiva solujen lukumäärä, joka antoi yhden positiivisen kuopan kolmesta nimenomaisen plasmidin tietyllä pitoisuudella käytettäväksi myöhemmissä kokeissa.

Välittömästi elektroporaation jälkeen solut sijoitettiin vailla lääkeainetta olevaan kasvualustaan. Kahden

päivän kuluttua elektroporaatiosta lisättiin tuoretta, joko G418:aa tai mykofenolihappoa sisältävää kasvualustaa soluihin, jotka osoittivat neomysiinifosfotransferaasi- tai vastaavasti guanasyylifosfotransferaasiaktiivisuutta.

5 Soluja syötettiin joka 2. päivä ensimmäisen viikon ajan, ja sen jälkeen kahdesti viikossa. Käytettävä lääkeainepitoisuus määritettiin inkuboimalla soluja kasvavien lääkeainepitoisuuksien läsnä ollessa ja tarkkailemalla solujen eloonjääntiä. Käytetty lääkeainepitoisuus oli kaksi kertaa määrää, jolla saatiin 100-%:inen kuolema. Sp2/0:lle tarvittiin noin 1 µg mykofenolihappoa/ml ja G418:n osalta noin 800 µg/ml.

10

Soluille suoritettiin elektroporaatio usealla tavalla, joko raskaan ja kevyen ketjun genomivektorien

15 (pGenex-H ja pGenex-L) elektroporaatio suoritettiin yhtäaikaan tai kevyen ketjun elektroporaatio suoritettiin yksinään. Viimemainitussa tapauksessa kloonit seulottiin kimeerisen immunoglobuliinin kevyen ketjun korkean ilmentymistason suhteen käyttäen ELISA-tekniikkaa. Näitä kloon

20 eja kasvatettiin sitten isommiksi ja suoritettiin elektroporaatio raskaan ketjun sisältävällä vektorilla. Jos käytettiin cDNA-tandem-geenirakenteita, ilmentämisvektori (TCAE5.2 tai TCAE6) tehtiin ensin lineaariseksi pilkkomalla restriktioentsyymillä NotI. Yksi elektroporaatio oli

25 riittävä sekä raskaan että kevyen ketjun geenien integraation saamiseksi. 2 - 3 viikon kuluttua supernatanteista kuopista, jotka jatkoivat kasvamista sopivan lääkeaineen läsnä ollessa, määritettiin kimeerisen immunoglobuliinin kevyen ketjun tai koko immunoglobuliinin erityys käyttäen

30 ELISA-tekniikkaa. Immunoglobuliinigeenit cDNA-konfiguraatiossa vietiin elektroporaatiolla joko Sp2/0-soluihin kuten kuvattiin edellä tai kiinalaisen hamsterin munasarja-

(CHO-) soluihin, jotka oli adaptoitu kasvamaan suspensiossa seerumia vailla olevassa kasvualustassa. CHO-soluille suoritettiin elektroporaatio käyttäen BTX 600-elek-

35

troporaatiolaitetta, joka oli säädetty sellaisiin olosuhteisiin, että päästiin maksimaalisiin lukuihin G418-resistenttejä pesäkkeitä. Nämä olosuhteet olivat 210 V, 400 μ F ja 13 ohm. Elektroporaation jälkeen solut laskettiin, ne
5 pestiin transfektointipuskurilla, uudelleensuspendoitiin samaan puskuriin ja sijoitettiin jäihin 15 minuutiksi. Solujen pitoisuudeksi säädettiin 1×10^7 elävää solua/ml ja 400 μ l solususpensiota sijoitettiin 0,4 ml:n steriiliin kertakäyttökylvettiin (BTX Inc.). 25 μ g NotI:llä lineaari-
10 seksi tehtyä TCAE 5.2- tai TCAE 6-vektori-DNA:ta, joka sisälsi kloonattuja makaki-immunoglobuliinin vaihtuvan alueen geenejä, uudelleensuspendoitiin TE-puskuriin (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) pitoisuudeksi 1 μ g/ml ja suspensio lisättiin solususpensioon. Elektroporatio suoritettiin
15 vapauttamalla laite käyttäen automaattista lataus- ja sykäysnappia. Kyvetti sijoitettiin jäihin 15 minuutiksi, solut laimennettiin 120 ml:aan seerumia vailla olevaa kasvualustaa ja sijoitettiin kuudelle 96-kuoppaiselle levyille (200 μ l/kuoppa, joka sisälsi noin 6 667 elektroporaatiolla käsiteltyä tai 3 333 elävää solua/kuoppa). Tälle solulinjalle
20 määritettiin riippumattomat elektroporaatioparametrit ja valinta G418:lla suoritettiin pitoisuudessa 400 μ g/ml.

Seulonta vasta-ainetuotannon suhteen

25 Transfektanttien erittämän, ihmisen tai apinan tai kimeerisen vasta-aineen läsnäolo määritettiin ELISA-tekniikalla seuraavasti: 96-kuoppaiset tasapohjaiset levyt (Dynatech) päällystettiin vuohen anti-ihmis-IgG:llä tai -kappalla pitoisuutena 200 ng/kuoppa Coating Buffer-
30 liuoksessa (natriumkarbonaattia 0,8 mg/ml, natriumbikarbonaattia 1,55 mg/ml, pH 9,6) ja inkuboitiin ainakin 16 tunnin ajan 4 °C:ssa. Päällystämispuskuri poistettiin ja kuopat salvattiin 120 μ l:lla Blocking Buffer-liuosta (1 % nautaseerumialbumiinia fosfaatilla puskuroidussa suola-
35 liuoksessa, joka sisältää 0,2 % natriumatsidia) ja inku-

- boitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Korkeintaan 125 µl soluviljelmäsupernatanttia lisättiin salpauspuskuria sisältäviin kuoppiin ja inkuboitiin 2 tunnin ajan 37 °C:ssa. Sitten levyt pestiin 5 kertaan PBS:llä. Lisättiin 100 µl
- 5 piparjuuriperoksidaasilla leimattua vuohen anti-ihmis-IgG:tä (tai -kappa) laimennettuna 1:1 000 - 1:5 000 Dilution Buffer-liuokseen (1 % nautaseerumialbumiinia, 0,05 % Tween-20-valmistetta, 0,02 % natriumatsidia PBS:ssä). Levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan, minkä jälkeen ne
- 10 pestiin 5 kertaan PBS:llä. Kimeerinen vasta-aine todettiin käyttäen 100 µl vetyperoksidia ja substraattia, 3,3',5,5'-tetrametyyliibentsidiiniä (1:1 v/v) kuoppaa kohden. Värireaktio päätettiin 2 - 5 minuutin kuluttua lisäämällä 100 µl 2 M rikkihappoa kuoppaa kohden.
- 15 Alan keskimääräisetkin taitajat voivat vaikeuksitta suorittaa edellä kuvattuihin nähden ekvivalenttisia menettelyjä. Esimerkkejä tällaisista tekniikoista ovat valittujen B-solujen immortalisointi hybridoomafuusiolla edellä kuvatun mukaisesti solulinjaan K5H6/B5, jota kuvaavat Carroll et al., J. Exp. Med. 164 (1986) 1566, tai ekvivalenttiseen solulinjaan kuten SPAZ4 [saatavana yritykseltä Sandoz, katso Ehrlich et al., Clin. Chem. 34 (1988) 1681]. Samankaltaisia solulinjoja voidaan vaikeuksitta rakentaa tavanomaisilla tekniikoilla käyttäen julkisesti saatavilla olevia menettelyjä. Vaihtoehtoisesti
- 20 immunoglobuliinigeenejä voidaan kloonata: (a) soluista, jotka on immortalisoitu virustransformoinnilla Herpes papiolla, kuten kuvaavat Markova et al., Vopr. Virusol. 30 (1985) 549, tai transformoimalla ekvivalenttisella viruksella, (b) yksi-B-solukloonauksella tilapäisen immortalisoinnin saamiseksi kuten kuvaavat Amaroso ja Lipske, J. Immunol. 145 (1990) 3155, tai (c) käyttämällä yhdistelmä-DNA-immunoglobuliinibakteriofagikirjastoja kuten kuvaavat Huse et al., Science 246 (1989) 1275, ja McCafferty et
- 25
- 30
- 35 al., Nature 348 (1990) 552. Sopivan vasta-aineen sisältä-

vien kloonien suhteen seulominen voidaan suorittaa edellä kuvatuilla tekniikoilla tai alan keskimääräisillekin taitajille tutuilla ekvivalenttisilla tekniikoilla, ja ottaa haluttu immunoglobuliinigeeni talteen immortalisoidusta solulinjasta. Lisäksi eristettyjen apina-B-solujen tuottamaa vasta-ainetta voidaan käyttää ihmisen terapiassa manipuloidutta kimeerisen vasta-aineen muodostamiseksi.

Ihmisen säilyvä alue voidaan saada tavanomaisilla tekniikoilla, minä tahansa haluttuna isotyypinä alan keskimääräistenkin taitajien tunteman mukaan, ja apina-vasta-aineen vaihtuva alue voidaan ligatoida ihmisen säilyvään alueeseen. Erityisen käyttökelpoisia kimeerisiä vasta-aineita, jotka kohdistuvat vastaan spesifisiä solupintareseptoreita ja joita voidaan käyttää ihmisten immunoterapiassa, ovat CD4, ICAMs, CD19, CD20, CD8, CD11a, CD11b, CD28, CD18, CD45, CD71 ja TCR.

Esimerkki 3: CD4:lle spesifisen kimeerisen apina/-ihmisvasta-aineen kloonaukseen ja ilmentäminen

Seuraava on spesifinen esimerkki tämän keksinnön mukaisista menetelmistä ja vasta-aineista.

Apinan immortalisoitujen B-solulinjojen muodostaminen

Täysikasvuinen cynomolgus-apina (White Sands New Mexico Primate Center) immunoitiin lihaksensisäisesti moneen kohtaan 150 - 300 µg:lla liukoista CD4:ää (sCD4) tai solumembraaneja (1×10^8 solua) CD4-positiivisesta solulinjasta supT1 käyttäen tavanomaista tehostetta. Immunointi toistettiin joka 2. - 3. viikko kaikkiaan 6 kertaan. Apinalle annettiin tehosteena 100 µg:n ruiske sCD4:ää toisen reiden nivuseen ja viikkoa myöhemmin uuttava imusolmuke samasta reidestä poistettiin kirurgisin toimenpitein. Imusolut poistettiin imusolmukkeesta leikkaamalla kudosta ja huuhtomalla steriilillä DMEM-kasvualustalla. Solususpensio käytettiin nylonharson läpi ja

otettiin talteen sentrifugoimalla $1\,000 \times g$:ssä 10 minuutin ajan.

5 Noin 1×10^8 imusolua suspendoitiin Tris-ammoniumkloridipuskuriin (16 mM, pH 7,5) ja suspensiota lämmitettiin 37°C :ssa 5 minuutin ajan lyysin aikaansaamiseksi punasoluissa. Imusolut otettiin talteen sentrifugoimalla ja uudelleensuspendoitiin L-leusiinimetyyliesteriin (LME) ja inkuboitiin 37°C :ssa 45 minuutin ajan. LME:llä käsitellyt solut suodatettiin nylonverkon läpi ja sentrifugoitiin. Lisättiin 1 ml vasikansikiöseerumia, solut suspendoitiin ja pestiin kahdesti RPMI:llä, joka ei sisältänyt seerumia. Solut laskettiin ja sekoitettiin yhdessä 50 ml:n sentrifugikartioputkessa samaan lukumäärään K6H6/B5-heteromyeloomasoluja, jotka oli esipesty kahdesti seerumia vailla olevalla kasvualustalla. Solut suspendoitiin varovaisesti 1 ml:aan 50-%:ista PEG:tä (polyetyleeniglykoli), joka lisättiin hitaasti varovaisesti sekoittaen 1 minuutissa. Sitten solut uudelleensuspendoitiin lisäämällä 20 ml seerumia vailla olevaa kasvualustaa 5 15 minuutissa samalla varovaisesti sekoittaen PEG:n laimentamiseksi pois. Solut pestiin kahdesti seerumia vailla olevalla kasvualustalla, minkä jälkeen ne uudelleensuspendoitiin pitoisuudeksi $5 \times 10^5/0,1$ ml RPMI-kasvualustaan, joka sisälsi 20 % vasikansikiöseerumia ja gentamysiiniä, ja si- 25 joitettiin 96-kuoppaisille mikrokudosviljelylevyille määränä 0,1 ml/kuoppa. Kuhunkin kuoppaan lisättiin sama tilavuus HAT-kasvualustaa (0,1 ml) ja hybridien annettiin kasvaa 14 - 17 päivän ajan ennen seulomista.

30 Fuusioitujen soluhybridien seulominen anti-CD4:n tuotannon suhteen

Määrittäminen anti-CD4-spesifisyyden määrittämiseksi oli seuraava: ELISA-levyt päällystettiin yhdistelmä-sCD4:llä pitoisuutena 100 ng/kuoppa ja salvattiin 1-%:isella nauraseerumialbumiinilla PBS:ssä. 50 μl :n eriä hybridoomasuper- 35 natanttia otettiin kustakin kuopasta ja niitä inkuboitiin

sCD4:llä päällystetyillä levyillä 60 minuutin ajan. Sitoutuminen todettiin inkuboimalla ^{125} I-leimatulla vuohen anti-ihmis- tai vuohen anti-apina-Ig:llä 60 minuutin ajan. Kuopat pestiin 4 kertaan tislatusella vedellä, minkä jälkeen ne laskettiin gamma-laskijalla. Positiiviset kuopat määritettiin toistamiseen ja hybridoomasolut noista kuopista alakloonattiin 3 kertaan, ensin määränä 5 solua/kuoppa ja sitten kahdesti määränä 1 solu/kuoppa. Tässä vaiheessa anti-sCD4-positiiviset seulottiin niiden kyvyn suhteen sitoutua solupinta-CD4:ään. Tämä suoritettiin inhiboimalla hiiren monoklonaalisen anti-CD4-vasta-aineen, nimeltä 1F3, sitoutuminen CD4-positiiviseen solulinjaan supT1. Lyhyesti tämä tehtiin inkuboimalla yhdessä vaihtelevia määriä apina-CD4:ää ja 10 ng ^{125} I:llä leimattua 1F3:ea 3×10^5 supT1-solun kanssa/kuoppa 96-kuoppaisella levyllä. 1 tunnin inkuboinnin jälkeen huoneenlämpötilassa (noin 20 - 25 °C) solut poistettiin tyhjän avulla lasikuitusuodattimille. Suodattimet pestiin perusteellisesti PBS:llä, minkä jälkeen ne laskettiin gamma-laskijalla 1F3:n sitoutumisen supT1-soluihin inhibition apinahybridoomasupernatanttien vaikutuksesta määrittämiseksi.

Valittiin ehdokasklooni, joka tuotti vasta-ainetta, joka osoitti voimakasta 1F3:n vastaista inhibitiota. Valitsemamme klooni isotyyppitettiin käyttäen ihmisen isotyyppitysreagensseja ja se todettiin IgG2:ksi, jolla oli lambda-kevyt ketju. Tätä solulinjaa kasvatettiin suurempiin lukumääriin sen immunoglobuliinigeenien kloonaukseksi.

Raskaan ja kevyen ketjun vaihtuvien alueiden geenien kloonauksella apinan immortalisoiduista B-soluista

Kokonais-RNA eristettiin 1×10^7 :stä apinan immortalisoidusta B-solusta käyttäen edellä kuvattua guanidiniumisotiosyanaattimenetelmää. Yhdestä kymmenesosasta kokonais-RNA:ta valmistettiin yksisäikeistä cDNA:ta käyttäen oligo-dT-oligonukleotidialuketta ja käänteiskopioija-

entsyymiä, edellä samoin kuvatun mukaisesti. 1/10 ss-cDNA:n määrästä käytettiin PCR-reaktioihin. Kuudesta PCR-reaktiosta kukin sisälsi yhden kuudesta SalI-restriktio-

5 kohdan sisältävästä 5' V_H-ryhmäspesifisestä oligonukleotidialukkeesta yhdessä IgG 3'-säilyvä alue-oligonukleotidin kanssa, joka sisälsi NheI-kohdan, jotka kummatkin esitetään kuviossa 7-1. Samoin suoritettiin 5 PCR-reaktiota käyttäen yhtä viidestä BglII-kohdan sisältävästä 5'-

10 lambda-johtosekvenssioligonukleotidialukkeesta ja 3'-lambda-säilyvä alue-aluketta, joka sisälsi AvrII-kohdan. Reaktio-olosuhteet olivat edellä kuvatun mukaiset. Kukin PCR-reaktio suoritettiin kolminkertaisena. Kunkin raskas ketju- ja kevyt ketjumonistamisreaktion tuotteet ajettiin 1,2-%:isessa agarosigeelissä. VH4-raskas ketju-alue

15 (sekvenssi tunnusno 13: 5'-ACTAAGTCGACATGAAACACCTGTGGTTCTT-3') ja lambda-alue (sekvenssi tunnusno 14: 5'-ATCAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTCTCCTCC-3') antoivat voimakaat nauhat agarosigeelielektroforeesissa. Näiden reaktioiden tuotteet kloonattiin vektoriin TCAE 6, joka sisältää ihmisen IgG1- ja ihmisen lambda-säilyvä alue-sekvenssejä.

20

Kahden vaihtuva aluegeenin kloonaukseen ilmentämisvektoriin TCAE 6 tehtiin peräkkäin. Ensiksi raskas ketju-PCR-tuotetta ja vektoria TCAE 6 pilkottiin restriktioentsyymeillä SalI ja NheI, tuotteet uutettiin fenoli/kloroformilla ja käytettiin Sephadex G-25-kierrekolonnin läpi. PCR-tuotetta ligatoitiin leikattuun vektoriin yön yli 14 °C:ssa T4-DNA-ligaasin läsnä ollessa. Noin 500 ng kokonais-DNA:ta ligatoitiin 10 µl:n tilavuudessa insertti-/vektori-moolisuhteen ollessa 10:1. Ligatoidulla materiaa-

25 lilla transformoitiin transformoitumiskelpoisia XL-1 Blue-soluja (Stratagene) ja transformoidut solut maljattiin LB-agarmaljoille, jotka sisälsivät 50 µg/ml ampisilliiniä. Ampisilliiniresistenttien bakteerien pesäkkeitä noukittiin

30 ja kasvatettiin 5 ml:n miniviljelminä. Plasmidi-DNA uutet-

35

tiin näistä kustakin viljelmästä tavanomaisella alkalisen lyysin menetelmällä, se leikattiin restriktioentsyymeillä SalI ja NheI ja tuotteet ajettiin 1,2-%:isessa agarosi-geelissä. Noin 450 ep:n inserttejä käsittäviä plasmideja
5 käytettiin templaatteina kevyen ketjun vaihtuvien alueiden myöhemmässä kloonauksessa. Tuotteet kevyen ketjun PCR-reaktiosta sekä raskas ketjuinsertin sisältävä plasmidi leikattiin restriktioentsyymeillä BglII ja AvrII ja ligoitiin toisiinsa. Plasmidiminiviljelmat seulottiin leikkaamalla BglII:lla ja AvrII:lla. Positiivisiksi katsottiin
10 pilkkomistuotteet, joissa oli noin 400 - 450 ep:n insertti. Sekä SalI/NheI- että BglII/AvrII-insertin sisältäviä plasmideja kasvatettiin suuremmiksi määriksi DNA-sekventointia varten.

15 Kimeerisen tandem-vasta-aineen ilmentämisvektorit TCAE 5.2 ja TCAE 6 saatiin vektorista CLDN, joka puolestaan on vektorin RLDN10b [Science 253 (1991) 77 - 79] johdannainen. RLDN10b on puolestaan ilmentämisvektorin TND [DNA 7 (1988) 651 - 661] johdannainen.

20 RLDN10b eroaa vektorista TND seuraavilla tavoilla. Dihydrofolaattireduktaasi- (DHFR-) transkriptiokasetti (promoottori, cDNA ja polyadenylaatioalue) sijoitettiin kudospasminogeeniaktivaattorikasetin (t-PA-ilmentämiskasetti) ja neomysiinifosfotransferaasi- (NEO-) kasetin väliin, jolloin kaikki kolme kasettia ovat tandemissa ja
25 samassa transkriptionaalisessa suuntauksessa. Lisäksi DHFR-geenipromoottori CLDN:ssä on korvattu hiiren β -globiinin pääasiallisella promoottorilla [Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 1246 - 1254] ja t-PA-cDNA on korvattu polyliittäjällä. Kaikki kolme eukaryoottista transkriptiokasettia
30 (ilmentämis-, DHFR-, NEO-) voidaan erottaa bakteeriplasmidi-DNA:sta (pUC9-johdannainen) pilkkomalla restriktioendonukleasilla NotI.

35 CLDN poikkeaa RLDN10b:stä, koska Rous-LTR polyliittäjän edessä on korvattu ihmisen cytomegaloviruksen

välitön varhaisgeenipromoottoritehostimella [Cell 41 (1985) 521].

Ilmentämisvektorit TCAE 5.2 ja TCAE 6 eroavat CLDN:stä sikäli, että:

5 1) ne sisältävät neljä transkriptiokasettia (kolmen asemesta) tandem-järjestyksessä:

 (a) ihmisen immunoglobuliinin kevyen ketjun säilyvän alueen, joka on saatu monistamalla cDNA:ta polymeraasiketjureaktiolla. Vektorissa TCAE 5.2 tämä on ihmisen
10 immunoglobuliinin kevyen ketjun kappa-säilyvä alue (aminohappojen Kabat-numerointi 108 - 214, allotyyppi Km3) ja vektorissa TCAE 6 ihmisen immunoglobuliinin kevyen ketjun lambda-säilyvä alue (aminohappojen Kabat-numerointi 108 - 215, genotyyppi Oz-, Mcg-, Ke- allotyyppi);

15 (b) ihmisen immunoglobuliinin raskaan ketjun säilyvän alueen; kummassakin rakenteessa ihmisen immunoglobuliinin raskas ketju oli gamma-1-säilyvä alue (aminohappojen Kabat-numerointi 114 - 478, allotyyppi Gmla, Gmlz), joka saatiin monistamalla cDNA:ta polymeraasiketjureaktiolla;
20

 (c) DHFR:n, joka sisältää oman eukaryoottisen promoottori- ja polyadenylaatioalueensa;

 (d) NEO:n, joka myös sisältää oman eukaryoottisen promoottori- ja polyadenylaatioalueensa;

25 3) ihmisen immunoglobuliinin kevyt ja raskas ketjukasetit sisältävät synteettisiä signaalisekvenssejä immunoglobuliiniketjujen erittämiseksi;

 4) ihmisen immunoglobuliinin kevyt ja raskas ketjukasetit sisältävät spesifisiä DNA-liittäjiä, jotka mahdollistavat immunoglobuliinin kevyen ja raskaan ketjun vaihtuvien alueiden insertoinnin, jotka säilyttävät translaation luentakehyksen eivätkä muuta immunoglobuliiniketjuissa normaalisti tavattuja aminohappoja. Kuvatut muutokset mukaan sisällyttämällä rakennettiin vektorit
30 TCAE 5.2 ja TCAE 6. Kloonaamalla immunoglobuliinin kevyen
35

ja raskaan ketjun vaihtuvan alueen geenit anti-CD4-heterohybridoomasolulinjasta E9.1 vektoriin TCAE 6 saatiin rakenne, joka tallettiin ATCC-talletuslaitokseen. Talletettu rakenne sisältää cynomolgus-apinan immunoglobuliini-
5 nin raskaan ketjun vaihtuvan alueen ja cynomolgus-apinan immunoglobuliinin kevyen ketjun vaihtuvan alueen, joiden sekvenssit esitetään kuviossa 13 ja vastaavasti 14, kloonattuina anti-CD4-hybridoomasolulinjasta E9.1. Raskaan ketjun säilyvä alue on peräisin ihmisestä ja edustaa gamma-1-isotyyppiä ja Gmla-, Gmlz-allotyyppiä. Lambda-kevyen
10 ketjun säilyvä alue on myös peräisin ihmisestä ja edustaa Oz-, mcg- genotyyppiä ja Ke- allotyyppiä. Immunoglobuliinigeenit kloonataan nisäkäsilmentämisvektoriin TCAE 6, joka esitetään kuviossa 6, ja joka elektroporaatiolla nisäkässolulinjaan CHO vietyä tuotti kimeerisen apina/ihmis-anti-CD4-vasta-aineen. Tässä kuvatulla DNA-rakenteella transformoitiin bakteerikanta XL-1 Blue, valinta suoritettiin antibiootilla ampisilliini ja saatu kanta talletettiin bakteerisolususpension 15 % glyserolia sisältävässä steriilissä LB-kasvualustassa.
15 20

Toinen käyttökelpoinen ilmentämissysteemi on sellainen, jossa valikointimerkkiä koodittavaa geeniä on modifioitu haluttua sekvenssiä koodittavien yhdistelmä-DNA-systeemien saannon lisäämiseksi. Esimerkiksi dominoivan
25 valikointimerkin translaation käynnistymisen häirinnästä seuraa vähemmän lääkeaineresistenttejä pesäkkeitä kuin ei-häirityllä vektorilla, mutta kukin yksittäinen pesäke ilmentää merkittävästi korkeampia ko-kytkeyn geenituotteen tasoja kuin ei-häirityssä vektorissa. Esimerkiksi translaation käynnistyminen on proteiinisynteesin ensimmäinen askel. Neomysiinifosfotransferaasigeenin (G418-resistenssigeeni) translaation käynnistymiskohta vaihdettiin konsensus-Kozak-sekvenssistä (ccAccATGG) heikkoon Kozak-sekvenssiin (ccTccATGC). G418-resistenssigeenin translaation
30 35 käynnistymisen häirintä johti: 1) merkittävään (5-kertai-

seen) laskuun G418-resistenttien pesäkkeiden lukumäärässä, jotka saatiin samasta määrästä solua kohden transfektoitua plasmidi-DNA:ta, ja 2) merkittävään nousuun kussakin kloonissa ilmentyvän ko-kytketyn tuotegeenin määrässä. Konsensus-Kozak-sekvenssin sisältävien kloonien osalta 73 % seulotuista pesäkkeistä tuotti alle 25 ng/ml, ja vain 3 % tuotti yli 100 ng/ml. Muutetun, heikomman Kozak-sekvenssin sisältävien kloonien kohdalla 8 % seulotuista pesäkkeistä tuotti alle 25 ng/ml, jolloin vastaavasti 63 % pesäkkeistä tuotti yli 100 ng/ml. Spesifisesti viitaten kuvioon 16 (jossa vektorissa TCAE 5.2 on konsensus-Kozak-sekvenssi ja vektorissa TCAE 12 on heikompi Kozak-sekvenssi) 258 pesäkettä saatiin 2 elektroporaatiosta 25 µg:lla DNA:ta, joka sisältää konsensus- (ei-muutetun) translaatioaloituskohdan käsittävän neomysiinifosfotransferaasigeenin. 201 kpl näistä pesäkkeistä (78 %) ei ilmentänyt mitään todettavaa geenituotetta (eli < 25 ng/ml kimeeristä immunoglobuliinia) ja vain 8 pesäkettä (3 %) ilmensi yli 100 ng/ml. 98 pesäkettä saatiin 6 elektroporaatiosta 25 µg:lla DNA:ta, joka sisältää muutetun translaatioaloituskohdan käsittävän neomysiinifosfotransferaasigeenin. 63 % näistä pesäkkeistä ilmensi yli 100 ng/ml, ja vain 8 % näistä pesäkkeistä ilmensi alle 25 ng/ml.

DNA-sekventointi

Valmistettiin plasmidi-DNA 100 ml:n viljelmistä. Sitä puhdistettiin edelleen saostamalla (1 tilavuus) seoksella, jossa oli pitoisuus 2,5 M natriumkloridi ja 20 % polyetyleeniglykolia (6 tilavuutta), jäissä 15 minuutin ajan. 20 minuuttia kestävän sentrifugoinnin 10 000 x g:ssä jälkeen pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla, sentrifugoitiin toistamiseen ja kuivattiin Speedivac-laitteessa (Savant). DNA-pelletti uudelleensuspendoitiin deionisoituun veteen pitoisuudeksi 150 - 250 µg/ml. 5 µg kaksisäikeistä DNA:ta sekventoitiin Sangerin tekniikalla. Käytettiin sekventointialukkeita, jotka

olivat homologisia sekvensseihin nähden ilmentämisvektoreissa ylävirtaan ja alavirtaan joko kevyt ketju- tai raskas ketjuinserteistä. Insertit sekventoitiin sekä 5' → 3'- että 3' → 5'-suunnassa. Kaksi anti-CD4-kevyen ketjun ja kaksi anti-CD4-raskaan ketjun käsittävää kloonia, jotka molemmat muodostettiin erillisillä PCR-reaktioilla, sekventoitiin rinnan sen määrittämiseksi, oliko PCR-reaktion aikana tapahtunut nukleotidimuutoksia. Molemmat valitut raskaan ketjun käsittävät ja molemmat valitut kevyen ketjun käsittävät kloonit todettiin identtisiksi koko pituudeltaan, mikä varmisti, ettei monistamisprosessissa ollut tapahtunut virheitä. Anti-CD4-raskaan ketjun ja anti-CD4-kevyen ketjun sekvenssit esitetään kuvioissa 13 ja 14 sekä sekvenssiluettelossa sekvensseinä nrot 15 ja 16.

15 Kimeerisen apina/ihmis-anti-CD4:n ilmentäminen

Ilmentämisvektoreita TCAE 5.2 ja TCAE 6 ei ainoastaan voida käyttää stabiiliin integroituun ilmentämiseen solulinjoissa Sp2/0 ja CHO, vaan koska ne sisältävät SV40-alkukohdan ne voidaan myös ilmentää tilapäisesti solulinjassa COS. COS-soluilmentäminen suoritettiin seuraavasti: COS-solut siirrostettiin päivää ennen transfektointia, jotta ne olisivat 50 - 70-%:isesti yhteen kasvaneita seuraavana päivänä. Kasvualusta poistettiin ja solut pestiin kahdesti Transfection Buffer-liuoksella (TB; 140 mM NaCl, 25 mM Tris, 5 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). 30 µg kimeerisiä raskaita ja kevyitä anti-CD4-apina/ihmis-immunoglobuliiniketjuja sisältävää, seesiumkloridilla puhdistettua TCAE 6-plasmidia sekoitettiin 3 ml:aan DEAE-dekstraania maljaa kohden (1 mg/ml TB:ssä). DNA:ta inkuboitiin solujen kanssa 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. DNA-liuos poistettiin ja korvattiin 3 ml:lla 20-%:ista glyseroliliuosta 1,5 - 2,5 minuutiksi, minkä jälkeen solut pestiin kahdesti TB:llä. Soluja inkuboitiin 5 ml:ssa tuotetta, pitoisuuden 100 mM klorokiinia sisältävää kasvualustaa 3 - 5 tunnin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen ne pestiin kah-

desti kasvualustalla ja inkuboitiin normaalissa DMEM-kasvualustassa 72 tunnin ajan. Transfektoiduista COS-soluista saadusta supernatantista (100 µl) eri laimennoksina määrättiin vasta-aineen läsnäolo ELISA-pohjaisella tekniikalla. Vuohen anti-ihmis-lambdalla päällystettiin 96 kuopan määrityslevyjä ja peroksidaasilla leimattua vuohen anti-ihmis-IgG:tä käytettiin toteamisvasta-aineena tavanomaisissa ELISA-olosuhteissa. COS-solujen todettiin tuottavan 10 - 40 ng/ml kimeeristä apina/ihmis-vasta-ainetta. Suurempia supernatanttilavuuksia konsentroitiin 10-kertaisesti ja niitä käytettiin suorasitoutumis-RIA:ssa CD4-positiivisilla supT1-soluilla. Positiivisena ja vastaavasti negatiivisena verrokkina käytettiin kokonaista kanta-apinavasta-ainetta ja epäoleellista ihmisimmunoglobuliinia (kuvio 11). Lisäksi apina-anti-CD4:ää ja kimeeristä apina/ihmis-anti-CD4:ää käytettiin korkean affiniteetin hiiri-anti-CD4- (1F3-) vasta-aineen sitoutumisen inhiboimiseksi (kuvio 12). Voidaan nähdä, että apina/ihmis-yhdistelmä-DNA-vasta-aine (ATCC nro 69 030) ei ainoastaan sitoudu CD4-positiivisiin soluihin, vaan kykenee inhiboimaan 1F3:n sitoutumisen CD4-positiivisiin soluihin suunnilleen samoina pitoisuuksina kokonaista apinavasta-ainetta tai itse 1F3:ea.

Seuraava on esimerkki tämän keksinnön mukaisista menetelmistä ja vasta-aineista.

Esimerkki 4: Apinavasta-aineiden muodostaminen ihmisen imusoluantigeenejä vastaan

Täysikasvuinen cynomolgus-apina (White Sands New Mexico Primate Center) immunoitiin lihaksensisäisesti mo-
neen kohtaan 5×10^8 kokonaisella CD54-positiivisella ihmisen imusolulla. Käytetyt solut olivat vaihtoehtoisesti SB-soluja (ihmisen B-imusolulinja) ja aktivoituja ääreisveren ihmisimusoluja, jotka oli aktivoitu esi-inkuboimalla seoksella, jossa oli Phytolacca americana- (engl. pokeweed) mitogeenia (2,5 mg/ml), forbolimonoasetaattia

(40 nM) ja fytohemagglutiniinia (4 mg/ml), sisällyttäen mukaan tavanomaista tehostetta. Immunointi toistettiin joka 2. - 3. viikko 8 kuukauden aikana. Immunoiduista eläimistä saatua seerumia seulottiin eri ajankohtina hiirivasta-aineen, 84H10, jonka tiedetään sitoutuvan ICAM-1:een, sitoutumisen inhibioidin suhteen. Kyllästävä määrä 84H10:aa sidottiin kiinalaisen hamsterin munasarjasoluihin (CHO), jotka oli aiemmin transfektoitu ihmis-CD54-cDNA:n sisältävällä ilmentämisvektorilla, ja valikoitiin solupinta-CD54:n runsaan ilmentymisen suhteen, yhdessä kasvavien laimennosten apinaseerumia kanssa. 84H10-sitoutumisen inhibiitio esitetään kuviossa 15.

Muita hiiren monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat muita ihmisen imusoluantigeeneja, testattiin inhibioidin suhteen käyttämällä samoilla immunointimenetelmillä saatua apinaseerumia.

Käyttö

Edellä kuvatulla tavalla tai ekvivalenttisilla tekniikoilla tuotettuja vasta-aineita voidaan puhdistaa affiniteetti- ja kokoeksklusiokromatografian yhdistelmällä karakterisointia varten funktionaalisissa biologisissa määrityksissä. Näihin määrityksiin kuuluu spesifisyyden ja sitoutumisaffiniteetin sekä ilmennettyyn isotyyppiin, esim. ADCC, liittyvän efektorifunktion tai komplementtikiinnityksen määrittäminen. Tällaisia vasta-aineita voidaan käyttää passiivisina tai aktiivisina terapeuttisina aineina lukuisia ihmisen sairauksia vastaan, mukaan lukien B-solulymfooma, tarttuvat sairaudet mukaan lukien aids, autoimmuuni- ja tulehdussairaudet, sekä transplantaation yhteydessä. Vasta-aineita voidaan käyttää joko niiden natiivissa muodossa tai osana vasta-aine/kelaatti-, vasta-aine/lääkeaine- tai vasta-aine/toksiinikompleksia. Lisäksi kokonaisia vasta-aineita tai vasta-ainefragmentteja (Fab₂, Fab, Fv) voidaan käyttää kuvantamisreagensseina tai mahdollisina rokotteina tai

immunogeeneina aktiivisessa immunoterapiassa anti-idiotyyppivasteiden muodostamiseksi.

Terapeuttisen vaikutuksen tuottamiseksi käyttökelpoinen vasta-ainemäärä voidaan määrittää tavanomaisilla tekniikoilla, jotka ovat tuttuja alan keskimääräisillekin taitajille. Vasta-aineet annetaan tavallisesti käyttöön tavanomaisen tekniikan mukaan farmaseuttisesti hyväksyttävässä puskurissa, ja ne voidaan antaa mitä tahansa haluttua tietä. Tässä kuvattujen vasta-aineiden tehokkuuden ja niiden siedon ihmisten toimesta ansiosta näitä vasta-aineita on mahdollista antaa toistuvasti erilaisten sairauksien tai sairaustilojen vastustamiseksi ihmisessä.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistetut anti-CD4-yhdistelmä-DNA-vasta-aineet (tai niiden fragmentit) ovat samoin käyttökelpoisia immunosuppression indusoimiseksi, eli ihmisen tai eläimen immuunijärjestelmän suppression indusoimiseksi. Tähän liittyy siksi myös menetelmä immunosuppression indusoimiseksi ennalta ehkäisevästi tai terapeuttisesti sitä tarvitsevassa ihmisessä tai muussa eläimessä antamalla tehokas, ei-myrkyllinen määrä tällaista keksinnön mukaisesti tuotettua vasta-ainetta tällaiselle ihmiselle tai muulle eläimelle.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavien yhdisteiden kyky indusoida immunosuppressio voidaan osoittaa tähän tarkoitukseen käytetyillä tavanomaisilla testeillä, esimerkiksi sekaimusolureaktiotestillä tai testillä, joka määrittää T-solulisisäntymisen tymidiinin otosta mitatun inhibition.

Se seikka, että tässä kuvatuilla vasta-aineilla on käyttöä immunosuppression indusoinnissa, merkitsee, että ne ovat käyttökelpoisia siirrettyjen elinten tai kudosten (esim. munuainen, sydän, keuhko, luuydin, iho, sarveiskalvo jne.) vastustuksen tai hyljinnän hoitamiseksi tai estämiseksi; autoimmuuni-, tulehdus-, lisääntymis- ja hyperlisisäntymissairauksien hoitamiseksi tai

- estämiseksi, ja immuunivälitteisten sairauksien (esim. nivelreuma, punahukka, systeeminen punahukka, Hashimoton autoimmuunikilpirauhastulehdus, multippeliskleroosi, myasthenia gravis-sairaus, tyypin 1 diabetes, silmän keskikalvon tulehdus, munuaisen tyvikalvon sairaus, psoriasis, atopikaalinen ihotulehdus, kosketusihottuma ja muut ihottumaan liittyvät ihotulehdukset, hilseilevä ihotulehdus, ihon jäkälätauti, Pemphigus, rakkulaihottuma, Epidermolysis bullosa-sairaus, nokkosrokko, angioedeema, verisuonitulehdus, ihon punoitus, ihon runsas eosinisolujen esiintyminen, pälvikaljuus jne.) ihoilmentymien hoitamiseksi ja estämiseksi; reversiibelin obstruktiivisen ilmatiesairauden, suolitulehdusten ja allergioiden (esim. koliikkisairaus, peräsuolen tulehdus, mahalaukun ja suoliston tulehdus, jossa esiintyy runsaasti eosinisoluja, syöttösolujen paikallinen tai yleinen lisääntyminen, Crohnin sairaus ja haavainen paksusuolen tulehdus) ja ruokaan liittyvien allergioiden (esim. migreeni, nuha ja ihottuma) hoitamiseksi.
- 20 Alan ammattilainen kykenisi rutiinikokeilla määrittämään, mikä olisi tehokas, ei-myrkyllinen vasta-ainemäärä immunosuppression indusoimiseksi. Yleensä kuitenkin tehokas annostus on noin 0,05 - 100 mg/kg ruumiin painoa/päivä.
- 25 Keksinnön mukaisesti valmistetut vasta-aineet (tai niiden fragmentit) ovat samoin todennäköisesti käyttökelpoisia kasvainten hoitamiseksi nisäkkäissä. Spesifisemmin ne ovat ilmeisesti käyttökelpoisia kasvaimen koon pienentämiseksi, kasvaimen kasvun inhiboimiseksi ja/tai kasvaimia kantavien eläinten eliniän pidentämiseksi. Täten vasta-aineet mahdollistavat myös menetelmän kasvainten hoitamiseksi ihmisessä tai muussa eläimessä antamalla tällaiselle ihmiselle tai eläimelle tehokas, ei-myrkyllinen määrä vasta-ainetta. Alan ammattilainen kykenisi rutiinikokeilla määrittämään,
- 30 mikä olisi tehokas, ei-myrkyllinen vasta-ainemäärä syöpäkas-
- 35

vainten hoitamiseksi. Yleensä kuitenkin tehokkaan annostuksen odotetaan olevan noin 0,05 - 100 mg/kg ruumiin painoa/päivä.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja vasta-aineita voidaan antaa ihmiselle tai muulle eläimelle edellä mainittujen hoitomenetelmien mukaan määränä, joka on riittävä tällaisen vaikutuksen tuottamiseksi terapeuttisessa tai ennalta ehkäisevässä mielessä. Tällaiset vasta-aineet voidaan antaa tällaiselle ihmiselle tai muulle eläimelle tavanomaisessa annostusmuodossa, joka on valmistettu yhdistämällä keksinnön mukainen vasta-aine tavanomaiseen farmaseuttisesti hyväksyttävään kantajaan tai laimentimeen tunnettujen tekniikoiden mukaan. Alan ammattilainen huomaa, että farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen muodon ja luonteen määrää vaikuttavan ainesosan määrä, johon se on määrä yhdistää, antotie ja muut tutut muuttujat.

Keksinnön mukaisesti valmistettu vasta-aine (tai sen fragmentti) voidaan antaa suun kautta, ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti, hengitysteitse tai paikallisesti. Tässä käytettynä ilmaisen ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti piiriin kuuluu laskimonsisäinen, lihaksensisäinen, ihonalainen anto, anto peräsuolen kautta, emättimen sisäisesti tai vatsaontelon sisäisesti. Yleensä edullisia ovatannon ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti muodot ihonalaisesti ja lihaksensisäisesti.

Päivittäiset ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tai suun kautta annettavat annostusohjelmat mainittujen yhdisteiden käyttämiseksi immunosuppression indusoimiseksi ennalta ehkäisevästi tai terapeuttisesti tai syöpäkasvainien hoitamiseksi terapeuttisesti ovat yleensä noin 0,05 - 100, mutta edullisesti noin 0,5 - 10, mg/kg ruumiin painoa/päivä.

Tässä esitetty vasta-aine voidaan antaa myös hengitysteitse. Ilmaisulla "hengitysteitse" tarkoitetaan

nenänsisäistä antoa tai antoa suun kautta hengittämällä. Sopivia annostusmuotoja tällaiseen antoon, kuten aerosolikoostumus tai mitta-annosinhalaattori, voidaan valmistaa tavanomaisilla tekniikoilla. Tässä kuvatun yhdisteen
5 käytettävä edullinen annostusmäärä on yleensä noin 10 - 100 mg.

Keksinnön mukaisesti tuotettu vasta-aine voidaan antaa myös paikallisesti. Paikallisella annolla tarkoitetaan ei-systeemistä antoa ja siihen sisältyy vasta-
10 aineyhdisteen (tai sen fragmentin) käyttäminen ulkoisesti orvaskedellä, suuonteloon ja tällaisen vasta-aineen tiputtaminen korvaan, silmään ja nenään, jolloin sitä ei oleellisesti joudu verenkiertoon. Systeemisellä annolla tarkoitetaan antoa suun kautta, laskimonsisäisesti, vatsaontelon
15 sisäisesti ja lihaksensisäisesti. Terapeuttisen tai ennalta ehkäisevän vaikutuksen saamiseksi tarvittava vastaainemäärä vaihtelee luonnollisesti valitun vasta-aineen, hoidettavan tilan luonteen ja vakavuuden ja hoidettavan eläimen mukaan, ja sen valitsee viimekädessä hoitava lää-
20 käri. Sopiva paikallinen annos tässä kuvattua vastaainetta on yleensä noin 1 - 100 mg/kg ruumiin painoa/päivä.

Koostumuksia

Vaikka vasta-aine tai sen fragmentti on mahdollis-
25 ta antaa yksinään, edullisesti se annetaan käyttöön farmaseuttisena koostumuksena. Vaikuttava ainesosa voi käsittää paikalliseen antoon 0,001 % - 10 % w/w, esim. 1 - 2 paino-%, koostumuksesta, joskin se voi käsittää jopa 10 % w/w, mutta edullisesti ei yli 5 % w/w ja edullisemmin
30 0,1 % - 1 % w/w, koostumuksesta.

Esillä olevan vasta-ainetta sisältävät paikalliset koostumukset käsittävät vaikuttavan ainesosan yhdessä sen yhden tai useamman hyväksyttävän kantajan kanssa ja mahdollisesti mitä tahansa muita terapeuttisia ainesosia (yksi
35 tai useampi). Kantajan (kantajien) on oltava "hyväksyttä-

vä" ("hyväksyttäviä") siinä mielessä, että ne sopivat yhteen koostumuksen muiden ainesosien kanssa eivätkä ole haitallisia niiden vastaanottajalle.

Paikalliseen antoon sopivia koostumuksia ovat nestemäiset tai puolinestemäiset koostumukset, jotka sopivat imeytymiseen ihon läpi kohtaan, jossa hoitoa tarvitaan, kuten linimentit, huuhteet, voiteet tai pastat, ja tipat, jotka sopivat antoon silmään, korvaan tai nenään.

Esillä olevan kuvauksen mukaiset tipat voivat käsittää steriilejä liuoksia tai suspensioita vedessä tai öljyssä ja niitä voidaan valmistaa liuottamalla vaikuttava ainesosa bakteereja tappavan ja/tai sieniä tappavan aineen ja/tai minkä tahansa muun sopivan säilytysaineen sopivaan vesiliuokseen, edullisesti siten, että mukana on pinta-aktiivinen aine. Saatu liuos voidaan sitten kirkastaa suodattamalla, siirtää sopivaan säiliöön, johon se sitten suljetaan tiiviisti ja steriloidaan autoklavoimalla tai pitämällä 90 - 100 °C:ssa ½ tunnin ajan. Vaihtoehtoisesti liuos voidaan steriloida suodattamalla ja siirtää säiliöön aseptisellä tekniikalla. Esimerkkejä tippoihin sisällytettäväksi sopivista bakteereja ja sieniä tappavista aineista ovat fenyylielohopeanitraatti tai -asettaatti (0,002 %), bentsalkoniumkloridi (0,01 %) ja klorheksidiiniasettaatti (0,01 %). Sopivia liuottimia öljyliuoksen valmistamiseksi ovat glyseroli, laimennettu alkoholi ja propyleeniglykoli.

Esillä olevan esityksen mukaisia huuhteita ovat iholle tai silmään käytettäväksi sopivat huuhteet. Silmähuuhde voi käsittää steriilin vesiliuoksen, joka sisältää mahdollisesti bakteereja tappavaa ainetta, ja se voidaan valmistaa menetelmiin tippojen valmistamiseksi nähden samankaltaisilla menetelmillä. Iholla käytettävät huuhteet tai linimentit voivat myös sisältää aineen kuivumisen nopeuttamiseksi ja ihon jäähdyttämiseksi, kuten alkoholi tai

asetoni, ja/tai kosteuttavan aineen kuten glyseroli tai öljy kuten risiiniöljy tai maapähkinäöljy.

Esillä olevan kuvauksen mukaiset voiteet ja pastat ovat vaikuttavan ainesosan puolikiinteitä koostumuksia ulkoiseen käyttöön. Ne voidaan valmistaa sekoittamalla vaikuttava ainesosa hienojakoisessa tai jauhemaisessa muodossa yksinään tai liuotettuna tai suspendoituna vesi- tai ei-vesinesteeseen sopivaa laitteistoa käyttäen rasva- tai ei-rasvapohjaan. Pohja voi käsittää hiilivetyjä kuten kova, 5 pehmeä tai nestemäinen parafiini, glyseroli, mehiläisvaha, metallinen saippua; arabikumiliuos; luonnollista alkuperää oleva öljy kuten manteli-, maissi-, maapähkinä-, risiini- tai oliiviöljy; villarasva tai sen johdannaiset, tai rasvahappo kuten steariini- tai öljyhappo 10 yhdessä alkoholin kuten propyleeniglykoli tai macrogols-alkoholi kanssa. Koostumus voi sisältää minkä tahansa sopivan pinta-aktiivisen aineen kuten anionisen, kationisen tai ei-ionisen pinta-aktiivisen aineen kuten sorbitaanierit tai sen polyoksietyleenijohdannaiset. Suspendoimisaineita kuten luonnolliset kumit, selluloosajohdannaiset tai epäorgaaniset materiaalit kuten piipitoiset kvartsit ja muita ainesosia kuten lanoliini voidaan myös sisällyttää mukaan. 20

Alan ammattilainen huomaa, että kuvauksen mukaisen vasta-aineen tai sen fragmentin yksittäisten annostusten optimimäärän ja ajallisen optimisijoituksen määräävät hoidettavan tilan luonne ja vakavuus, annon muoto, tie ja kohta sekä hoidettava nimenomainen eläin, ja että tällaiset optimit voidaan määrittää tavanomaisilla tekniikoilla. Alan ammattilainen huomaa myös, että optimaalisen hoito-ohjelman, eli keksinnön mukaisen vasta-aineen tai sen fragmentin annoslukumäärän, joka annetaan päivässä määrätyn määrän päiviä, voivat alan ammattilaiset varmistaa käyttäen tavanomaiseen tapaan suoritettuja hoitomäärityskokeita. 35

Selvitystä enempää laajentamatta uskotaan, että alan ammattilainen pystyy edeltävää kuvausta käyttäen täysin käyttämään esillä olevaa keksintöä. Seuraavat tulee siksi tulkita vain havainnollistaviksi esimerkeiksi
5 eikä mitenkään esillä olevan keksinnön suojapiiriä rajoittaviksi.

Kapselikoostumus

Tämän kuvauksen mukainen farmaseuttinen koostumus kapselin muodossa valmistetaan täyttämällä tavanomainen
10 kaksiosainen kovagelatiinikapseli 50 mg:lla edellä kuvattua vasta-ainetta tai sen fragmenttia jauheen muodossa, 100 mg:lla laktoosia, 32 mg:lla talkkia ja 8 mg:lla magnesiumstearaattia.

Ruiskeena annettava ruoansulatuskanavan ulkopuolisen koostumus

Tämän kuvauksen mukainen farmaseuttinen koostumus ruiskeena annettavaksi sopivassa muodossa valmistetaan sekoittamalla 1,5 paino-% kuvauksen mukaista vasta-ainetta tai sen fragmenttia 10 tilavuusprosenttiin propyleeniglykolia ja vettä. Liuos steriloidaan suodattamalla.
20

Voidekoostumus

Käytetään kuvauksen mukaista vasta-ainetta tai sen fragmenttia 1,0 g; valkoista pehmeää parafiinia q.s. 100,0 g.

25 Kuvauksen mukainen vasta-aine tai sen fragmentti dispergoidaan pieneen tilavuuteen kantajaa tasaisen, homogeenisen tuotteen saamiseksi. Sitten kokoonpainuvat metalliputket täytetään dispersiolla.

Paikallisesti käytettävä voidekoostumus

30 Koostumus on seuraava:
keksinnön mukaista vasta-ainetta 1,0 g
Polawax GP 200-valmistetta 20,0 g
vedetöntä lanoliinia 2,0 g
valkoista mehiläisvahaa 2,5 g
35 etyylihydroksibentsoaattia 0,1 g
tislattua vettä q.s. 100,0 g

Polawax-valmistetta, mehiläisvahaa ja lanoliinia kuumennetaan yhdessä 60 °C:ssa. Metyylihydroksibentsoaattiliuos lisätään ja seos homogenisoidaan käyttämällä sekoitusta suurella nopeudella. Sitten lämpötilan annetaan laskea 50 °C:seen. Sitten lisätään kuvauksen mukainen vasta-aine tai sen fragmentti, joka dispergoidaan perusteellisesti, minkä jälkeen koostumuksen annetaan jäähtyä sitä alhaisella nopeudella sekoittaen.

Paikallinen huuhdekoostumus

- 10 Käytetään
kuvauksen mukaista vasta-ainetta tai sen fragmenttia 1,0 g
sorbitaanimonolauraattia 0,6 g
Polysorbate 20-valmistetta 0,6 g
15 ketostearyylialkoholia 1,2 g
glyseriiniä 6,0 g
metyylihydroksibentsoaattia 0,2 g
puhdistettua vettä B.P. q.s. 100,00 ml (B.P. = British Pharmacopeia)
20 Metyylihydroksibentsoaatti ja glyseriini liuotetaan 70 ml:aan vettä 75 °C:ssa. Sorbitaanimonolauraatti, Polysorbate 20-valmiste ja ketostearyylialkoholi sulatetaan yhdessä 75 °C:ssa ja lisätään vesiliuokseen. Saatu emulsio homogenisoidaan, sen annetaan jäähtyä jatkuvasti sekoittaen ja kuvauksen mukainen vasta-aine tai sen fragmentti lisätään suspensiona lopussa vedessä. Kokonaissuspensiota sekoitetaan kunnes se on homogeeninen.

Silmätippakoostumus

- Käytetään
30 kuvauksen mukaista vasta-ainetta tai sen fragmenttia 0,5 g
metyylihydroksibentsoaattia 0,01 g
propyylihydroksibentsoaattia 0,04 g
puhdistettua vettä B.P. 100,00 ml
35

Metyyli- ja propyylihydroksibentsoaatti liuotetaan 70 ml:aan puhdistettua vettä 75 °C:ssa ja saadun liuoksen annetaan jäähtyä. Kuvauksen mukainen vasta-aine tai sen fragmentti lisätään sitten ja liuos steriloidaan suodattamalla membraanisuodattimen läpi (huokoskoko 0,022 µm) ja pakataan aseptisesti sopiviin steriileihin säiliöihin.

Koostumus annettavaksi hengitysteitse

Aerosolisäiliötä varten, jonka kapasiteetti on 15 - 20 ml: sekoitetaan 10 mg keksinnön mukaista vastaainetta tai sen fragmenttia ja 0,2 - 0,5 % voiteluainetta, kuten Polysorbate 85-valmistetta tai öljyhappoa, ja tällainen seos dispergoidaan kantoaineeseen kuten freon, edullisesti 1,2-diklorotetrafluoroetaanin ja difluoroklorometaanin yhdistelmä, ja sijoitetaan tarkoituksenmukaiseen aerosolisäiliöön, joka soveltuu joko nenänsisäiseen antoon tai antoon suun kautta hengittäen.

Koostumus annettavaksi hengitysteitse

Aerosolisäiliötä varten, jonka kapasiteetti on 15 - 20 ml: 10 mg kuvauksen mukaista vastaainetta tai sen fragmenttia liuotetaan etanoliin (6 - 8 ml), lisätään 0,1 - 0,2 % voiteluainetta, kuten Polysorbate 85-valmistetta tai öljyhappoa; ja seos dispergoidaan kantoaineeseen kuten freon, edullisesti 1,2-diklorotetrafluoroetaanin ja difluoroklorometaanin yhdistelmä, ja pakataan tarkoituksenmukaiseen aerosolisäiliöön, joka soveltuu joko antoon nenänsisäisesti tai antoon suun kautta hengitysteitse.

Kuvauksen mukaiset vasta-aineet ja farmaseuttiset koostumukset ovat erityisen käyttökelpoisia antoon ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti, eli ihonalaisesti, lihaksensisäisesti tai laskimonsisäisesti. Ruoansulatuskanavan ulkopuoliseen antoon tarkoitettut koostumukset käsittävät tavallisesti kuvauksen mukaisen vasta-aineen tai sen fragmentin tai niiden koktailin liuoksen liuotettuna hyväksyttävään kantajaan, edullisesti vesikantajaan. Voi-

- daan käyttää erilaisia vesikantajia, esim. vettä, pusku-
roitua vettä, 0,4-%:ista suolaliuosta, 0,3-%:ista glysiini-
liuosta, ja muita vastaavia. Nämä liuokset ovat sterii-
lejä eivätkä yleensä sisällä hiukkasjakoista materiaalia.
- 5 Nämä liuokset voidaan steriloida tavanomaisilla, hyvin
tunnetuilla sterilointitekniikoilla. Koostumukset voivat
sisältää farmaseuttisesti hyväksyttäviä apuaineita, joita
tarvitaan fysiologisten olosuhteiden jäljittelemiseksi,
kuten pH-säätö- ja puskurointiaineet jne. Kuvauksen mu-
10 kaisen vasta-aineen tai sen fragmentin pitoisuus tällai-
sessa farmaseuttisessa koostumuksessa voi vaihdella laa-
jalti, eli alle noin 0,5 %:sta, tavallisesti 1 %:sta tai
ainakin noin 1 %:sta, jopa 15:een tai 20 paino-%:iin, ja
se valitaan pääasiassa nestetilavuuksien, viskositeettien
15 jne. perusteella valitun nimenomaisen antomuodon mukaan.

- Täten kuvauksen mukainen farmseuttinen koostumus
lihaksensisäiseksi ruiskeeksi voitaisiin valmistaa sisäl-
tämään 1 ml:n steriiliä, puskuroidua vettä ja 50 mg kek-
sinnön mukaista vasta-ainetta tai sen fragmenttia. Vas-
20 taavasti kuvauksen mukainen farmaseuttinen koostumus an-
nettavaksi laskimonsisäisellä nestesiirrolla voitaisiin
valmistaa sisältämään 250 ml steriiliä Ringerin liuosta ja
150 mg kuvauksen mukaista vasta-ainetta tai sen frag-
menttia. Varsinaiset menetelmät ruoansulatuskanavan ulko-
25 puolisesti annettavien koostumusten valmistamiseksi ovat
tuttuja tai ilmeisiä alan taitajille, ja niitä kuvataan
yksityiskohtaisemmin esimerkiksi käsikirjassa "Remington's
Pharmaceutical Science", 15. painos, Mack Publishing
Company, Easton, Pennsylvania, joka täten sisällytetään
30 viitteenä osaksi tätä hakemusta.

Kuvauksen mukaiset vasta-aineet (tai niiden frag-
mentit) voidaan kylmäkuivata varastointia varten ja re-
konstituoida sopivaan kantajaan ennen käyttöä. Tämän tek-
niikan on osoitettu olevan tehokas tavanomaisten immuuni-

globuliinien kanssa ja alalla tunnettuja kylmäkuivaus- ja rekonstituointitekniikoita voidaan käyttää.

Aiotusta tuloksesta riippuen kuvauksen mukaista farmaseuttista koostumusta voidaan antaa ennalta ehkäiseviin ja/tai terapeuttisiin hoitoihin. Terapeuttisessa käytössä koostumuksia annetaan jo sairaudesta kärsivälle potilaalle määrä, joka on riittävä parantamaan tai ainakin osittain pysäyttämään sairauden ja sen komplikaatiot. Ennalta ehkäisevissä käytöissä esillä olevia vasta-aineita tai niiden koktailin sisältäviä koostumuksia annetaan potilaalle, jolla ei vielä ole sairaustilaa, potilaan vastustuskyvyn parantamiseksi.

Farmaseuttisten koostumusten yksittäiset tai monikertaiset annot voidaan suorittaa käyttäen hoitavan lääkärin valitsemia annostasoja ja valitsemaa annoskuviota. Joka tapauksessa kuvauksen mukaisen farmaseuttisen koostumuksen tulisi tarjota sellainen määrä keksinnön mukaisia muutettuja vasta-aineita (tai niiden fragmentteja), joka on riittävä potilaan tehokkaaksi hoitamiseksi.

Huomattakoon myös, että tämän kuvauksen mukaisia vasta-aineita voidaan käyttää sellaisten joko peptidi- tai ei-peptidiyhdisteiden (jäljitelmien) suunnittelemiseksi ja rakentamiseksi, jotka olisivat käyttökelpoisia samassa terapiassa kuin vasta-aine. Katso esim. Saragovi et al., Science 253 (1991) 792 - 795.

Talletus

Kanta E. coli XLI Blue, anti-CD4 TCAE6 on talletettu ATCC-talletuslaitokseen, jossa se on saanut hakunumeron 69 030. Tämä talletus tehtiin 9. heinäkuuta 1992.

Hakijat ja heidän asiamiehensä tunnustavat vastuunsa korvata nämä viljelmät, jos ne kuolisivat ennen tämän perusteella myönnettävän patentin termiinin päättymistä, 5 vuoden kuluttua viljelmää koskevasta viimeisestä pyynnöstä, tai 30 vuoden kuluttua, kumpi tahansa on pitempi, ja velvollisuutensa ilmoittaa talletuslaitokseen

Muut suoritusmuodot kuuluvat oheisten patenttivaa-
timusten puitteisiin.

Muut suoritusmuodot kuuluvat oheisten patenttivaa-
timusten puitteisiin.

Sekvenssilista

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: ROLAND A. NEWMAN
NABIL HANNA
RONALD W. RAAB

(ii) TITLE OF INVENTION: CHIMERIC ANTIBODIES FOR HUMAN THERAPY

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 16

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Lyon & Lyon
(B) STREET: 611 West Sixth Street
(C) CITY: Los Angeles
(D) STATE: California
(E) COUNTRY: U.S.A.
(F) ZIP: 02111-2658

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: 3.5" Diskette, 1.44 Mb storage
(B) COMPUTER: IBM Compatible
(C) OPERATING SYSTEM: IBM P.C. DOS (Version 5.0)
(D) SOFTWARE: WordPerfect (Version 5.0)

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

Prior applications total,
including application
described below: 2

(A) APPLICATION NUMBER: 07/856,281
(B) FILING DATE: 23-MAR-1992

(A) APPLICATION NUMBER: 07/735,064
(B) FILING DATE: 25-JULY-1991

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Warburg, Richard J.
(B) REGISTRATION NUMBER: 32,327
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 198/158

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (213) 489-1600
(B) TELEFAX: (213) 955-0440

(C) TELEX:

67-3510

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 1:

CCATGGACTG GACCTGG

17

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 2:

ATGGACATAC TTTGTTCCAC

20

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 3:

CCATGGAGTT TGGGCTGAGC

20

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 4:

ATGAAACACC TGTGGTTCTT

20

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 5:

ATGGGGTCAA CCGCCATCCT

20

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 6:

ATGTCTGTCT CCTTCCTCAT

20

(8) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 16
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 7:

TTGGGGCGGA TGCACT

16

(9) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 8:

GATGGGCC TTGGTGGA

17

(10) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 9:

GATGACCCAG TCTCCAGCCTC
K

21

(11) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 10:

CTCACTTGCT GCACAGGGTCC
Y VR M

21

(12) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 11:

AAGACAGATG GTGCAGCCA

19

(13) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 12:

GGAACAGAGT GACCGAGGGG

20

(14) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 13:

ACTAAGTCGA CATGAAACAC CTGTGGTTCT T

31

(15) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 39
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 14:

ATCACAGATC TCTCACCATG ACCTGCTCCC CTCTCCTCC

39

(16) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 423
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 15:

GAC ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA	48
TGG GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG GCG GGC CCA GGA CTG GTG	96
AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC	144
ATC AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG	192
GGA CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT	240
TAC AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC	288
AAG AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG	336
GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA	384

TTA TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

423

(17) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 387
- (B) TYPE: NUCLEIC ACID
- (C) STRANDEDNESS: Single
- (D) TOPOLOGY: Linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION : SEQ ID NO: 16:

ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA	48
GAC TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG	96
TCC CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA	144
AGG AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG	192
CTG GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA	240
TTC TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG	288
GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT	336
ACT GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA	384
GGT	387

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kimeerisen vasta-aineen tuottamiseksi ihmisantigeenille, joka vasta-aine ei ole immunogeeninen
5 ihmisessä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

a) tuotetaan vanhan mantereen apinavasta-aine mainitulle antigeenille vanhan mantereen apinassa,

b) eristetään vanhan mantereen apinan nukleiini-
10 happo, joka koodittaa mainitun vanhan mantereen apinavasta-aineen vaihtuvan alueen antigeeniin sitoutuvaa aluetta,

c) hankitaan ihmisen tai simpanssin nukleiinihappo, joka koodittaa ihmisen tai simpanssin vasta-aineen säilyvää aluetta,

15 d) ligatoidaan mainittu vanhan mantereen apinan nukleiinihappo ja mainittu ihmisen tai simpanssin nukleiinihappo yhdistelmä-DNA-nukleiinihapon muodostamiseksi, ja

e) ilmnennetään mainittu yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo mainitun kimeerisen vasta-aineen tuottamiseksi.

20 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kimeerinen vasta-aine, joka mainitun vaihtuvan ja säilyvän alueen lisäksi käsittää kehysalueen, joka on ihmisen, simpanssin tai vanhan mantereen apinan kehysalue.

25 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan vasta-aine, jossa yksi mainittu vanhan mantereen apina on reesus-apina.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan vasta-aine, jossa
30 yksi mainittu vanhan mantereen apina on cynomolgus-apina.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan vasta-aine, jossa yksi mainittu vanhan mantereen apina on paviaani.

6. Jonkin edeltävän patenttivaatimuksen mukainen
35 menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti ihmisantigeeniin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti ihmisantigeeneihin, jotka valitaan seuraavista: CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn-antigeeni, IL-1, IL-8, ihmisen T-solureseptori, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, neuronkokeenituote, MDR-1, TGF α , TGF α -reseptori, PDGF ja CD71.

8. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan vasta-aine, jonka antigeeniin sitoutuva osa käsittää yhden tai useamman CDR-alueen vanhan mantereen apinan vaihtuvasta alueesta.

9. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan vasta-aine, jonka antigeeniin sitoutuva osa käsittää vanhan mantereen apinan vasta-aineen vaihtuvan alueen kokonaisuudessaan.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan kimeerinen vasta-aine, joka käsittää vanhan mantereen apinavasta-aineen vaihtuvan alueen antigeeniin sitoutuvan osan, ja ihmisvasta-aineen säilyvän alueen.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että antigeeniin sitoutuva osa käsittää yhden tai useamman CDR-alueen vanhan mantereen apinan vasta-aineen vaihtuvasta alueesta.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että antigeeniin sitoutuva osa käsittää vanhan mantereen apinan vasta-aineen vaihtuvan alueen kokonaisuudessaan.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mainittu ihmisen säilyvä alue valitaan siten, että sillä on haluttu isotyyppi.

14. Jonkin patenttivaatimuksen 10-13 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että antigeeni valitaan seuraavista: CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn-

antigeeni, IL-1, IL-8, ihmisen T-solureseptori, CD3, CD28, CD8, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD5a, CD45, ne-
onkogeenituote, MDR-1, TGF α , TGF α -reseptori, PDGF ja CD71.

15 15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kimeerinen vas-
ta-aine, joka käsittää

(1) ihmisvasta-aineen raskaan ketjun säilyvän alueen,

(2) mainitun ihmisvasta-aineen kevyen ketjun säi-
lyvän alueen,

10 (3) ihmisantigeenin vastaisen vanhan mantereen
apinavasta-aineen raskaan ketjun vaihtuvan alueen, ja

(4) mainitun vanhan mantereen apinavasta-aineen
kevyen ketjun vaihtuvan alueen.

15 16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että vaihe b) käsittää lisäksi
vanhan mantereen apinan vasta-ainegeenin vaihtuvan alueen
eristämisen menetelmällä joka käsittää seuraavat vaiheet:

20 RNA:ta vanhan mantereen apinasta saatetaan koske-
tuksiin käänteiskopioijaentsyymin kanssa cDNA:n muodosta-
miseksi,

mainittu cDNA saatetaan kosketuksiin alukkeen
kanssa, joka on komplementaarinen cDNA:han nähden kohdas-
sa, joka koodittaa mainitun vasta-ainegeenin 5'-johto-
sekvenssiä, hybridikompleksin muodostamiseksi, ja

25 monistetaan mainittua nukleiinihappoa mainitus-
hybridikompleksissa monistetun nukleiinihapon tuottamiseksi,

ja eristetään nukleiinihapposekvenssi, joka koodaa
vanhan mantereen apinan vasta-ainegeenin vaihtuvan alueen.

30 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että mainittu nukleiinihappo on
DNA tai cDNA.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että monistamisvaihe tuottaa riit-
tävästi nukleiinihappoa vektoriin sijoitettavaksi.

35 19. Yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo, t u n n e t t u
siitä, että se koodittaa kimeeristä vasta-ainetta, ja kä-

sittää (i) nukleiinihapposekvenssin tai -sekvenssejä, jotka koodaavat vanhan mantereen apinan immunoglobuliinin vaihtuvan alueen antigeeniin sitoutuvan alueen ja (ii) nukleiinihapposekvenssin tai -sekvenssejä, jotka koodaavat
5 ihmisen tai simpanssin immunoglobuliinin säilyvän alueen.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että antigeeniin sitoutuva osa käsittää vanhan mantereen apinan vasta-
aaineen vaihtuvan alueen kokonaisuudessaan.

10 21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että antigeeniin sitoutuva osa käsittää yhden tai useamman CDR-alueen vanhan mantereen apinan vaihtuvasta alueesta.

22. Patenttivaatimuksen 19 yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että mainittu vanhan mantereen apina valitaan ryhmästä, jonka muodostavat pavi-
15 aani-, reesus- ja cynomolgus-apat.

23. Patenttivaatimuksen 19 mukainen yhdistelmä-DNA-nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että se käsittää
20 DNA-sekvenssit, joilla on tunnusnumerot 15 ja 16.

8
9
3
8
9
2
4
4
4

Patentkrav

1. Förfarande för produktion av en chimär antikropp mot en human antigen, vilken antikropp inte är immu-
5 nogen i människan, kännetecknat av att det omfattar följande steg:

a) man producerar en antikropp av en apa från gamla världen mot nämnda antikropp i en apa från gamla världen,

b) isolerar en nukleinsyra av en apa från gamla
10 världen, vilken kodar en antigenbindande region av en variabel region av nämnda antikropp av en apa från gamla världen,

c) tillhandahåller en nukleinsyra från mänska eller schimpans, vilken kodar en konstant region en anti-
15 kropp av mänska eller schimpans,

d) sammankopplar nämnda nukleinsyra av en apa från gamla världen med nämnda nukleinsyra av mänska eller schimpans för att bilda en rekombinant nukleinsyra, och

e) uttrycker nämnda rekombinanta nukleinsyra att
20 producera nämnda chimära antikropp.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att man framställer en chimär antikropp som förutom nämnda variabla och konstanta region dessutom innehåller en ramregion, vilken är en ramregion av mänska,
25 schimpans eller en apa från gamla världen.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknat av att man framställer en antikropp där en nämnd apa från gamla världen är en rhesusapa.

4. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknat av att man framställer en antikropp där en
30 nämnd apa från gamla världen är en cynomolgusapa.

5. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknat av att man framställer en antikropp där en nämnd apa från gamla världen är en babian.

6. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, kännetecknat av att man framställer en antikropp som binds specifikt vid en human antigen.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, kännetecknat av att man framställer en antikropp som binds specifikt vid en human antigen vald bland följande: CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn-antigen, IL-1, IL-8, human T-cellreseptor, CD3, CD28, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD5a, CD11c, CD45, neu-onkogenprodukt, MDR-1, TGF α , TGF α -reseptor, PDGF och CD71.

8. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknat av att man framställer en antikropp vars antigenbindande del omfattar en eller flera CDR-regioner av en variabel region av en apa från gamla världen.

9. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknat av att man framställer en antikropp där nämnda antigenbindande del omfattar hela den variabla regionen av en antikropp av en apa från gamla världen.

10. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att man producerar en chimär antikropp som omfattar en antigenbindande del av en variabel region av nämnda antikropp av en apa från gamla världen, och en human konstant region av en human antikropp.

11. Förfarande enligt patentkrav 10, kännetecknat av att den antigenbindande delen omfattar en eller flera CDR-regioner av en variabel region av en apa från gamla världen.

12. Förfarande enligt patentkrav 10, kännetecknat av att den antigenbindanden delen omfattar hela den variabla regionen av en antikropp av en apa från gamla världen.

13. Förfarande enligt patentkrav 10, kännetecknat av att nämnda humana konstanta region väljs så att den har önskad isotyp.

14. Förfarande enligt något av patentkraven 10 - 13, kännetecknat av att antigenen väljs bland följande: CD58, VCAM, VLA4, CD2, LFA3, ELAM, LAM, CD25, CD4, CD19, CD20, CD23, CD41, CD44, CD54, TNF α , TNF β , Tn-
5 antigen, IL-1, IL-8, human T-cellreseptor, CD3, CD28, CD8, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD5a, CD45, neu-onkogenprodukt, MDR-1, TGF α , TGF α -reseptor, PDGF och CD71.

15. Förfarande enligt patentkrav 10, kännetecknat av att man framställer en chimär antikropp,
10 som omfattar

(1) en konstant region av en tung kedja av en human antikropp,

(2) en konstant region av en lätt kedja av nämnda humana antikropp,

15 (3) en variabel region av en tung kedja av en antikropp av en apa från gamla världen mot en human antigen, och

(4) en variabel region av en lätt kedja av nämnda antikropp av en apa från gamla världen.

20 16. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att steg b) ytterligare omfattar att man isolerar den variabla regionen av en antikroppgen av en apa från gamla världen med ett förfarande som omfattar följande steg:

25 man bringar RNA från en apa från gamla världen i kontakt med reverserat transkriptas för att bilda cDNA,

bringar nämnda cDNA i kontakt med en primer som är komplementär med cDNA:t i en region som kodar en 5' ledarsekvens av nämnda antikroppgen för att bilda ett hybrid-

30 komplex, och

amplifierar nämnda nukleinsyra i nämnda hybridkomplex för att producera amplifierad nukleinsyra, och

isolerar nukleinsyrasekvensen som kodar den variabla regionen av antikroppgenen av en apa från gamla världen.

35 den.

17. Förfarande enligt patentkrav 16, kännetecknat av att nämnda nukleinsyra är DNA eller cDNA.

18. Förfarande enligt patentkrav 16, kännetecknat av att amplifieringssteget producerar till-
5 räckligt med nukleinsyra för att införas i en vektor.

19. Rekombinant nukleinsyra, kännetecknad av att den kodar en chimär antikropp som innehåller (i) en nukleinsyrasekvens eller -sekvenser som kodar en antigenbindande region av en variabel region av immunoglobulin av
10 en apa av gamla världen och (ii) en nukleinsyrasekvens eller -sekvenser som kodar en konstant region av immunoglobulin av mänska eller schimpans.

20. Rekombinant nukleinsyra enligt patentkrav 19, kännetecknad av att den antigenbindande delen omfattar
15 hela den variabla regionen av antikroppen av en apa från gamla världen.

21. Rekombinant nukleinsyra enligt patentkrav 19, kännetecknad av att den antigenbindande delen omfattar en eller flera CDR-regioner av en variabel region av
20 en apa från gamla världen.

22. Rekombinant nukleinsyra enligt patentkrav 19, kännetecknad av att nämnda apa från gamla världen väljs ur gruppen, som består av babianer, rhesus- och cynomolgusapor.

25 23. Rekombinant nukleinsyra enligt patentkrav 19, kännetecknad av att den omfattar DNA-sekvenserna som har identifikationsnummer 15 och 16.

FIG. 1.

-20 -19 -18 -17 -16 -15 -14 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1

[illegible]

VH1		ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	AGG	GTC	TTC	TGC	... TTG	CTG	GCT	GTA	GCA	CCA	GGT	GCC	CAC	TCC
"		ATG	GAC	TGG	ACC	TGG	...	ATC	CTC	TTC	... TTG	GTG	GCA	GCA	GCC	ACG	CGA	GTC	CAC	TCC
VH2		ATG	GAC	ATA	CTT	TGT	TCC	ACG	CTC	CTG	... CTA	CTG	ACT	GTC	CCG	TCC	TGG	GTC	TTA	TCC
VH3		ATG	GAG	TTT	GGG	CTG	AGC	TGG	CTT	TTT	... CTT	GTG	GCT	ATT	TTA	AAA	GGT	GTC	CAG	TGT
"		ATG	GAG	TTT	GGG	CTG	AGC	TGG	GTT	TTC	... CTT	GTT	GCT	ATT	TTA	AAA	GGT	GTC	CAG	TGT
"		ATG	GAG	CTT	GGG	CTG	ACC	TGG	GTT	TTC	... CTT	GTT	GCT	CTT	TTA	AAA	GGT	GTC	CAG	TGT
"		ATG	GAG	CTT	GGG	CTG	ACC	TGG	GTT	TTC	... CTT	GTT	GCT	CTT	TTA	AAA	GGT	GTC	CAG	TGT
VH4		ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	CTC	CTC	CTC	TGG TGT	CAG	CTC	CCA	GAT	GTG	AGG	GTC	CTG	TCC
"		ATG	AAA	CA.	CTG	TGG	TTC	TTC	CTT	CTC	... CTG	GTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC

Alleviivattu = alukesekvenssi

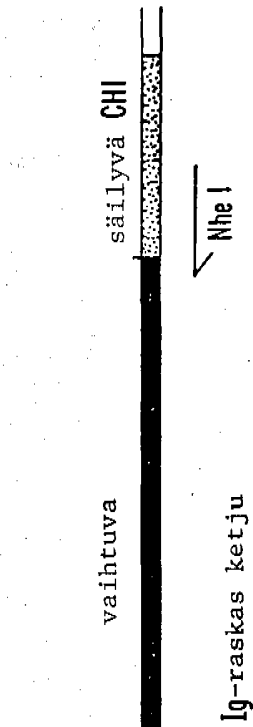


FIG. 2a.

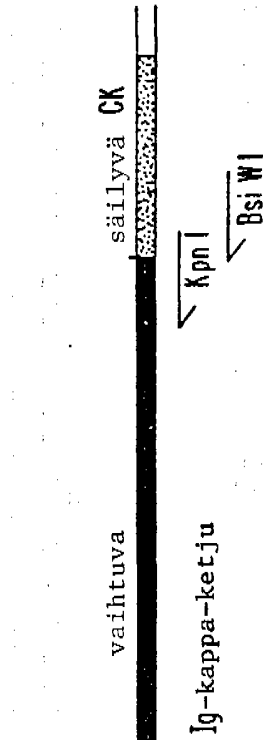


FIG. 2b.

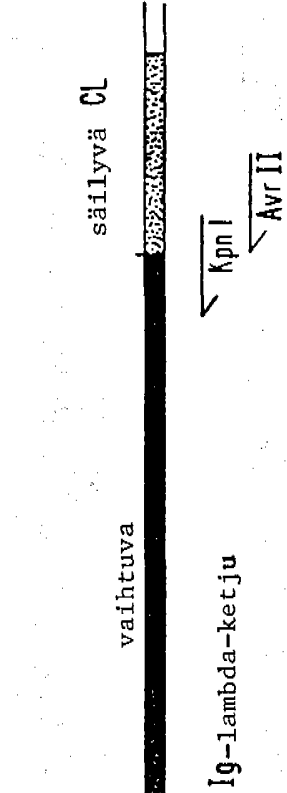


FIG. 2c.

3/25

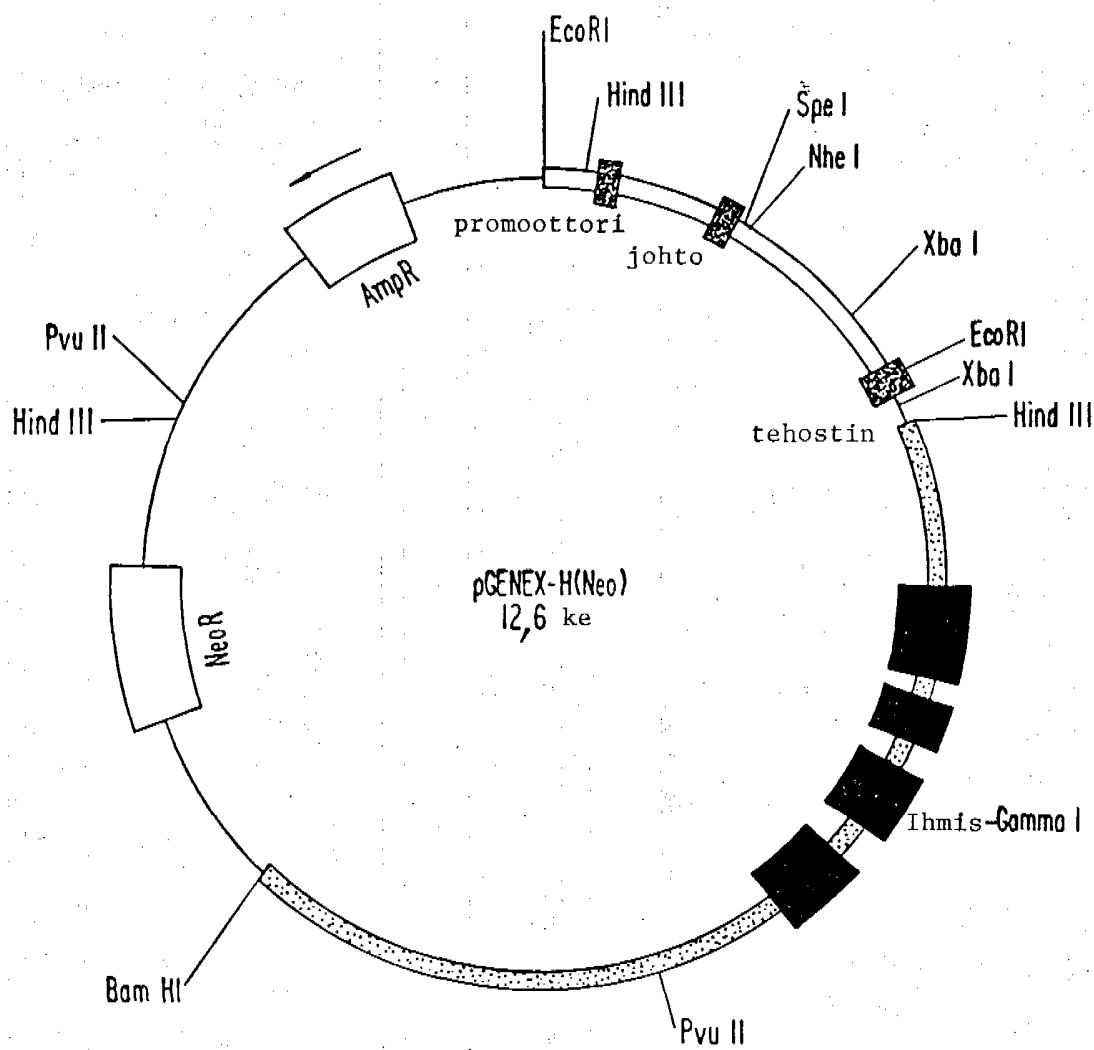


FIG. 3.

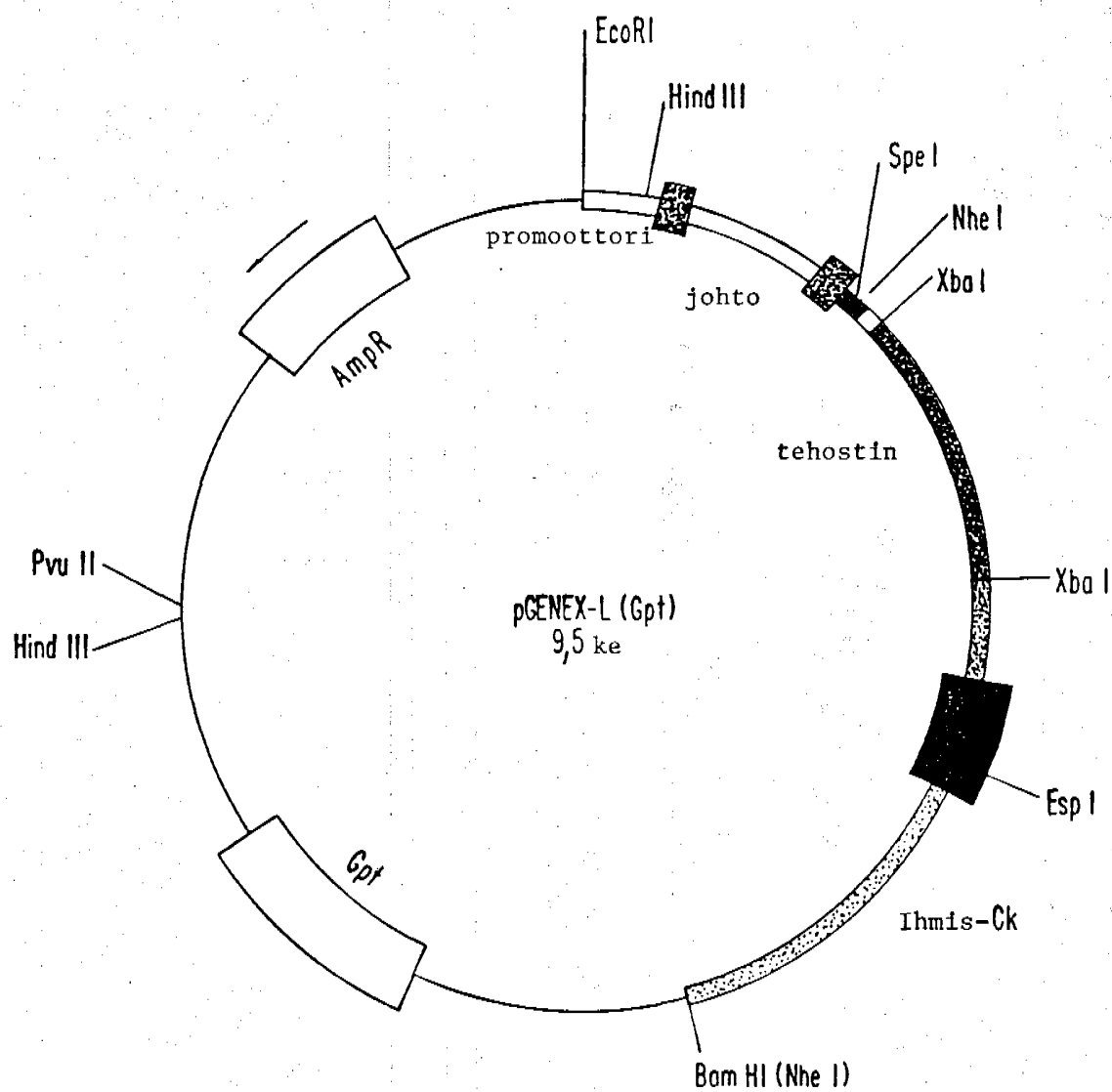
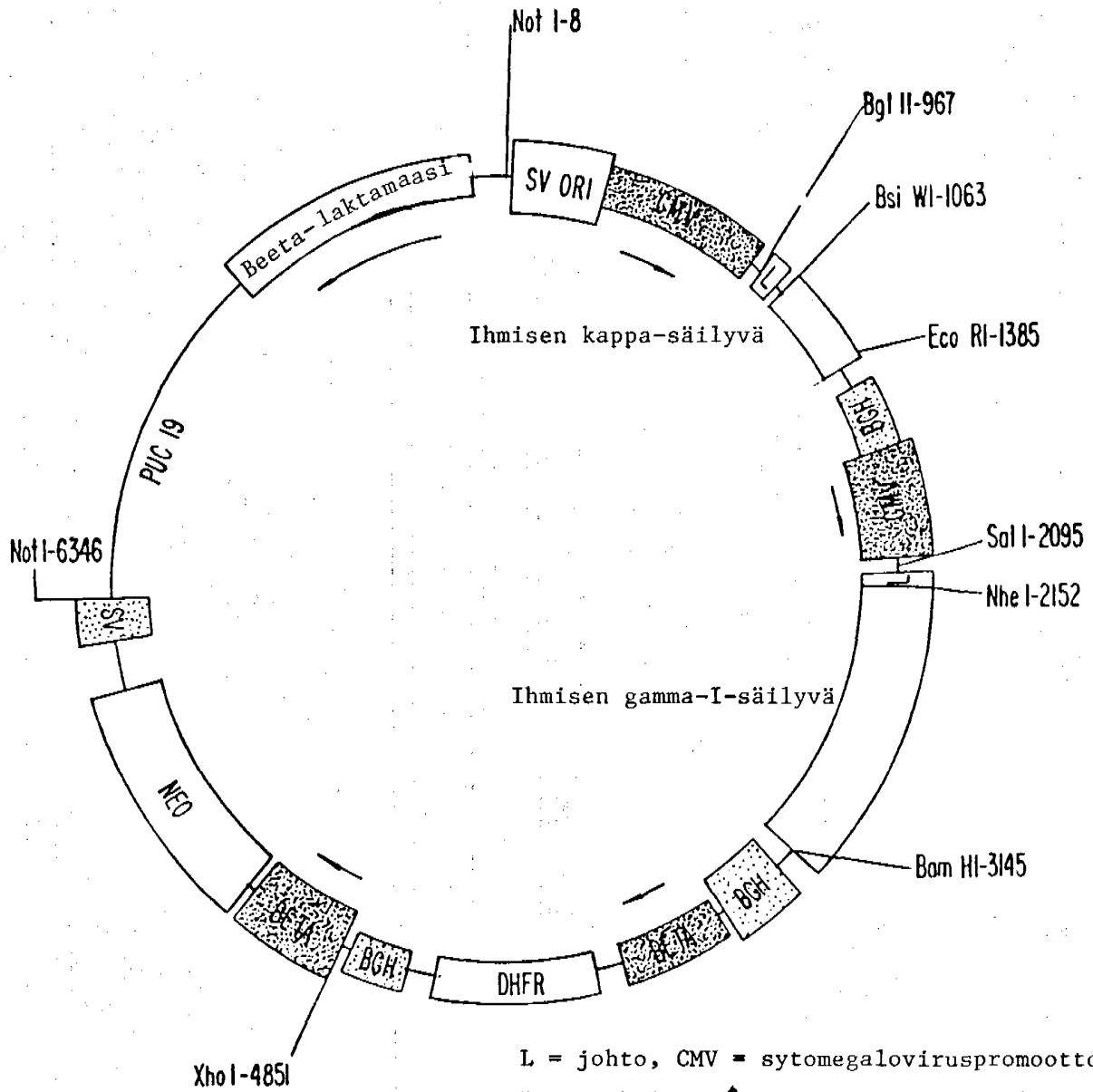


FIG. 4.

FIG. 5.



L = johto, CMV = sytomegaloviruspromoottori

Beeta = hiiren β -globiinin pääasiallinen promoottori

Bgh = naudan kasvuhormonipolyadenylaatio

Sv = Sv40-varhaispolyadenylaatio

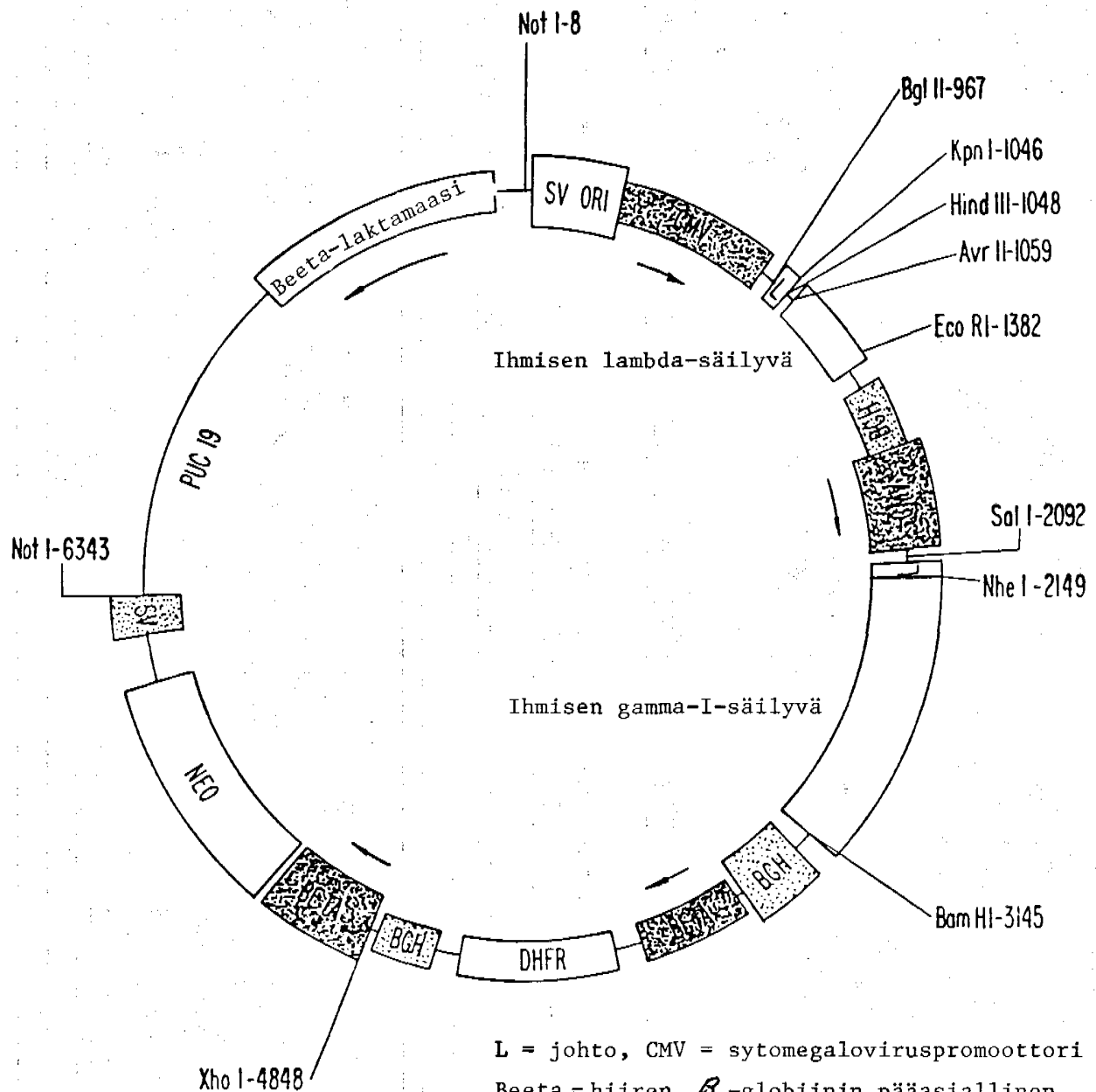
Sv ori = Sv40-alkukohta

TCAE 5.2

Sisältää ihmisen IgG1- ja kappasäilyviä alueita

6/25

FIG. 6.



L = johto, CMV = sytomegaloviruspromoottori
 Beeta = hiiren β -globiinin pääasiallinen
 promoottori

BGH = naudan kasvuhormonipolyadenylaatio

Sv = Sv40-varhaispolyadenylaatio

Sv ori = Sv40-alkukohta

TCAE 6

Sisältää ihmisen IgG1- ja lambda-säilyviä alueita

Alukkeita apinaimmunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtuvien alueiden monistamiseksi

5'-sense-alukkeita

A. Ihmisen tai apinan raskaan ketjun varhaisjohtosekvenssialukkeita, joissa on Sal I -kohta

- V_H1 5' ACTAAGTCGACATGGACTGGACCTGG 3'
- V_H2 5' ACTAAGTCGACATGGACATACTTTGTTCCAC 3'
- V_H3 5' ACTAAGTCGACATGGAGTTTGGGCTGAGC 3'
- V_H4 5' ACTAAGTCGACATGAAACACCTGTGGTTCTT 3'
- V_H5 5' ACTAAGTCGACATGGGGTCAACCGCCATCCT 3'
- V_H6 5' ACTAAGTCGACATGTCTGTCTCCTTCCTCAT 3'

B. Ihmisen tai apinan raskaan ketjun myöhäisjohtosekvenssialukkeita, joissa on Mlu I -kohta

- V_H1 5' G GCA GCA GC(CT) ACG CGT GCC CAC TCC GAG GT 3' ⁺¹
- V_H2 5' G ACC GTC CCG ACG CGT GT(TC) TTG TCC CAG GT 3' ⁺¹
- V_H3 5' GCT ATT TTC ACG CGT GTC CAG TGT GAG 3' ⁺¹
- V_H4 5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3' ⁺¹
- V_H5 5' G GCT GTT CTC ACG CGT GTC TGT GCC GAG GT 3' ⁺¹

FIG. 7a.

C. Ihmisen tai apinan kehys-1-sekvenssialukkeita, joissa on Xho I -kohta

$\begin{array}{lcl} & +1 & \\ V_{H1,3a,5} & CAGGTGCAGCTG & \underline{CTCGAGTCTGG} \\ & +1 & \\ V_{H2} & CAGGTCAACTTAC & \underline{TCGAGTCTGG} \\ & +1 & \\ V_{H3b} & GAGGTGCAGCTG & \underline{CTCGAGTCTGG} \\ & +1 & \\ V_{H4} & CAGGTGCAGCTG & \underline{CTCGAGTCTGGG} \\ & +1 & \\ V_{H6} & CAGGTACAGCTG & \underline{CTCGAGTCTCAGG} \end{array}$

3'-anti-sense-alukkeita

A. Ihmisen tai apinan raskaan ketjun säilyvä alue-alukkeen anti-sense-säie,
jossa on Nhe I -kohta

$\begin{array}{lcl} & +118 & +110 \\ IgG_{1-4} & 5' GGC GGA TGC & \underline{GCTAGCTGA} GGA GAC GG 3' \\ & & \text{Nhe I} \end{array}$

FIG. 7a'

Alukkeita apinaimmunoglobuliinin kevyen ketjun vaihtuvien alueiden monistamiseksi

5-sense-alukkeita

A. Ihmisen tai apinan kappa-kevyt ketju-varhaisjohtoalukkeita, joissa on Bgl II-kohta

1. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGTGTTCAGACCCAGGTC 3'
2. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGG(GA)G(AT)CCCC(TA)GC(TG)CAGCT 3'
3. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG 3'
4. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGACAC(GAC)AGGGCCCCCACTCAG 3'

B. Ihmisen tai apinan lambda-kevyt ketju-varhaisjohtoalukkeita, joissa on Bgl II -kohta

1. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCC 3'
2. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGGCTCCACTACTTC 3'
3. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGACCTGCTCCCCTCTCCTCC 3'
4. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGGCCTGGACTCCTCTCTTTC 3'
5. 5'ATCACAGATCTCTCACCATGACTTGGACCCCACTCCTC 3'

FIG. 7b.

FIG. 7b'

11/25

A. Raskaan ketjun vaihtuva alue:

VH1	5'	CCATGGACTGGACCTGG 3'
VH2	5'	ATGGACATACTTTGTTCCAC 3'
VH3	5'	CCATGGAGTTTGGGCTGAGC 3'
VH4	5'	ATGAAACACCTGTGGTTCTT 3'
VH5	5'	ATGGGGTCAACCGCCATCCT 3'
VH6	5'	ATGTCTGTCTCCTTCCTCAT 3'

B. Raskaan ketjun säilyvän alueen anti-sense-säie:

IgM	5'	⁺¹¹⁹ T TGG GGC GGA TGC ACT ⁺¹¹⁵ 3'
IgG ₁₋₄	5'	⁺¹¹⁹ GA TGG GCC CTT GGT GGA ⁺¹¹⁵ 3'

C. Kevyen ketjun vaihtuva alue:

Kappa	5'	⁺⁴ G ATG ACC CAG TCT CCA (G/T)CC TC ⁺¹⁰ 3'
Lambda	5'	⁻⁹ CTC A(C/T)T (T/C)(G/A)C TGC (A/C)CA GGG TCC ⁻³ 3'

D. Kevyen ketjun säilyvän alueen anti-sense-säikeet:

Kappa	5'	⁺¹¹⁵ AA GAC AGA TGG TGC AGC CA ⁺¹¹⁰ 3'
Lambda	5'	⁺¹¹⁸ G GAA CAG AGT GAC CGA GGG G ⁺¹¹² 3'

FIG. 8.

117703

12/25

Ihmisen konsensus-VH1-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin vaihtuviin alueisiin

	S					Q	
	A	KL	G			R	M
Q	E	RI	T			K	V
XVQLVQSGAEVKKPGXSVXVSC	KASGYTFS	<u>DYXIH</u>	WVRQAPGXGLEWXG				
-----	FN-G	<u>NYAIS</u>	-----				
---Q-----	T-----	<u>SYXIN</u>	-----V---S-				

		T	
	M	P	
	V	R	S TS
	I	LKA	FT
<u>XINPSXGXTNYAPXFOG</u>	RVTXTDXSXNTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	
<u>WINTDTGNPTYAOGFKE</u>	---F-M-----	KI-L K-----	
<u>WINPSNGNTGYAOKFOG</u>	-----	N-----	

	V		Homologia
	G		
<u>XYGFYSNDYXXXXXYTXDY</u>	WGQGT LVT VSS	Ihmis-VH1-konsensus	
<u>VVGTTYAEYFEF</u>	----A-----	Apinaklooni 1 - 2	88 %
<u>MYSWKGT</u>	FDY -----	Apinaklooni 1 - 14	94 %

FIG. 9a.

Ihmisen konsensus-VH3-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin vaihtuviin alueisiin

	I	S	N		G
	A	V	S		S
					A
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	<u>DYAMH</u>	WVRQAPGKGLEWVX			
-----E-----F-----	<u>TYDMT</u>	-----			
-----	<u>EYSIH</u>	-----Q-----R-----			
-----	<u>SYDMN</u>	-----			
-----S-----	<u>NYNMD</u>	-----S-----			

		MV	S	KT	
	NA	SAF	D	EP	L F T
<u>HIEEKXNGSATYYADSVKG</u>	RFTISRDDSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR			
<u>RISW NSGTIYYASSVKG</u>	-----R-----				
<u>LAGKKADRYKTEYATAVKG</u>	-----S-----T-----				
<u>YLSS ASGYIYYADSVKG</u>	-----F-----S-----				
<u>RVIRK GARTKYAASVKG</u>	-----				

Homologia

<u>DPEVESLXXXEXXXFEEDS</u>	WGQGT	LVTVSS	Ihmis-VH3-konsensus
<u>GTALCSDSGCSS</u>	<u>DV</u>	-----	Apinaklooni 3 - 34 96 %
<u>PVLGDRWF</u>	<u>FDL</u>	-----PI-----	Apinaklooni 3 - 36 93 %
<u>GPVLQFLEWLLPTTGSDV</u>	--P-V-----		Apinaklooni 3 - 40 95 %
<u>DVAAAGT</u>	G---V-----		Apinaklooni 3 - 9 95 %

FIG. 9c.

Ihmisen konsensus-VH4-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin vaihtuviin alueisiin

	T	Y	V		S	R
QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGGSIS				<u>SSYYWS</u>	WIRQPPGKGLEWIG	
-M-----				<u>SSYDWT</u>	-----M-----A	
-----				<u>SGYYWG</u>	----T-----	
--H-----S-----				<u>SSGYYWG</u>	-----	
-----				<u>GYWYG</u>	----T-----	
-----A-----S-----				<u>GDYYWF</u>	-----	

	M	P	KK	H	Y	N
<u>YIYY</u> <u>SGSTYYNPSL</u>	KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR					
<u>VLSGN</u> <u>SGSADYNPSL</u>	-N-----N-----MT-----I-----					
<u>SLOGR</u> <u>GGNKYLNLCI</u>	-----L-A-----					
<u>SIHGS</u> <u>GGSNSLNPSL</u>	-----L-----G-K-----F---					
<u>SLOGR</u> <u>GGNKYLNLSL</u>	-----L-A-----					
<u>YIYGS</u> <u>GGGTNYNPSL</u>	NN--S--I-----L-----R-----S					

Homologia

.....		Ihmis-VH4-konsensus
<u>GDVTSGWYRGY</u>	<u>FDS</u>	WGQGCLVTVSSG
<u>VGDNR</u>	<u>EDV</u>	WGPGVLVTVSSG
<u>ELYSSSPY</u>	<u>YEDF</u>	WGQGV RVTVSSG
<u>GDNR</u>	<u>EDV</u>	WGPGVLVTVSS
<u>NILKYLHWLLY</u>		WGQGV LVTVSS

Apinaklooni 4 - 13	90 %
Apinaklooni 4 - 14	96 %
Apinaklooni 4 - 16	92 %
Apinaklooni SC CHIM	96 %
Apina-anti-CD4 CHIM	88 %

FIG. 9d.

117703

16/25

Ihmisen konsensus-VH5-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin vaihtu-
viin alueisiin

R

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSF	<u>TSYWIG</u>	WVRQMPGKGLEW
-----G---R-----R-----TC-F--	<u>TGFWIS</u>	----V--Q----

MGILYPGDS DTRYSPSFOGH VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICAR..
VGRVSPGDSITRYNPSFOGH -----T-TF---N-----Q

Homologia

.....
RAGNGNYIOD

....
FYY WGHGVLVTVSSG

Ihmis-VH5-konsensus
Apinaklooni 5 - 11 84 %

FIG. 9e.

17/25

Ihmisen konsensus-VK1-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin vaihtuviin alueisiin

V

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>RASQSVXXSD</u>	<u>DISSYLN</u>	WYQQKP
DIQMTQSPAS-----K-----	<u>RASQ</u>	<u>SFSSSLA</u>	-----
DIQMTQSPAS-----	<u>OASQ</u>	<u>SVSNLLA</u>	-----
DIQMTQSPAS-----V--	<u>RASQ</u>	<u>GINOELS</u>	-----
DIQMTQSPAS-----	<u>RASQ</u>	<u>GISSYLN</u>	-----

R

G

I

GKAPKLLIY	<u>XASSLES</u>	GVPSRFGSGSGTDFTLT	ISSLPEDFATYYC
-----D	<u>SASSLOS</u>	-----K-----	-----S---
-----P---	<u>KASSLES</u>	-----TR-----	-----N--E-----F-
-----T---	<u>AASSLOT</u>	-----S--PE--	V--ED-
-----L			

Homologia

<u>OOYNSLPXXYD</u>	<u>YT</u>	FGQGTKVEIK	Ihmis-VK1-konsensus
<u>OOYYSYPR</u>	<u>LT</u>	-----	Apinaklooni KI-7 94 %
<u>OOGNSYP</u>	<u>LT</u>	--G-----	Apinaklooni KI-3 90 %
<u>LODYMSR</u>	<u>WT</u>	-----	Apinaklooni KI-14 90 %

FIG. 9f.

Ihmisen konsensus-VKII-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin
vaihtuviin alueisiin

R

DIVMTQSP^LSLPVT^PGPAS^ISC RSSOSLVHSNGNTYLN WYLQKP
 DIVMTQSPAS----L-G----- TSTOSLLSGNGXSYLN -----
 -LA-P---A--A-----Q----- RASESV SFFGVNLIH -----

GQSPQLLIY KVSNRES GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
 ----H---- YDSYRAS ---T-----
 --P----- QASNKDT ---A-----FNP---D-A-D---

V
L R

MOALOSP YT FGQGTKNEIK
MOTLOSP FT --P----D--
LOSKNSPR T --G-----

Homologia
 Ihmis-VK2-konsensus
 Apinaklooni K2-8 91 %
 Apina SC CHIM 81 %

FIG. 9g

117703

19/25

Ihmisen konsensus-lambda-VIII-sekvenssin vertaaminen apinan kloonattuihin vaihtuviin alueisiin

S

SYELTQPPSVSVSPGQTARITC SGDALGOKYVY WYQOKP
 ----S--R-----GF-- GGDNVGRKSVO -----

M
T G
AQ E

N

GQAPVLVIY EDSKRPS GIPERFSGSNSGTTATLTISGVEAXDEADYYC
 P----- ADSERPS ---A-----

QAWDSXTXXVV FGGGTKLTVLG Ihmis- λ -III-konsensus
QVWDSTADHWV -----R----- Apina-anti-CD4 91 %

FIG. 9h.

8034

FIG. 10.

Ihmisen VH3-konsensussekvenssin vertaaminen neljään apina-VH3-sekvenssiin ja kahdeksaan ihmis-VH3-sekvenssiin

I	S V	G S A
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVX
Q-----V-----R-----	SYGMH	-----
Q-----V-G--R-----S--	SYGMH	----C-----
Q-----V--SR-----	SYAMH	---G-----
---L-----V--N--	SCTMT	-----
-----R-----N-G	DYSMT	-----
-----R-----	SYAMS	-----
--R-----D-E-----V-EV--I--	KAWMN	-----Q---
-M-----AF-----K-----N--	DSTIH	-----S--S----
-----	SYDMN	-----
-----A-----S--V-----	NYNMD	----S-----
---E-----F-----	TYDMT	-----
-----S--	EYSIH	-----Q---R--
X-T-R---PX--K-TET-T-T-TV---SL-	TXGMXVG	-I--P---X---L-

	MV	S	KT
	NA	SAF	D EP L F T
HIEEKXNGSATYYADSVKG	RFTISRDDSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	
VIS YDGSNEYFADSVKG	-----N---	MG-----	
VIS DDGSNKYYADSVKG	-----K---	-----D-----K	
VIS YDGSNKYYADSVKG	-----S---	-----	
TIS ASGYATYYADSVKG	-I-----	-----A-----N	
SIRSKDYGGTTEYAASVKG	-----SI-----	-----S-	
AISG SGGSTYYADSVKG	-----	-----K	
QIKNKVDGGTIDYAAPVKG	--I-----S-----	KI-----VG	
HIENTKKNYATIYRASVKG	-----AF--D--PD--L--P		
YIS SASGYIYYADSVKG	-----FA--S-S--S-----		
RVI RKGARTKYAASVKG	-----S--KT-----		
RIS WNSGTIYYASSVKG	-----R-----		
LAGKKADRYKTEYATAVKG	-----S-----T-----		
RIN XWDDDKYYSTSLRS	-L---K-T---QVV-XXXXDPX---	T-----	

DPEVESLXXXFXYYX	FFDS	WGQGTlVTVSS
DRVAVYASVFFID	SFDI	-----G--
GVYCSSSSCYSYHHYMDV	--K--T--	
GRFCSGQSCYSYHHYMDV	-K--T-----	
NISETL	DS	-----
NNTSPY	FDY	--E-----
GQVLYYGSYSYHW	FDP	-----
NYTGTV	DY	-----
PPEVESLRS		--R-----
GQPVLFLEWLLPTTGS	DV	--P-V-----
DVAAAGT		G--V-----
GTALCSDSGCSS	DV	-----
PVLGDRWFF	DL	-----PI-I--
RXPXXXXGXGXYXXA	FDV	-----T-----

ihmis-VH3

RF TS2	92%
RF SJ1	87%
RF SJ2	91%
BE	93%
CHERRI	92%
18/2	98%
K6H6	84%
1B11	83%
apina nro 40	92%
apina nro 9	90%
apina nro 34	95%
apina nro 36	91%
ihmis-VH2	60%

FIG. 11.

Kimeerisen anti-CD4:n suora sitoutuminen CD4-positiivisiin SUP TI-soluihin

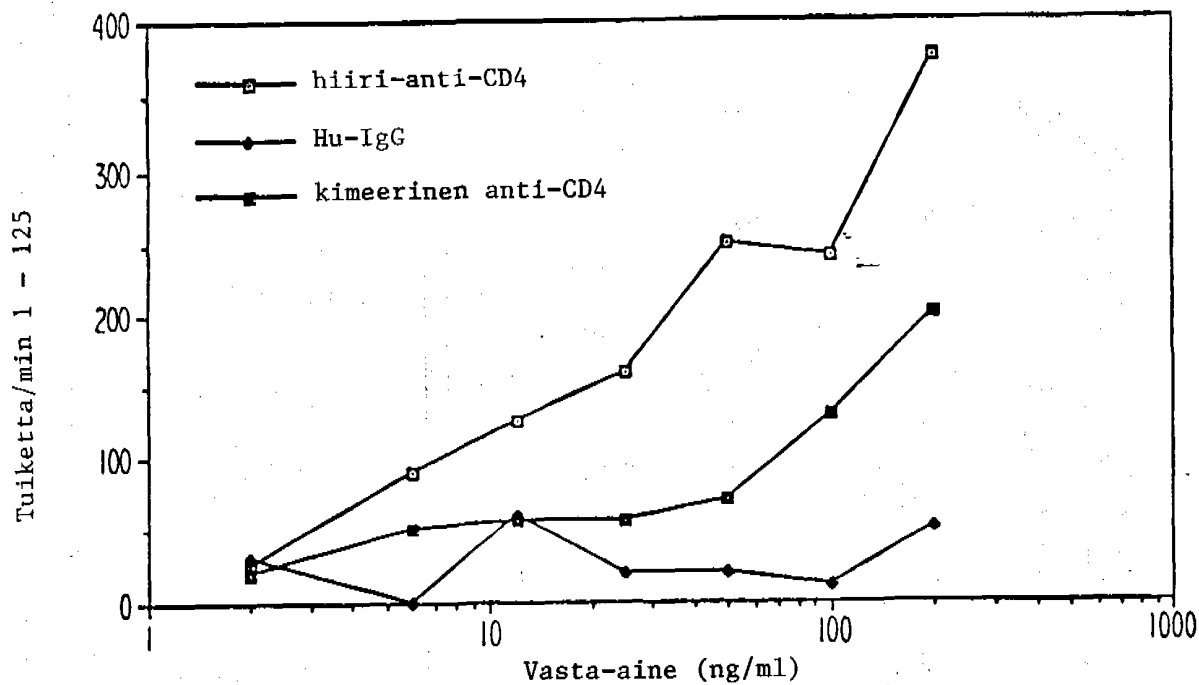


FIG. 12.

1F3:n sitoutumisen CD4-positiivisiin soluihin inhibitio apina- ja kimeerisillä apina/ihmisvasta-aineilla

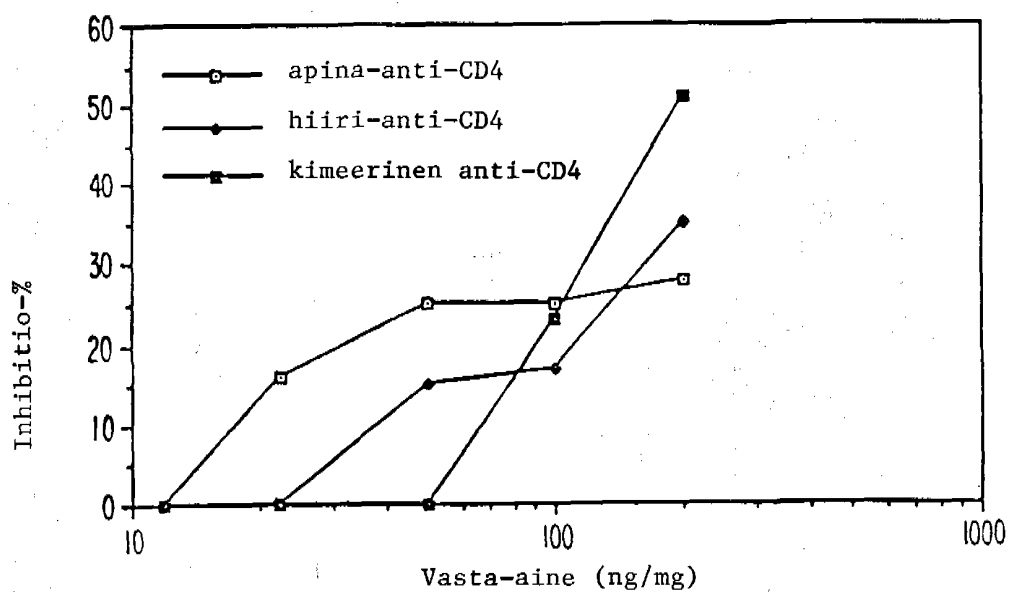


FIG. 13.

Apinan anti-CD4-V_H-sekvenssi, emäsparit 1 - 420; translaatio johtosekvenssin metioniini-ATG:stä (ep 4) ep:hen 420; proteiinisekvenssi on numeroitu vasta-ainekehystähteestä +1 viimeiseen V_H-tähteeseen +120.

M K H L W F F L L L V A A P R
GAC ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCC CCC AGA

+1 10
W V L S Q V Q L Q E A G P G L V
TGG GTC TTG TCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG GCG GGC CCA GGA CTG GTG

20
K P S E T L S L T C S V S G G S
AAG CCT TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC AGT GTC TCT GGT GGC TCC

30 40
I S G D Y Y W F W I R Q S P G K
ATC AGC GGT GAC TAT TAT TGG TTC TGG ATC CGC CAG TCC CCA GGG AAG

50 60
G L E W I G Y I Y G S G G G T N
GGA CTG GAG TGG ATC GGC TAC ATC TAT GGC AGT GGT GGG GGC ACC AAT

70
Y N P S L N N R V S I S I D T S
TAC AAT CCC TCC CTC AAC AAT CGA GTC TCC ATT TCA ATA GAC ACG TCC

80 90
K N L F S L K L R S V T A A D T
AAG AAC CTC TTC TCC CTG AAA CTG AGG TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

100
A V Y Y C A S N I L K Y L H W L
GCC GTC TAT TAC TGT GCG AGT AAT ATA TTG AAA TAT CTT CAC TGG TTA

110 120
L Y W G Q G V L V T S S
TTA TAC TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC

FIG. 14.

Apinan anti-CD4-V_{lambda}-sekvenssi, emäsparit 1 - 387; translaatio johtosekvenssin metioniini-ATG:stä (ep 4) ep:hen 387; proteiinisekvenssi on numeroitu vasta-ainekehystähteestä +1 viimeiseen V_{lambda}-tähteeseen +109

M A W A L L L L G L L A H F T
ACC ATG GCC TGG GCT CTG CTG CTC CTC GGC CTC CTT GCT CAC TTT ACA

+1 10
D S A A S Y E L S Q P R S V S V
GAC TCT GCG GCC TCC TAT GAG TTG AGT CAG CCT CGC TCA GTG TCC GTG

20
S P G Q T A G F T C G G D N V G
TCC CCA GGA CAG ACG GCC GGG TTC ACC TGT GGG GGA GAC AAC GTT GGA

30 40
R K S V Q W Y Q Q K P P Q A P V
AGG AAA AGT GTA CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA CCG CAG GCC CCT GTG

50 60
L V I Y A D S E R P S G I P A R
CTG GTC ATC TAT GCT GAC AGC GAA CGG CCC TCA GGG ATC CCT GCG CGA

70
F S G S N S G N T A T L T I S G
TTC TCT GGC TCC AAC TCA GGG AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC AGC GGG

80 90
V E A G D E A D Y Y C Q V W D S
GTC GAG GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAC AGT

100
T A D H W V F G G T R L T V L
ACT GCT GAT CAT TGG GTC TTC GGC GGA GGG ACC CGG CTG ACC GTC CTA

109
G
GGT

Kilpaileva anti-CD54-aktiivisuus B-soluilla immunoidussa
apinassa; 84H10-Mab:n sitoutumisen ICAM-transfektoituun
CHO-soluun inhibitio

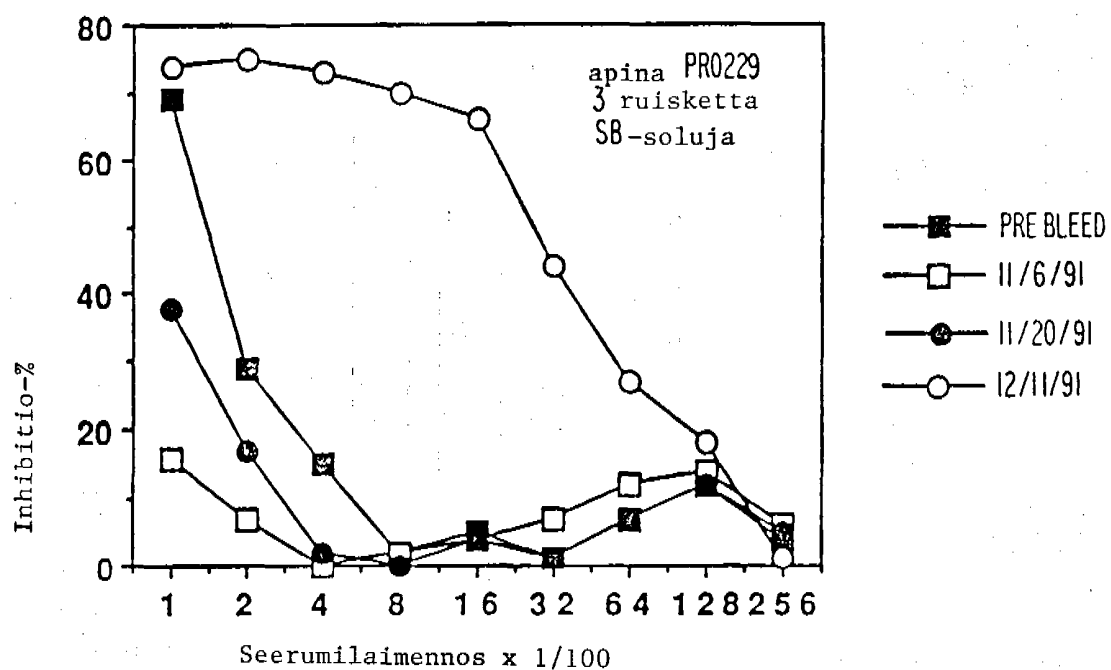


FIG. 15.

FIG. 16.

