



F1000097303B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT**

97303

**C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 11 1996**

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12N 5/28, 5/26, 5/12, 15/13, 15/63,
C 12N 15/90, C 12P 21/08, C 07K 16/46**SUOMI-FINLAND****(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	884907
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	24.10.88
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	24.10.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	28.04.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.08.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
27.10.87 US 113800 P	14.09.88 US 243873 P

(71) Hakija - Sökande

1. Oncogen, 3005 First Avenue, Seattle, WA 98121, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Folger Bruce, Kim R., 2433 36th West, Seattle, WA 98199, USA, (US)
2. Fell, Jr., Henry Perry, 741 218th Place Northeast, Redmond, WA 98053, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Kimeeristen vasta-aineiden tuottaminen homologisella rekombinaatiolla
Produktion av chimära antikroppar genom homolog rekombination(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: HB 8677 ATCC
HB 8913 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

WO A 86/01533 (C 12N 15/00),
Science, vol. 229, (20.09.85), pp 1202-1207, Morrison,
Nature, vol. 317, (19.09.85), pp 230-234, Smithies et al.,
Nature, vol. 301, (03.02.83), pp 388-394, Goodenow et al.,
Cell, vol. 44, (14.02.86), p. 419-428, Thomas et al.,
Cancer Research, vol. 46, (August 1986), pp 3917-3923, Hellström et al.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää kimeerisen vasta-ainemolekyylin valmistamiseksi. Menetelmän mukaisesti transfektoidaan vasta-ainetta tuottava solulinja kohdevektorilla, joka sisältää korvausgeenin solulinjan tuottaman vasta-aineen osan koodaavan sekvenssin muuttamiseksi ja kohdesekvenssin, joka on homologinen toiselle DNA-sekvenssille, joka on muunnettavan vasta-ainesekvenssin vieressä, että korvausgeeni muuntaa vasta-ainesekvenssiä kohdespesifisellä homologisella rekombinaatiolla in vivo. Tämän jälkeen valitaan transfektantti, joka tuottaa kimeerisen vasta-ainemolekyylin. Kimeeristä vasta-ainetta tuottava solulinja viljellään ja kimeerinen vasta-ainemolekyyli eristetään viljelmästä.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av en chimerisk antikroppmolekyl. Enligt förfarandet transfekteras en antikroppproducerande cellinje med en targetvektor, vilken omfattar en ersättningsgen för modifiering av en sekvens som kodar för ett parti av antikroppen, vilken producerats av celllinjen, och en targetsekvens som är homolog med en andra DNA-sekvens, vilken ligger invid antikroppsekvensen som skall modifieras, så att ersättningsgenen modifierar antikroppsekvensen via platsspecifikt, homolog återkombination in vivo. Därefter väljs en transfektant, vilken producerar den chimeriska antikroppmolekylen. Den antikroppproducerande cellinjen odlas och den chimära antikroppmolekylen isoleras från odlingen.

Kimeeristen vasta-aineiden tuottaminen homologisella rekombinaatiolla

Tämä keksintö koskee menetelmää kimeeristen vasta-
5 aineiden tuottamiseksi käyttäen uusia rekombinantteja
DNA-vektoreita ja homologista rekombinaatiota in situ.
Keksinnön rekombinantti DNA-konstruktaja voidaan käyttää
transfektoimaan vasta-aineita tuottavat solut niin, että
kohdistettu homologinen rekombinaatio tapahtuu transfek-
10 toiduissa soluissa, mikä johtaa kimeeristen vasta-ainei-
den tuotantoon transfektoiduissa soluissa.

Keksintöä kuvataan esimerkein, joissa jyrsijän
immunoglobuliinin raskaan ketjun vakioalueet korvattiin
ihmisen IgG1 vakioalueilla ja jyrsijäsolulinja tuotti
15 kimeerisiä raskaita ketjuja.

Aina lähtien solufuusiotekniiikan kehittämisestä
monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseksi (Kohler ja
Milstein, 1975, Nature (London) 256:495) lukuisat tutki-
jat ovat tuottaneet suuren määrän monoklonaalisia vas-
20 ta-aineita, joista monet määrittävät tähän saakka tunte-
mattomia antigeeneja. Pahaksi onneksi useimmat tähän
asti tehdyt vasta-aineet tuotetaan jyrsijöissä ja niiden
käyttökelpoisuus on siksi rajallinen ihmisten terapeut-
tisina aineina, jollei niitä muunneta siten, että jyrsi-
25 jän monoklonaalisia vasta-aineita ei "tunnisteta" vie-
raiksi epitoopeiksi ja "neutraloida" ihmisen immuunijär-
jestelmässä. Useat tutkijat yrittävät siksi kehittää
ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, joita ei "tunnis-
teta" yhtä helposti vieraksi epitoopeiksi ja jotka voi-
30 vat poistaa ongelmat, jotka liittyvät monoklonaalisten
vasta-aineiden käyttöön ihmisissä. On selvää, että
Kohlerin ja Milsteinin (supra) kehittämää hybridooma-
menetelmää, johon kuuluu immunisoitujen hiirien tappa-
minen ja niiden pernan käyttäminen lymfosyyttilähteenä
35 seuraavalle fuusiolle vasta-aineita tuottavien solulin-
jojen säilyttämiseksi, ei voida käyttää ihmiselle. Siksi

monet tutkijat ovat suunnanneet huomionsa viime aikojen edistysaskeliin molekyylibiologian alalla, jotka sallivat DNA:n lisäämisen nisäkkäiden soluihin immunoglobuliinigeenien ekspressoimiseksi (Oi et al., 1983
5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:825; Potter et al., 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161), ja he ovat käyttäneet näitä menetelmiä kimeeristen vasta-aineiden tuottamiseksi (Morrison et al., 1984 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6581; Sahagan et al., 1986, J. Immunol.
10 137:1066; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214).

Kimeeriset vasta-aineet ovat immunoglobuliinimolekyyliä, jotka sisältävät ihmis- ja ei-ihmisosan. Tarkemmin, kimeerisen vasta-aineen antigeeniin yhdistyvä alue
15 (eli muuttuva alue) otetaan ei-ihmislähteestä (esim. jyrsijästä) ja kimeerisen vasta-aineen vakioalue (joka tuottaa immunoglobuliinille biologisen vaikuttajafunktion) otetaan ihmislähteestä. Kimeerisellä vasta-aineella tulisi olla ei-ihmisvasta-ainemolekyylin antigeeninsidontaspesifisyys ja ihmisvasta-ainemolekyylin vaikuttajafunktio.
20

Yleensä näiden kimeerisen vasta-aineiden tuottamiseen käytetyt menetelmät koostuvat seuraavista vaiheista (joidenkin vaiheiden järjestys voi muuttua):

a) tunnistetaan ja kloonataan oikea geenisegmentti, joka koodaa vasta-ainemolekyylin antigeenia sitovan osan; tämä geenisegmentti (joka tunnetaan VDJ:nä, raskaiden ketjujen muuttuva, eroavuus- ja yhdistävä osa, tai VJ:nä, kevyiden ketjujen muuttuva, yhdistävä alue (tai yksinkertaisesti V:nä tai muuttuvana alueena) voi olla
30 joko cDNA- tai genomisessa muodossa.

b) kloonataan geenisegmentit, jotka koodaavat vakio-osan tai sen halutut osat;

c) ligatoidaan muuttuva alue vakioalueen kanssa niin, että täydellinen kimeerinen vasta-aine on koodattu
35 transkriboituvaan ja translatoituvaan muotoon;

- d) ligatoidaan tämä rakenne vektoriin, joka sisältää valikoitavat merkki- ja geenikontrollialueet, kuten promotoottorit, tehostajat ja poly(A)-lisäyssignaalit;
- e) vahvistetaan tämä rakenne bakteereissa;
- 5 f) lisätään DNA:ta eukaryoottiisiin soluihin (transfektio) useimmiten nisäkkään lymfosyytteihin;
- g) valikoidaan soluja, jotka ekspressoivat valikoitavaa merkkiä;
- h) seulotaan solut, jotka ekspressoivat haluttua
- 10 kimeeristä vasta-ainetta; ja
- i) testataan vasta-aine sopivan sitoutumisspesifisyyden ja efektorifunktioiden suhteen.
- Useiden eri antigeenisidontaspesifiyksien vastaaineita on käsitelty näillä menetelmillä kimeeristen
- 15 proteiinien valmistamiseksi (esim. anti-TNP: Boulianne et al., 1984, Nature Vol. 312 s. 643; ja antituumoriantigeenit: Sahagan et al., 1986, J. Immunol. Vol. 137:1066). Samoin on saavutettu useita eri efektorifunktioita kytke-
- 20 mällä uusia sekvenssejä niihin, jotka koodaavat antigeenin sitoutumisalueen. Jotkut näistä ovat entsyymejä (Neuberger et al., 1984, Nature 312:604), immunoglobuliinivakio-
- alueita toisesta lajista ja vakioalueita toisesta immunoglobuliiniketjusta (Sharon et al., 1984, Nature 309:364; Tan et al., 1985, J. Immunol. Vol. 135:3565-3567).
- 25 Eräs molekyylibiologinen viime aikainen edistysaskel on havainto, että viljellyt nisäkkään solut integroivat eksogeenisen plasmidi-DNA:n kromosomi-DNA:han kromosomipaikassa, joka sisältää sekvenssejä, jotka ovat homologisia plasmidisekvenssien kanssa. Tätä tapahtumaa
- 30 kutsutaan homologiseksi rekombinaatioksi (Folger, et al., 1982, Mol. Cell. Biol. 2, 1372-1387; Folger, et al., 1984, Symp. Quant. Biol. 49, 123-138; Kucherlapati, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3153-3157; Lin, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1391-1395;
- 35 Robert de Saint Vincent, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2002-2006; Shaul, et al., 1985, Proc. Natl.

- Acad. Sci. USA 82, 3781-3784). Nisäkässolut sisältävät myös entsyymilaitteiston plasmidi-DNA:n integroimiseksi satunnaisiin kromosomipaikkoihin, mitä kutsutaan ei-homologisiksi rekombinaatioiksi. Homologisen rekombinaation
- 5 frekvenssin on raportoitu olevan jopa 1/100 - 1/1000 rekombinaatiotapauksista, suurimman osan rekombinaatioista johtuessa ei-homologisista vuorovaikutuksista (Thomas et al., 1986, Cell 44:419-428; Smithies et al., 1985, Nature 317:230-234; Shaul, et al., 1985, Proc. Natl.
- 10 Acad. Sci. USA 82, 3781-3784; Smith, et al., 1984, Symp. Quant. Biol. 49, 171-181; Subramani, et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3, 1040-1052). Homologisen rekombinaation mahdollistavan solulaitteiston läsnäolo mahdollistaa geenien modifioinnin in situ. Joissakin tapauksissa on löy-
- 15 detty olosuhteet, joissa kromosomisekvenssiä voidaan muunnella lisäämällä soluun plasmidi-DNA, joka sisältää DNA-segmentin, joka on homologinen kohdelokuksen kanssa ja segmentin uusia sekvenssejä, joissa on haluttu modifikaatio (Thomas et al., 1986, Cell 44:419-428; Smithies et
- 20 al., 1985, Nature 317:230-234; Smith, et al., 1984, Symp. Quant. Biol. 49, 171-181). Homologinen rekombinaatio nisäkässolun kromosomi-DNA:n ja eksogeenisen plasmidi-DNA:n välillä voi johtaa plasmidin integraatioon tai joidenkin kromosomisekvenssien korvautumiseen homologisilla plasmidisekvensseillä. Prosessia, jossa homologia DNA-sekvenssejä korvataan, kutsutaan geenikonversioksi. Sekä integraatio- että konversiotapahtumat voivat johtaa halutun uuden sekvenssin asettumiseen endogeeniseen kohdelokukseen.
- 30 Homologista rekombinaatiota on kuitenkin tutkittu pääasiassa käyttäen geenejä, jotka tarjoavat dominanttivalinnan kuten NEO ja HPRT ja vain harvoilla solutyypeillä (Song et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6820-6824; Rubinitz ja Subramani, 1986, Mol. Cell. Biol.
- 35 6:1608-1614; ja Liskay, 1983, Cell 35:157-164). Ei ole selvitetty, voivatko lymfosyytit tai myeloomasolut

välittää sellaisia tapahtumia tai voidaanko immuoglobuliinigeenejä kohdistaa tai rekonstruoida sellaisella menetelmällä.

Keksintö koskee menetelmää vasta-ainemolekyylien modifioimiseksi ja sellaisten kimeeristen vasta-ainemolekyylien luomiseksi ja tuottamiseksi, joissa antigeeniin liittyvä alue on kytketty (a) immunoglobuliinin vakio-alueeseen tai sen johonkin osaan, joka tuottaa halutun ominaisuuden kuten efektorifunktion, luokan (esim. IgG, IgA, IgM, IgD tai IgE) alkuperän (esim. ihmisen tai muiden lajien); tai (b) toisentyypyypiseen molekyyliin, joka tuottaa jonkin muun ominaisuuden kimeeriselle vasta-ainemolekyyllille (esim. entsyymi, toksini, biologisesti aktiivinen peptidi, kasvutekijän inhibiittori tai kytkentäpeptidi mahdollistamaan konjugaation lääkkeeseen, toksiniin tai muuhun molekyyliin, jne.).

Keksinnössä käytetään uusia rekombinantteja DNA-vektoreita tuottamaan kohdistetun geenimodifikaation, joka saadaan aikaan homologisella rekombinaatiolla joko (a) solulinjoissa, jotka tuottavat vasta-aineita, joilla on halutut antigeenispesifisyydet siten, että vasta-ainemolekyylin antigeeniin yhdistyvä kohta pysyy muuttumattomana, mutta vasta-ainemolekyylin vakio-osa tai sen osa korvataan tai sitä muutetaan; tai (b) solulinjoissa, jotka tuottavat haluttujen luokkien vasta-aineita, joissa voi olla haluttuja efektorifunktioita, siten että vasta-ainemolekyylin vakio-osa pysyy muuttumattomana, mutta vasta-ainemolekyylin muuttuva osa tai sen osa korvataan tai sitä muutetaan.

Keksinnön erään toteutustavan mukaisesti käytetään uutta rekombinanttia DNA-vektoria transfektoimaan solulinja, joka tuottaa vasta-ainetta, jolla on haluttu antigeenispesifisyys. Uusi rekombinantti DNA-vektori sisältää "korvausgeenin", joka korvaa kokonaan tai osittain geenin, johon on koodattu solulinjan immunoglobuliinivakio-osa (korvausgeeni voi esim. koodata kokonaan tai

osittain ihmisen immunoglobuliinin vakio-osan, spesifin immunoglobuliiniluokan tai entsyymin, toksiinin, biologisesti aktiivisen peptidin, kasvutekijän, inhibiittorin tai kytkentäpeptidin, joka mahdollistaa konjugaation
5 lääkkeeseen, toksiiniin tai muuhun molekyyliin, jne.) ja "kohdesekvenssin", joka mahdollistaa homologisen rekombinaation ja kohdegeenin muunnoksen vasta-ainetta tuottavassa solussa. Keksinnön vaihtoehtoisessa toteutustavassa käytetään uutta DNA-vektoria transfektoimaan solulinja,
10 joka tuottaa vasta-ainetta, jolla on haluttu efektorifunktio, jossa tapauksessa uudessa rekombinanttivektorissa oleva korvausgeeni voi koodata kokonaan tai osittain vasta-ainemolekyylin, jolla on haluttu antigeenispesifisyys, ja rekombinanttivektorissa oleva kohdesekvenssi mahdollistaa homologisen rekombinaation ja kohdegeenin modifikaation vasta-ainetta tuottavassa solussa. Kummassakin toteutustavassa, kun vain osa muuttuvasta tai vakio-osasta korvataan, syntyvä kimeerinen vasta-aine voi määritellä saman antigeenin ja/tai sillä voi olla sama efektorifunktio ja kuitenkin sitä voidaan muuntaa tai parantaa
20 siten, että kimeerisellä vasta-aineella voi olla suurempi antigeenispesifisyys, suurempi affiniteettisitoutumisvakio, voimakkaampi efektorifunktio tai lisääntynyt erityis ja tuotanto transfektoidussa vasta-ainetta tuottavassa solulinjassa, jne. Riippumatta käytetystä toteutustavasta, valintamenetelmiä integroitua DNA:ta varten (valikoitavalla leimalla), seulontaa kimeerisen vasta-aineen tuotannon suhteen ja solukloonausta voidaan käyttää tuotettaessa solukloonin, joka tuottaa kimeeristä vasta-
30 ainetta.

Niinpä DNA-pala, joka koodaa muunnoksen monoklonaaliseen vasta-aineeseen voidaan kohdistaa suoraan expressoidun immunoglobuliinigeenin kohdalla B-solussa tai hybridoomasolulinjassa. DNA-rakenteita mille tahansa
35 modifikaatiolle voidaan käyttää muuntamaan minkä tahansa monoklonaalisen solulinjan tai hybridooman proteiinituotetta. Sellainen menetelmä kiertää kalliin ja aikaa-

vievän sekä raskas- että kevytketjuissa muuttuvan alueen geenien kloonauksen kustakin B-solukloonista, jossa on käyttökelpoista antigeenispesifisyyttä. Sen lisäksi, että kierretään muuttuvan alueen geenien kloonauksiprosessi, kimeerisen vasta-aineen ekspression pitäisi olla suurem-
5 paa, kun geeni on luonnollisessa kromosomipaikassaan eikä sattumanvaraisessa paikassa.

Seuraavilla termeillä, olivatpa ne yksikössä tai monikossa, on tässä käytettynä nämä merkitykset:

10 Kimeerinen vasta-aine: vasta-ainemolekyyli, jossa (a) vakioaluetta tai sen osaa on muutettu, korvattu tai vaihdettu siten, että antigeeniin sitoutuva osa (muuttuva alue) on kytkeytynyt toisen tai muutetun luokan, efektorifunktion ja/tai lajin vakio-osaan tai kokonaan toisenlaiseen molekyyliin, joka tuottaa uusia ominaisuuksia kimeeriselle vasta-aineelle, esim. entsyymiin, toksiiniin, hormoniin, kasvutekijään, lääkkeeseen, jne; tai (b) muuttuva alue tai sen osa on muutettu, korvattu tai vaihdettu muuttuvaan osaan, jolla on erilainen tai muunnettu antigeenispesifisyys.
15
20

Korvausgeeni: geeni, johon on koodattu tuote, joka korvaa kokonaan tai osittain vasta-ainemolekyylin vakio-osan tai muuttuvan osan kimeerisen vasta-ainemolekyylin muodostamiseksi. Korvausgeenit muodostetaan keksinnön uusiin rekombinantti DNA-kohdevektoreihin, joita käytetään transfektoimaan vasta-ainetta tuottavat solulinjat. Koko vakioalueen tai sen osan muuttamiseksi keksinnön korvausgeenit voivat olla muun muassa immunoglobuliini-vakio-osa, jossa on tietty efektorifunktio, luokka ja/tai
25
30 alkuperä (esim. ihmisen tai minkä tahansa muun lajin immunoglobuliinien IgG, IgA, IgM, IgD tai IgE vakio-osat) tai vakio-osasta, joka muuttaa immunoglobuliinin vakio-osan toimintaa tai ominaisuuksia; samoin kuin geenejä, jotka koodaavat muita molekyylejä, jotka aiheuttavat jonkin uuden funktion kimeeriselle vasta-ainemolekyyllille,
35 esim. entsyymi, toksiini, hormooni, kasvutekijä, konjugoituva kytkijä, jne. Koko muuttuvan osan tai sen osan

muuntamiseksi keksinnön korvausgeenit voivat olla muun muassa immunoglobuliinin muuttuvia osia, joihin on koodattu eri muuttuva osa, jolla on erilainen antigeeni-affiniteetti tai -spesifisyys tai osa muuttuvasta alueesta, joka muuttaa immunoglobuliinin muuttuvan alueen toimintaa tai ominaisuuksia siten, että syntyvällä kimeerisellä vasta-aineella on suurempi affiniteetti tai spesifisyys antigeenille.

Kohdesekvenssi: sekvenssi, joka on homologinen DNA-sekvenssille, joka rajoittaa vasta-ainemolekyylin muutettavaa aluetta tai on sen vieressä vasta-ainemolekyyliä tuottavan solun kromosomissa. Kohdesekvenssejä rakennetaan keksinnön uusiin rekombinantteihin DNA-vektoreihin, joita käytetään transfektoimaan vasta-ainetta tuottavia solulinjoja.

Kohdesekvenssejä raskasketjuisille rekombinaatioille, jotka ohjaavat korvausta tai lisäystä koko vakioalueessa tai sen osassa ovat muun muassa koko V, D, J ja vaihtoalue (mukaanlukien väkisekvenssit, joita kutsutaan introneiksi) ja reunasekvenssit, jotka liittyvät tiettyyn raskasketjuiseen vakioalueen geeniin, jota ekspressoit transfektoitava vasta-ainetta tuottava solulinja ja niitä voivat olla myös alueet, jotka ovat alavirtaan vakioalueesta (mukaanlukien intronit). Kohdealueita kevytkejuisille rekombinaatioille, jotka ohjaavat korvausta tai lisäystä koko vakioalueessa tai sen osassa voivat olla muun muassa V- ja J-alueet, niiden ylävirran rajasekvenssit ja välisekvenssit (intronit), jotka liittyvät kevytkejuiseen vakioaluegeeniin, jota ekspressoit transfektoitava vasta-ainetta tuottava solulinja ja niitä voivat olla alueet, jotka sijaitsevat vakioalueella tai siitä alavirtaan (mukaanlukien intronit).

Kohdealueita raskasketjuisille rekombinaatioille, jotka ohjaavat korvausta tai lisäystä koko muuttuvassa alueessa tai sen osassa voivat olla muun muassa V-, D- ja J-alueet, (mukaanlukien intronit) ja reunasekvenssit,

jotka liittyvät siihen muuttuvan alueen geeniin, jota ekspressoit transfektoitava vasta-ainetta tuottava solulinja. Kohdealueita kevytketjuisille rekombinaatioille, jotka ohjaavat korvausta tai lisäystä koko muuttuvassa alueessa tai sen osassa voivat olla muun muassa V- ja J-alueet, (mukaanlukien intronit) ja reunasekvenssit, jotka liittyvät kevytketjuiseen muuttuvan alueen geeniin, jota ekspressoit transfektoitava vasta-ainetta tuottava solulinja.

10 Kohdevektori: rekombinantti nukleotidivektori, jossa on kohdesekvenssi ja korvausgeeni, jota voidaan käyttää muodostettaessa kimeeristen vasta-aineiden tuotantoa kohdevektorilla transfektoituilla vasta-ainetta tuottavilla soluilla. Kohdevektoreita käytetään transfektoimaan solulinjoja, jotka sisältävät sekvenssejä, jotka ovat homologisia vektorin kohdesekvenssille ja tuottavat vasta-ainetta, jolla on (a) haluttu antigeenispesifisyys; (b) haluttu vakioalue; tai (c) muu haluttu ominaisuus kuten korkea erityys, sopivuus suurimittakaavaiseen viljelyyn, jne.

Seuraavilla lyhenteillä on alla annetut merkitykset:

	FITC:	fluoreskeiini-isotiosyanaatti
	HRP:	piparjuuriperoksidaasi
25	hu:	ihminen
	huC γ 1:	ihmisen gammaimmunoglobuliini 1:n vakio- alue-eksonit
	huIgG:	ihmisen gammaimmunoglobuliini
	m:	hiiri
30	mAB:	monoklonaalinen vasta-aine
	mIgG:	hiiren gammaimmunoglobuliini

Kuvio 1 kuvaa kaavamaisesti yleistä kaavaa geenien korvaamiseksi homologisella rekombinaatiolla käyttäen keksinnön kohdevektoreita. Muuttuva (V), vaihtelu (D), yhdistävä (J), vaihto- (S) ja vakio- (C) alueet on osoitettu. Osa A kuvaa kaavamaisesti raskasketjuisten geenien

vakio- tai muuttuvan alueen korvaamista kokonaan tai osittain käyttäen kohdesekvenssiä, joka on homologinen minkä tahansa osan kanssa, joka on V-, D-, J-, S- tai C-alueella. Osa B esittää kaavamaisesti kevytketjuisten geenien vakio- tai muuttuvan alueen korvaamista kokonaan tai osittain käyttäen kohdesekvenssiä, joka on homologinen minkä tahansa osan kanssa, joka on V-, J- tai C-alueella. Osa C esittää kaavamaisesti kevyt- tai raskasketjuisten geenien vakio- tai muuttuvan alueen korvaamista kokonaan tai osittain käyttäen sekvenssejä, jotka rajoittuvat korvattavaan geeniin.

Kuvio 2 kuvaa kaavamaisesti kohdeplasmidin pRSV-140-neo/HuC-gamma 1/MuJ4/e:n rakentamista. Kohdesekvenssi sisältää 2,2 kb Hind-III fragmentin, joka on saatu hiiren immunoglobuliinin raskasketjuisesta (IgH) lokuksesta, joka sisältää neljännen liitosalueen (J4), IgH voimistimen (e) ja intronisekvenssit 5 vaihtoalueelle. Kohdesekvenssi sijaitsee 5' korvausgeeniin, joka sisältää 7,0 kb Hind III-Bam HI -fragmentin ihmisen IgG1 raskasketjuisesta lokuksesta, joka sisältää ihmisen gamma 1 vakioalueen.

Kuvio 3 on kartta ihmisen IgG1 rekombinaatiovektorista. Vektori sisältää 2,2 kb Hind III -fragmentin, joka sisältää hiiren raskasketjuisen voimistimen, jota on muunnettu Xba I -kohdan poistamiseksi, joka on 3,0 kb Hind III/Pvu II -fragmentti, joka sisältää ihmisen gamma 1 vakioalue-eksonit (huCγ1), 2,0 kb Bgl II/Bam HI -fragmentin, joka on saatu pSV2/neo:sta, joka koodaa neo:n, 667 bp Bal I/Sst I -fragmentin, jossa on ihmisen CMV -vahvistin ja edistin ja 2,3 kb Pvu II/Hind III -fragmentti pBR322:sta, joka sisältää replikaation alkuperän ja ampisilliiniresistanssigeenin. Bal I/Sst I -fragmentti, joka sisältää CMV siirrettiin pEMBL 18:n Sst I/Hinc III -kohtiin, poistettiin Hind III/Sst I -fragmenttina ja kloonattiin samojen kohtien välillä Pic19R:ssä ja eristettiin Sma I/Bgl II -fragmenttina pantavaksi Pvu II- ja Bgl II -kohtien väliin rakenteessa. Samoin Hind

III/Pvu II -fragmentti, joka sisältää ihmisen c gamma 1 vakioalue-eksonit kloonattiin Puc 9:n Hind III- ja Hinc II -kohtiin ja siirrettiin Hind III/Bam HI -fragmenttina.

Kuvio 4 esittää lisäplasmideja, joita käytetään kohdistamaan ihmisen c gamma 1 -sekvenssejä. Kuviossa 4A ja 4B olevat plasmidit ovat samat kuin kuvataan kuvion 3 plasmidin yhteydessä, paitsi: molemmissa kuvion 4A ja 4B esittämissä plasmideissa on 500 bp Bgl II/Pvu II, joka sisältää SV40 voimistimen ja edistimen pSV2neo:sta (J. Molec. Appl. Genet. 1-327-341, 1982). CMV voimistimen ja edistimen sijalla, ja plasmidissa 4B on 7 kb Hind III/Bam HI -fragmenttia, joka koodaa ihmisen c gamma 1:n enemmän alavirtaan vakioalue-eksoneista.

Keksintö koskee menetelmää kimeeristen vasta-aineiden tuottamiseksi käyttäen uusia rekombinantteja DNA-vektoreita kohdistamaan haluttu sekvenssimuutos tiettyyn paikkaan genomissa homologisella rekombinaatiolla in vivo. Käyttäen keksinnön menetelmää vasta-ainemolekyylin proteiinisekvenssiä voidaan muuttaa transfektoimalla vasta-ainetta tuottava solulinja sopivalla "kohdevektorilla". Yhdessä keksinnön toteutustavassa solulinja, joka tuottaa vasta-ainemolekyyliä, jolla on haluttu antigeenispesifisyys transfektoidaan keksinnön kohdevektorilla, joka sisältää rekombinantin DNA-molekyylin, johon on koodattu "korvausgeeni" ja "kohdesekvenssi". Korvausgeeniin on koodattu haluttu molekyyli, jonka on tarkoitus korvata kokonaan tai osittain solulinja ekspressoiman vasta-ainemolekyylin vakioalue. Korvausgeeni voi esimerkiksi koodata kokonaan tai osittain immunoglobuliinin vakioalue, jolla on tietty efektorifunktio, luokka ja/tai alkuperä, mukaanlukien muun muassa ihmisen tai muun halutun lajin IgG, IgA, IgM, IgD tai IgE vakioalueet; vaihtoehtoisesti korvausgeeniin voi olla koodattuna toisenlainen molekyyli, joka voi tuottaa jonkin muun funktion syntyvään kimeeriseen vasta-aineeseen; esim. entsyymi, toksini, biologisesti aktiivinen peptidi, kasvutekijä, inhibiittori, konjugoituva peptidikytkin, jne. Kohdevektorin

kohdesekvenssi on homologinen DNA-sekvensseille, jotka ovat kromosomissa transfektoitavan solulinjan tuottaman immunoglobuliinin vakioalueen koodaavassa geenissä tai sen vieressä tai sopivalle osalle vakioalueen koodisekvenssiä. Transfektion jälkeen tapahtuu homologista rekombinaatiota vasta-ainetta tuottavassa solulinjassa; jotkin näistä rekombinaatiotapahtumista johtavat koko immunoglobuliinigeenin vakioalueen tai sen osan korvautumiseen korvausgeenillä ja siksi kimeeristen vasta-ainemolekyylien ekspressoitumiseen transfektoitujen solujen toimesta.

Keksinnön vaihtoehtoisessa toteutustavassa solulinja, joka tuottaa vasta-ainemolekyylejä, jolla on haluttu vakioalue, transfektoidaan kohdevektorilla, joka sisältää korvausgeenin, johon on koodattu kokonaan tai osittain muuttuva alue, jolla on haluttu antigeenispesifisyys ja kohdealueen, joka ohjaa geenimodifikaatiota osassa tai koko muuttuvassa koodialueessa isäntäsolun kromosomissa. Transfektion jälkeen tapahtuu homologista rekombinaatiota vasta-ainetta tuottavassa solulinjassa; osa näistä rekombinaatiotapahtumista johtavat immunoglobuliinigeenin muuttuvan alueen korvautumiseen kokonaan tai osittain korvausgeenillä ja siksi kimeeristen vasta-ainemolekyylien ekspressoitumiseen transfektoitujen solujen toimesta.

Kun transfektantti, joka ekspressoi kimeeristä vasta-ainetta on tunnistettu, keksinnön käyttöön kuuluu transfektantin viljely ja kimeeristen vasta-ainemolekyylien eristys soluviljelmäsupernatantista käyttäen sinänsä tunnettuja menetelmiä monoklonaaisten vasta-aineiden eristämiseksi. Vaihtoehtoisesti transfektoituja soluja voidaan viljellä askiittinesteessä eläimissä ja kerätä sinänsä tunnetuilla menetelmillä monoklonaalisten vasta-aineiden eristämiseksi.

Keksinnön eri puolia kuvataan tarkemmin seuraavissa osissa ja demonstroidaan esimerkein, joissa tuotetaan

hiiren/ihmisen immunoglobuliiniraskasketjuja. Kuvauksen selvyyden vuoksi keksintöä kuvataan seuraavasti:

(a) kohdevektorit; (b) transfektio; ja (c) kimeerisiä vasta-ainemolekyylejä tuottavien transfektanttien se-
5 lonta ja valinta.

Kuten aiemmin on selitetty, keksinnön kohdevektori-
rit koostuvat rekombinantti DNA-vektoreista, mukaanlu-
kien muun muassa plasmidit, fagit, fagemidit, kosmidit,
virukset ja vastaavat, jotka sisältävät korvausgeenin ja
10 kohdesekvenssin. Kuten alla kuvataan yksityiskohtaisemmin,
korvausgeeni voi sisältää minkä tahansa lukumäärän geene-
jä, joihin on koodattu haluttu rakennetuote, kun taas
kohdesekvenssi voi vaihdella riippuen muunnettavan vas-
ta-ainemolekyylin tyypistä ja transfektoitavan eläinso-
15 lun tyypistä. Kohdesekvenssi ja korvausgeeni sijaitsevat
kohdevektorissa siten, että sopivan vasta-ainetta tuotta-
van solulinjan transfektio kohdevektorilla saa aikaan
kohdistetun homologisen rekombinaation siten, että gee-
nimuunnos saadaan aikaan korvausgeenin kohdespesifillä
20 lisäyksellä vasta-ainegeeniin.

Keksinnön kohdevektorit voivat sisältää lisägee-
nejä, jotka koodaavat valikoitavia merkkejä, esim. lää-
keresistenssiä, entsyymiä, transfektanttien valinnan
helpottamiseksi, tai ne voidaan ko-transfektoida sellai-
25 silla merkeillä. Myös muita sekvenssejä, jotka paranta-
vat rekombinaatiotapahtumia voidaan käyttää. Sellaisia
geenejä ovat muun muassa joko eukaryoottiset tai pro-
karyoottiset rekombinaatioentsyymit kuten REC A, topo-
isomeraasi, REC 1 tai muut DNA-sekvenssit, jotka lisää-
30 vät rekombinaatiota kuten CHI. Eri proteiineja kuten
niitä, jotka on koodattu edellä mainittuihin geeneihin
voidaan myös transfektoida rekombinaatiofrekvenssien
lisäämiseksi. Eri kohdesekvenssejä, korvausgeenejä ja
valittavia merkkejä, joita voidaan käyttää keksinnön
35 menetelmän mukaisesti kuvataan alla.

Kohdesekvenssin koostumus voi vaihdella riippuen siitä käytetäänkö kohdeplasmidia korvaamaan kokonaan tai osittain joko muuttuva tai vakioalue kevyissä ketjuissa tai raskaissa ketjuissa, ja lisäksi vasta-ainettat tuot-

5 tavan isäntäsolun eläinlajista. Tarkemmin sanoen kohdesekvenssien tulisi olla homologisia sekvenssien kanssa, jotka ovat korvattavan tai muunnettavan vakio- tai muunnettavan alueen tai sen osan vieressä.

Esimerkiksi kromosomissa kypsät raskasketjuiset

10 geenit koostuvat 5'-terminuksissaan VDJ-alueista; toisin sanoen muuttuvasta alueesta (V), vaihtelualueesta (D) ja liitosalueesta (J), mitä seuraavat jäljellä olevat J-alueet, jotka eivät ekspressoitu (J-alueiden määrä vaihtelee lajin mukaan), sekä intronsekvensseistä. Geenin

15 keskimäinen ja 3'-alue koostuu vakioalue-eksoneista (joiden ympärillä ja seassa on introni- ja translatoitumattomia sekvenssejä), jotka voivat olla yhtä erilaisista luokista (esim. mu, delta, gamma, epsilon, alfa), joista kukin liittyy omaan viereiseen vaihtoalueeseensa. Niinpä kohdesekvenssi, jota käytetään kohdistamaan homologis-

20 ta rekombinaatiota vasta-ainetta tuottavan isäntäsolun raskasketjuisessa geenissä voi koostua alueesta, joka on homologinen minkä tahansa vasta-ainegeenin osan kanssa, riippuen halutusta muutoksesta. Esimerkiksi kohdesekvenssi raskaan ketjun vakioalueiden korvauksen oh-

25 jaamiseksi voi sisältää sekvenssejä, jotka ovat homologisia millä tahansa alueella olevien sekvenssien kanssa aina vaihtoalueeseen asti, joka päättyy V:hen, D:hen tai J:hin ja sijoittuisi sen mukaisesti kohdevektoria

30 rakennettaessa; esim. paikkaan 5' korvausgeenin koodi-alueelle. Todellinen käytettävä kohdesekvenssi voi vaihdella kohdeisäntäsolun eläinlajin ja kohdeisäntäsolun ekspressoiman vasta-aineluokan mukaan.

Poiketen raskasketjuisten geenien rakenteesta

35 kromosomissa kypsät kevytketjuiset geenit koostuvat VJ-alueesta 5'-terminuksissaan, intronisekvensseistä ja

yhdestä vakioalue-eksonista. Niinpä kohdesekvenssi homologisen rekombinaation kohdistamiseksi vasta-ainetta tuottavan isäntäsolun kevytketjuisessa geenissä voi sisältää alueen, joka on homologinen minkä tahansa geenin osan kanssa, riippuen halutusta muutoksesta. Esimerkiksi kohdesekvenssi kevytketjuisten vakioalueiden korvauksen ohjaamiseksi voi olla homologinen sekvenssien kanssa, jotka kuuluvat kyseisiin V- ja J-alueisiin tai niiden osiin intronisekvenssien ollessa ennen koodialuetta kevyen ketjun vakioalueella. Sellaiset kohdesekvenssit asetettiin sopivasti kohdeplasmidissa; esim. paikkaan 5' korvausgeenin koodisekvenssiin. Todellinen käytettävä kohdesekvenssi voi jälleen vaihdella kohdeisäntäsolun eläinlajin ja kohdeisäntäsolun ekspressoiman vasta-aineluokan mukaan.

Yllä kuvattujen sekvenssien lisäksi kohdesekvenssi voi sisältää sekvenssejä, jotka ovat homologisia alueiden kanssa, jotka ovat vakion raskaan tai kevyen ketjun koodialueen 5'- tai 3'-terminusten vieressä, ja siksi asetettaisiin sen mukaisesti rakennettaessa kohdevektoria; toisin sanoen korvausgeenin koodialueen kohtaan 5' tai 3'. Samaan tapaan kohdesekvenssit raskas- tai kevytketjuisten muuttuvien alueiden korvaamiseksi voivat sisältää sekvenssejä, jotka ovat homologisia sopiville alueille tai niiden osille, jotka ympäröivät muuttuvaa aluetta. Joka tapauksessa kohdesekvenssit voivat myöskin sisältää koodialuesekvenssejä, jotka ympäröivät sellaista aluetta eksonissa, jossa vain osa muuttuvasta tai vakioalueesta on korvattava niin, että ekspressoituva proteiini muuntuu halutulla tavalla.

Kuten aiemmin kuvattiin, vasta-aineen vakioalueiden muuttamiseksi käytetyt korvausgeenit voivat sisältää koodisekvenssin eri luokan ja/tai eläin- tai ihmislajin immunoglobuliinin vakio osalle tai sen osalle. Niinpä raskaiden ketjujen tapauksessa korvausgeeni voi sisältää kokonaan tai osittain geenin, johon on koodattu ihmisen

IgM, IgD, IgG, IgE tai IgA tai niiden minkä tahansa alaluokan vakio-osa. Vaihtoehtoisesti korvausgeeniin voi olla koodattuna tuote, joka voi tuottaa jonkin erilaisen efektorifunktion ekspressoituvalle kimeeriselle molekyylille. Esimerkiksi entsyymi, toksiini, kasvutekijä, biologisesti aktiivinen peptidi, kytkijä, jne. Korvausgeeni voi sisältää myös minkä tahansa yhdistelmän edellä mainittuja sekvenssejä, esimerkiksi kokonaan tai osittain vasta-aineen vakioalueen kytkettynä uuteen proteiini-

5
10

sekvenssiin.

Korvausgeenin valinta riippuu osittain ekspressoitun kimeerisen vasta-ainemolekyylin aiotusta käyttötar-koituksesta. Esimerkiksi, jos tarkoituksena on terapeut-

15

tinen käyttö ihmisiin, korvausgeeni voisi koodata ihmisen vakioalueen, edullisesti luokasta, jolla on haluttu efektorifunktio aiotulle terapeuttiselle käytölle. Jos halutaan saada aikaan parannus tai muutos vasta-aineen olemassaolevaan efektorifunktioon, osa vakioalueesta voi-

20

daan korvata sekvenssillä, joka aiheuttaa sellaisen pa-rannetun tai muunnetun efektorifunktion syntyvälle ki-meeriselle vasta-ainemolekyyllille. Jos halutaan entsyy-

25

min, toksiinin, lääkkeen, hormonin tai kasvutekijän koh-distettu toimitus in vivo, tulisi käyttää korvausgeeniä, joka koodaa tuon entsyymin, toksiinin, lääkkeen, hormonin tai kasvutekijän tai sopivan kytkimen sellaiseen konju-

30

goimista varten. Jos kimeerisiä vasta-aineita aiotaan käyttää diagnostisissa määrityksissä, esimerkiksi sil-loin, kun käytetään leimattuja vasta-aineita, tulisi käyttää korvausgeeniä joka koodaa entsyymin tai sen

35

substraatin. Sellaisia entsyymi/substraattisysteemejä ovat muun muassa ne, jotka tuottavat reaktioistaan väril-lisen tuotteen; esimerkiksi betagalaktosidaasi, alkali-fosfataasi, piparjuuriperoksidaasi ja vastaavat. Synty-viä kimeerisiä vasta-aineita voidaan käyttää leimattui-na vasta-aineina aiotuissa menetelmissä lisämuutoksia, esim. lisäämällä kemiallisesti entsyymejä, lääkkeitä, toksiineja, hormoneja, kasvutekijöitä jne. tai ilman niitä.

Korvausgeeni, jota käytetään muunnettaessa vasta-
aineen muuttuvia alueita voi sisältää kokonaan tai osit-
tain koodisekvenssin sellaisen vasta-ainemolekyylin muut-
tuvalle osalle, joka määrittää halutun antigeenin. Nämä
5 voivat koodata antigeenin sitoutumisalueita, jotka mää-
rittävät läheisiä tai täysin eri antigeeneja. Jos halu-
taan parannusta tai muutosta vasta-aineen sitoutumiseen
tai spesifisyyteen, osa muuttuvasta alueesta voidaan kor-
vata sekvenssillä, joka tuottaa sellaisen parantuneen tai
10 muuttuneen sitoutumisen tai spesifisyyden syntyvälle ki-
meeriselle vasta-ainemolekyyllille.

Kohdesekvenssin ja korvausgeenin lisäksi keksinnön
kohdevektori voi koodata valittavan merkin, joka auttaa
menestyksellisesti transformoitujen vasta-ainetta tuot-
15 tavien solujen seulonnassa ja valinnassa. Sellaisia merk-
kejä ovat muun muassa lääkeresistenssigeenit, kuten
gpt, neo, his, jne. ja vastaavat.

Muita osia, jotka voivat lisätä rekombinaatio-
tapahtumien määrää voidaan myös sisällyttää kohdevekto-
20 riin. Esimerkiksi replikaation alku (ori), joka on lämpö-
herkkä (esimerkiksi polyooma tsA ori -systeemi) voidaan
sisällyttää rakenteeseen niin, että transfektanttien
kasvu sallivassa lämpötilassa johtaa vektorin replikoitu-
miseen siten, että kohdesekvenssien ja korvausgeenien
25 kopiomäärä lisääntyy ja seurauksena oleva rekombinaatioi-
den määrä voi kasvaa. Myös muita ori -systeemejä voitai-
siin käyttää lisäämään kopiomäärää (esim. EBV ori plus-
tekijöitä, BPV ori plus -tekijöitä tai SV40 ori ja T-
antigeenia).

30 Keksinnön menetelmän mukaisesti solulinja, joka
tuottaa haluttua vasta-ainetta (eli sellaista, jolla on
haluttu antigeenispesifisyys tai haluttu vakioalue) trans-
fektoidaan sopivalla kohdevektorilla sellaisten trans-
fektanttien tuottamiseksi, joille tapahtuu kohdeohjattu
35 homologinen rekombinaatio. Sekä kevytketjuisia että ras-
kasketjuisia kohdevektoreita voidaan käyttää transfektoi-
maan sopiva vasta-ainetta tuottava solulinja; monissa

tapauksissa kuitenkin transfektio raskasketjuisella kohdevektorilla voi riittää aikaansaamaan kimeerisen vasta-ainemolekyylin ekspressio.

Transfektio voidaan saada aikaan millä tahansa useista alaa taitavien tuntemista menetelmistä, mukaanlukien muun muassa kalsiumfosfaattisaostus, elektroporatio, mikroinjektio, liposomifuusio, RBC-ghost -fuusio, protoplastifuusio, jne. Kohdevektori voidaan linearisoida leikkaamalla restriktioentsyymillä kohdesekvenssin sisällä ennen transfektiota homologisen rekombinaation todennäköisyyden kasvattamiseksi transfektoidussa solussa.

Lopullinen testi menestyksekkäälle transformaatiolle, homologiselle rekombinaatiolle ja kohdistetulle geenimuutokselle on kimeeristen vasta-aineiden tuotanto vasta-ainetta tuottavan solulinjan toimesta. Kimeerisiä vasta-aineita tuottavien transfektanttien havaitseminen voidaan suorittaa monin tavoin riippuen korvausgeenituotteen luonteesta.

Jos kohdevektori sisältää havaittavan merkin, transfektoidut solut tulisi ensin seuloa merkkiä sisältävien valikoimiseksi. Esimerkiksi käytettäessä lääkeresistenssigeeniä voidaan ne transfektantit, jotka kasvavat valinta-alustassa, joka sisältää muuten kuolettavaa myrkyä, havaita ensimmäisessä seulonnassa. Sitten tarvittaisiin toinen seulonta niiden transfektanttien tunnistamiseksi, jotka ekspressoivat kimeeristä vasta-ainetta.

Toisen seulonnan protokolla riippuu korvausgeenin luonteesta. Esimerkiksi sellaisen korvausgeenin ekspressio, joka koodaa eri vasta-aineluokan tai lajin vakioalueen voidaan havaita immuunimäärityksellä käyttäen vasta-aineita, jotka ovat spesifejä sille immunoglobuliiniluokalle ja/tai lajille; vaihtoehtoisesti voitaisiin suorittaa biomääritys ja testata tiettyä korvausgeenin aiheuttamaa efektorifunktiota. Sellaisen korvausgeenin ekspressio, joka koodaa biologisesti aktiivisen molekyylin kuten entsyymien, toksien, kasvutekijän tai muun

peptidin voitaisiin määrittää kyseisestä biologisesta aktiviteetista; transfektoitavat solutuotteet voidaan testata esimerkiksi käyttäen sopivaa enstyymisubstraattia tai toksiinin, kasvutekijän, hormonin jne. kohdetta; 5 vaihtoehtoisesti nämä korvausgeenituotteet voitaisiin myös määrittää immunologisesti käyttäen vasta-aineita, jotka ovat spesifejä korvausgeenituotteelle.

Transfektantit, jotka ekspressoivat korvausgeeniä tulisi myös testata sopivan antigeenitunnistuksen suhteen. Tämä voidaan saada aikaan sopivalla immuunimäärittäyksellä, mukaanlukien kilpailuimmuunimäärittäminen käyttäen alkuperäisiä ja kimeerisiä vasta-aineita. Näiden seulontatestien ei tarvitse olla peräkkäisiä ja ne voitaisiin itse asiassa suorittaa yhtä aikaa käyttäen "kerrosimmuunimäärittäystä", jossa käytetään vangitsijavasta-ainetta, 15 joka määrittelee korvausgeenituotteen (eli joko vakio- tai muuttuvan alueen) immobilisoimaan kimeerisen vasta-aineen ja muuttumattoman osan (eli joko muuttumattoman muuttuvan alueen tai muuttumattoman vakioalueen) läsnäolo 20 tai puute havaitaan (eli käyttäen leimattua antigeenia tai leimattua vasta-ainetta). Esimerkiksi voitaisiin käyttää antigeenia vangitsemaan kimeeriset vasta-aineet ja vakioalueen korvausgeenituotteet voitaisiin havaita käyttäen leimattuja vasta-aineita, jotka määrittävät 25 korvausgeenituotteet, tai määrittämällä vangitut kimeeriset vasta-aineet korvausgeenituotteen (esim. entsyymaattisen, toksisen, hormoni-, kasvutekijä-, jne.) biologisen aktiviteetin suhteen. Vaihtoehtoisesti kimeerinen vasta-aine voidaan immobilisoida vakioalueelle (esim. 30 käyttäen sille alueelle spesifiä vasta-ainetta tai stafylokokki A proteiinia jne.) ja muuttuvan alueen geenin tuote voitaisiin havaita käyttäen leimattua antigeenia tai anti-idiotyyppivasta-ainetta.

Esimerkki

Hiiren immunoglobuliinin raskaan ketjun vakioalueen korvaaminen ihmisen gamma 1 immunoglobuliinilla

Seuraavat esimerkit kuvaavat sellaisen kohdeplas-
midin valmistusta, joka sisältää hiiren kohdesekvenssin
(joka koodaa raskasketjuisen geenin neljännen liitos-
alueen ja vahvistajan) ligatoituna korvausgeeniin, joka
joodaa ihmisen gamma 1 -immunoglobuliinin (huIgG1) vakio-
alueen. Tätä kohdeplasmidia käytettiin yhdessä fagin
kanssa, joka sisälsi koko kypsän geenin, joka koodaa
hiiren raskaan ketjun (koko muuttuva ja vakioalue) ko-
transfektoimaan hiiren myeloomasoluja, jotka ovat ras-
kasketjuisia mutantteja, jotka alun perin ekspressoivat
vain kevyitä ketjuja. Transfektoidut solut seulottiin
ja ne klooni, jotka ekspressoivat ihmisen IgG1 raskai-
ta ketjuja identifioitiin. Nämä kokeet osoittavat menes-
tyksekkään homologisen rekombinaatiotapahtuman, integ-
roitumisen isäntäsolun kromosomeihin ja ihmiseen gamma 1
-geenin ekspression hiiren solujärjestelmässä.

Jollei toisin mainita, alla kuvattua aineistoa
ja menetelmiä käytettiin seuraavissa esimerkeissä.

Transfektio

Transfektiot suoritettiin pesemällä ja suspensoi-
malla uudelleen noin 10^7 solua PBS:ssä (fosfaattipusku-
roitu suolaliuos) 4°C :ssa lisäten 2 mM MgCl_2 ja 2 mM
 CaCl_2 ja siirtäen solut steriiliin muovikyvettiin, joka
oli vuorattu alumiinipaperilla (BioRad, CA). Linearisoi-
tu DNA lisättiin ja sekoitettiin lopullisessa konsentraa-
tiossa 10-100 $\mu\text{g/ml}$, sitten siihen johdettiin sähköä
sopivasta virtalähteestä (esim. Gene Pulsar, BioRad, CA).
Kyvettejä "näpäytettiin" kevyesti hyvän sekoittumisen
varmistamiseksi. Kahden minuutin jälkeen huoneenlämmössä
solut siirrettiin sitten 9 ml:aan RPMI-alustaa (GIBCO),
jossa oli 10 % FBS 37°C :ssa. 48 tunnin inkubaation jäl-
keen elävät solut kerättiin sentrifugoimalla, laskettiin
ja pantiin maljoille tiheydelle 10^3 solua/kalvo 96-

kalvoisilla maljoilla tai 10^4 solua/kalvo 24-kalvoisilla maljoilla RPMI-alustassa, jossa oli 10 % FBS, penisilliniä (60 mg/ml)/streptomysiiniä (100 mg/l), natrium-pyruvaattia (1 mM), L-glutamiinia (292 mg/l) ja

5 0,1-2 µg/ml mykofenolihappoa tai 1-2 mg/ml G418. Sama alusta joko täydennettiin tai vaihdettiin joka toinen tai kolmas päivä. 2-3 viikon päästä kaivot arvosteltiin kasvun suhteen. Viljelmäsupernatantit analysoitiin sit-

10 ten ELISA:lla ihmisen gamma 1:n läsnäolon suhteen ja positiiviset kaivot kloonattiin ja seulottiin uudelleen.

Transfektanttien seulonta onnistuneiden rekombinanttien suhteen

ELISA-määritykset suoritettiin päälylystämällä immulon 2 levyjä (Dynatec Labs, Chantilly, VA) 100 µl:lla

15 joko vuohen anti-ihmis IgG (Antibodies Inc., Davis, CA) 1:1000 laimennoksena tai vuohen anti-hiiri IgA (Cappel) 1:5000 laimennoksena päälylystyspuskurissa (0,1 M NaHCO₃ pH 9,6) 4°C:ssa yön yli. Levyt täytettiin näytelaimennok-

20 sella (Genetic System) blokkaukseksi yhden tunnin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen ne ravistettiin pois, sul-

jettiin ja varastoitettiin 4°C:ssa ei yli 3 viikoksi. Levyt valmistettiin määritystä varten pesemällä 3 kertaa pesu-

puskurilla (0,15 M NaCl, 0,05 % v/v Tween 20) ja sitten lisättiin 100 µl standardeja (laimennettuina sopivaan

25 alustaan) tai viljelmäsupernatantteja ja inkuboitiin 37°C:ssa 1 tunti. Levyt pestiin 3 kertaa pesupuskurilla ja sitoutunut vasta-aine havaittiin 100 µl:lla joko pi-

parjuuriperoksidaasi (HRP) -konjugoitua vuohen anti-ihmis IgG (American Qualex) laimennoksena 1:6000, HRP

30 vuohen anti-hiiri IgA (Cappel) laimennoksena 1:5000, tai HRP vuohen anti-hiiri Lambda (Southern Biotech. Ass. Inc., Birmingham, AL) laimennoksena 1:3000, 1 tunti

37°C:ssa. Sitten levyt pestiin 3 kertaa pesupuskurilla ja inkuboitiin huoneenlämmössä 15 minuuttia TMB

35 Chromogenin 1:1000 laimennoksessa puskuroidussa substraati-

tissa (Genetic Systems), pysäytettiin 100 µl:lla/kaivo

3M H₂SO₄ ja luettiin heti 450/630 nm:ssä mikrolevylukijalla (Genetic Systems). Samoin Kappa tuottavat solulinjat voidaan seuloa käyttäen HRP vuohen anti-hiiri Kappa reagenssia (Southern Biotech. Ass. Inc.). Ihmisen IgG:lle ja/tai hiiren IgA:lle positiiviset solulinjat subkloonattiin rajoittamalla laimennusta tai pehmeässä agarosissa ekspressoivien kloonien eristämiseksi. Kloonattavaksi pehmeässä agarosissa suunnilleen 1000 solua positiivisesta kaivosta suspensoitiin uudelleen 0,4 % agarosiin ja pantiin kerroksena agarkerroksen päälle, jossa oli hiiren peritonaaliekstaktaattisyöttösoluja. Kolmas kerros, joka sisälsi ihmisen IgG1:lle spesifiä antiseraumia lisättiin näiden päälle 1-2 vuorokautta myöhemmin. Positiiviset kloonit tunnistettiin immuunisaostuman läsnäolosta.

Southern ja Western blotit

Korkeamolekyyllipainoista DNA:ta eristettiin soluista pääosin siten kuin on kuvannut Blin ja Stafford (Blin. N. ja Stafford, D.W., 1976, Nucleic Acid Res. 3:2303) ja myöhemmin Maniatis, Fritsch ja Sambrook (Maniatis et. al., 1982, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY s. 280) sillä erotuksella, että solut pestiin ensin standardifosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (eikä Tris:issä) ja RNAasikäsittely suoritettiin samanaikaisesti proteinaasi K -käsittelyn kanssa 55°C:ssa.

Southern blotit ja hybridisaatio suoritettiin kuten on ensin kuvannut Southern (Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98:503) ja myöhemmin yksityiskohtaisemmin Maniatis, Fritsch ja Sambrook (Maniatis et. al., 1982, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY ss. 383-389). Hybridisaatiossa käytetyt koettimet olivat 1,0 kb Hind III-PstI -fragmentti, joka sisältää ihmisen IgG1 -geenin ensimmäisen vakioaluekohdan, tai 0,7 kb Hind III-Hind III -fragmentti, joka koodaa hiiren J_{H2} ja J_{H3} geenisegmentit. Koettimien leimaus suoritettiin

5 Western blot -analyysit suoritettiin kuten on kuvannut (Towbin et. al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:4350) ja kehitysreagenssit ovat samat kuin ne, joita käytettiin havaitsemiseen ELISA-määrittelyksessä.

Rakennettiin kohdeplasmidi, joka koostuu bakteeri-plasmidivektorista pRSV-140-neo, johon kloonattiin kor-
vausgeeninä 8,0 kb Hind III-Bam HI -fragmentti, joka si-
sältää ihmisen gamma 1 vakioaluegeenin (kuvio 2). Kohde-
15 geeni, 2,2 kb Hind III -fragmentti, joka on johdettu hii-
ren immunoglobuliinin raskasketjuisesta (IgH) kohdasta
ja joka sisältää neljännen liitosalueen (J4), IgH vah-
vistimen (e) ja intronisekvenssit 5' vaihtoalueelle, li-
sättiin Hind III -kohtaan, joka sijaitsee 5' ihmisen
20 gammageeniin (kuvio 2). Tämä rakenne linearisoitiin
uniikissa Xba I kohdassa hiiren kohdesekvenssissä ja
transfektoitiin alla kuvattuun hiiren myeloomasolulinjaan
edellä kuvatulla elektroporaatiolla.

25 Alla kuvatut kokeet ja tulokset osoittavat menes-
tyksellistä homologista rekombinaatiota kohdeplasmidin ja
hiiren myeloomaisäntäsolun kotransfektointiin käytettyyn
fagiin sisältyvän hiiren raskasketjuisen geenin välillä.
Homologinen rekombinaatio ja integroituminen hiiren
30 myeloomaisäntäsolukromosomiin aiheutti ihmisen immuno-
globuliinin raskaan ketjun (IgG1) ekspressoitumiseen.

Kohdaplasmidi, joka sisälsi (a) hiiren kohdesekvenssin, joka koodaa neljännen liitosalueen (J4), IgH vahvistimen ja intronisekvenssit 5' vaihtoalueelle, ja (b) korvausgeenin, joka koodaa ihmisen IgG1 vakioalueen

linearisoitiin kohdesekvenssin alueella ja kotransfektoitiin samassa moolisuhteessa fagi-DNA-kloonin kanssa, joka sisälsi funktionaalisen J558 hiiren raskasketjuisen geenin, raskasketjuiseen hiiren mutanttimyeloomasolulin-
5 jaan, joka ekspressoisi vain kevyitä ketjuja. G418:lle (valittavalle merkille, jonka koodasi kohdeplasmidi-konstruktio) resistentit solulinjat seulottiin ihmisen IgG1-proteiinin suhteen. Koska ihmisen gamma 1 vakio-
alueesta, joka sisältyi yllä konstruoituihin kohdeplas-
10 mideihin puuttuu immunoglobuliinin edistäjäsekvenssi, ihmisen IgG proteiinin ekspression transfektoidun hiiren solulinjan toimesta pitäisi olla tulos homologisesta rekombinaatiotapauksesta transfektoidujen DNA-molekyylien välillä ja integraatiosta isäntäsolun kromosomissa.

15 Kimeerisiä immunoglobuliineja erittävien solujen tunnistus

Transfektantit, jotka erittivät ihmisen IgG ja/tai hiiren IgA proteiinia subkloonattiin. Homologisten rekombinaatiotapausten varmistuksen tarjosi DNA-blot-siirto-
20 analyysi, jossa tunnistettiin juuri uudelleen järjestynyt restriktiofragmentti; tämä fragmentti oli odotetun kokoinen (10,5 Kb Bam HI -fragmentti) ja sisälsi sekä ihmisen gamma 1, että hiiren J_{H2}-J_{H3} -sekvenssejä. Lisävarmistus saatiin supernatanttiproteiinien Western blot -analyysillä, joka näytti 50 kilodaltonin (50 kd) proteiini-
25 ketjun, jossa oli ihmisen IgG serologisia determinantteja transfektoomaviljelysupernatanteissa. Anti-ihmis IgG -reagenssi ei reagoinut hiiren IgA:n kanssa, joka erottui myös-
kin perustuen hitaampaan elektroforeettiseen liikkuvuuteen.
30

Myös ELISA-tulokset paljastivat hiiren IgA:n läsnäolon monissa transfektoomasupernatanteissa. Tämä on tulosta siitä, että funktionaalinen J558 raskas ketjuinen geenin integroituu häiriintymättä (eli ilman homologista rekombinaatiotapahtumaa). Vertaamalla ihmisen IgG:n
35 ja IgA:n ekspression ja tuotannon määrää on homologisten

rekombinaatiotapahtumien frekvenssin verrattuna ei-homologisiin reaktiotapahtumiin arvioitu olevan 30-80 % ko-
keesta riippuen.

Yllä esitetyt tulokset ovat todistaneet: (a) että
5 kohdeplasmidi toimii kuten on suunniteltu; ja (b) että
myeloomasolut ovat hyvin tehokkaita kyvyssään välittää
homologista rekombinaatiota.

Sekvenssejä, jotka ovat homologisia alueille ylä-
virtaan ja/tai alavirtaan muuttuvista geenisegmenteistä
10 voitaisiin käyttää yhdessä muuttuvan alueen geenisegment-
tien tai niiden osien kanssa muuttamaan antigeenin affini-
teettia ja/tai spesifisyyttä. Lisäksi tässä kuvattua
J558-systeemiä voidaan käyttää seulontamenetelmänä re-
kombinaatiota lisäävien proteiinien tunnistuksessa.

15 Esimerkki:

L20 ihmisen tuumoriin assosioituneelle antigeenille
spesifisen kimeerisen immunoglobuliinin raskaan ketjun
tuotanto

Alla kuvatut esimerkit osoittavat, että hiiren
20 hybridoomasolut voivat tehokkaasti välittää homologista
rekombinaatiota ja että tätä kykyä voidaan käyttää endo-
geenisen immunoglobuliinin raskasketjuisen kohdan suurien
rekonstruktioiden ohjaamiseen. Konstruoitiin plasmidi,
joka sisälsi ihmisen IgG1 vakioalueen eksonit rajoittu-
25 neina hiiren raskaan ketjun vahvistimeen ja neomysiini-
geeniin. Tätä konstruktia käytettiin ohjaamaan anti-
geenispesifisen kimeerisen raskasketjuisen Ig:n tuotan-
toa kohdistamalla paikkaspesifisesti endogeeniseen ras-
kasketjuiseen kohtaan hybridoomasolulinja L20, joka tuot-
30 taa monoklonaalista vasta-ainetta, joka on spesifinen ih-
misen tuumoriin liittyvälle antigeenille (patenttihak-
mus nro 834 172, jätetty 26.2.1986 ja siihen sisältyvät
viitteet). Kohdistustapahtuman frekvenssin on havaittu
olevan 1 200:sta tai 0,5 % hybridoomasoluista, jotka
35 integroivat plasmidin.

Kohdevektorin konstruointi ja hybridoma
L20:n transfektio

Konstruointiin plasmidivektori, joka sisältää ihmisen IgG1 (Cg1) vakioalueet rajoittuneina hiiren raskas-

5 ketjuvahvistimeen (MHE) ja neomysiiniresistenssigeeniin (NEO) (kuvio 3). Plasmidi linearisoitiin uniikissa Xba I kohdassa sekvenssi-identiteetin 2,2 kb alueella, joka on yhteinen hiiren IgH-lokuksne kanssa ja transfektoitiin hybridomasolulinjaan L20, joka tuottaa hiiren IgG1-

10 vasta-ainetta, joka on spesifinen antigeenille, jota ekspressoituu pääasiassa ihmisen karsinomasoluissa seuraavasti: Kuviossa 3 kuvattu vektori linearisoitiin uniikissa Xba I kohdassa ja 50 µg käytettiin transfektoimaan 8×10^6 L20 hybridomasolua elektroporaatiolla (kuten

15 aiemmin kuvattiin aineistossa ja menetelmissä). Elävät solut pantiin levyille tiheytenä 1×10^4 (tai 1×10^3 frekvenssilaskuja varten) solua/kaivo 96-kaivoisilla levyillä IMDM 10 % FBS-alustalle, joka sisälsi 2,5 mg/ml G418. Levyjä ruokittiin 2-3 päivän välein ja 2 viikon

20 päästä kaikki kaivot seulottiin ihmisen IgG1 tuotannon suhteen käyttäen standardi ELISA-menetelmiä. Vuohen anti-ihmis IgG (Cat. nro 4132 Antibodies Inc., Davis CA) laimennoksena 1:10 000 käytettiin vangitsijareagenssina ja vuohen anti-ihmis IgH/HRP (Cat. nro HAP009 American

25 Qualex, La Miranda CA) laimennoksena 1:6000 käytettiin havaitsemiseen. Kaikki positiiviset supernatantit verifioitiin myös seuraavilla ELISA-testeillä.

Koska ihmisen IgG1 eksonit eivät ole assosioituneet muuttuvan alueen geenisegmenttiin, ihmisen IgG1 raskaiden ketjujen tuotanto voi tapahtua vain plasmidin rekombinaatiolla funktionaalisen edistimen, initiaatiokodonin ja splicing-sekvenssien kanssa. Niinpä solut, jotka selviytyivät valinnasta G418 sisältävässä alustassa (eli kaikki ne, jotka tyydyttävästi integroivat

35 plasmidin) analysoitiin ihmisen IgG1 tuotannon suhteen ELISA:lla (taulukko I).

Taulukko I

Ihmisen IgG1 tuotantoon johtavien integraatiotapahtumien
frekvenssi

5

Int. tapahtu- mia	Seulottu- ja kaivo- ja	Tapahtu- mia yh- teensä	Kaivoja HU IgG1:llä	Frekv. per kaivo
2,2	480	1056	8	0,75 %

10

Transfektiosekvenssi määritettiin maljoittamalla pienempänä tiheytenä ja ihmisen IgG1 tuotantoon johtavien integraatiotapahtumien frekvenssin todettiin siksi olevan luokkaa 1 132:sta tai 0,75 %. Myöhemmät kokeet samoilla soluilla ja plasmideilla johtivat ihmisen IgG:n tuotantoon 2:ssa 512:sta integraatiosta tai 0,39 % - nämä viittaavat siihen, että keskimääräinen frekvenssi olisi lähempänä 0,5 % kiintoisasti, jopa kloonauksen jälkeen useimpien solulinjojen havaittiin tuottavan sekä hiiren että ihmisen IgG1, vaikka satunnaisesti klooneja eristettiin, jotka tuottivat yhtä tai toista näistä (taulukko II). Soluja emokaivoista, jotka tuottivat ihmisen IgG1 pantiin rajoittavaan laimennokseen ja 12 kloonista kustakin vanhemmasta määritettiin ihmisen IgG1 (huIgG1) (kuten kuvattiin taulukolle I) ja hiiren IgG tuotannon suhteen. Hiiren IgG (mIgG) -määritykset suoritettiin käyttäen vuohen anti-hiiri IgG (Cat nro1070 Southern Biotech, Birmingham AL) ja vuohen anti-hiiri Kappa/HRP (Cat nroOB1141-85 Fisher Biotech, Orangeburg NY) van-
gitsija- ja havaintoreagensseinä. Tulokset esitetään taulukossa II. Annetut numerot ovat klooneista, jotka tuottavat ihmisen, hiiren tai molempien vasta-ainetta.

25

30

Taulukko II

Ihmisen ja hiiren IgG1 tuotanto klooneissa ihmisen IgG1 tuottavista L20 transfektanteista

5	<u>Vanhempi</u>	<u>huIgG1</u>	<u>mIgG</u>	<u>huIgG1/mIgG</u>
	7C5	0	0	12
	7E6	1	0	11
	8D6	0	0	12
	8F8	2	2	8
10	8H12	1	0	11
	10G3	0	2	10
	9F11	0	1	11
	9F12	1	0	11

15

Ekspressoidun kimeerisen L20 raskaan ketjun
karakterisointi

Western Blot -analyysi

Ihmisen raskaan ketjun osoitettiin olevan serologisesti erotettavissa ja odotetulla kokoalueella valikoidujen kloonien supernatanttien Western blot -analyysillä seuraavasti: kasvun tasaista vaihetta lähenevät viljelmät pestiin ja suspensoitiin uudelleen seerumittomaan alustaan. 24 tunnin kuluttua supernatantit kerättiin, dialysoitiin 0,1 M NH₄OAc vasten, lyofilisoitiin ja suspensoitiin uudelleen 5 mM Trisiin, pH 6,8. Annoksia näistä näytteistä ja vanhemmaissolulinjasta L20 sekä puhdistetusta vasta-aineesta 2H9 (ihmisen IgG1 proteiini) ja puhdistetusta L20 IgG1 denaturoitiin keittämällä beta-merkaptetoetanolin läsnä ollessa ja elektroforoitiin gradienttiakryyliamidigeelin läpi, joka vaihtui 10:stä 20 %:iin. Geeli siirrettiin nitroselluloosapaperille elektroforeettisesti. Syntyvä suodatin blokattiin 2 % rasvattomalla kuivamaidolla PBS:ssä, värjättiin vuohen anti-ihmis IgG/HRP:llä (nro 10501 CALTAG, San Francisco CA) ja kehitettiin 30 mg:lla 4-kloori-1-naftolilla (Sigma, St. Louis MO) Tris-puskuroidussa suolaliuoksessa.

Virtaussytometrinen analyysi

Sekä ihmisen että hiiren IgG1:n osoitettiin myös olevan antigeenispesifisiä virtaussytometrialla (taulukko III) seuraavasti: Western bloteihin käytetyt näytteet

5 analysoitiin ELISA:lla ihmisen ja hiiren IgG1-konsentraation määrittämiseksi. Tehtiin laimennoksia konsentraatioiden säätämiseksi ($\mu\text{g/ml}$) virtaussytometriseen analyysiin sopiviksi. Viisi $\times 10^5$ solua ihmisen tuumorilinjoista 2981 tai 3347 (Hellstrom et. al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci.

10 USA 83:7059-7063) inkuboitiin mainittujen L20-vasta-aineiden läsnä ollessa (tai alustan) 30 minuuttia 4°C :ssa, pestiin 2 x ja värjättiin 1:50 laimennoksella (alustassa), joko vuohen anti-ihmis IgG/FITC (fluoreskeiini-isotiosyanaatti) (CALTAG, San Francisco CA) tai vuohen anti-hiiri

15 IgG/FITC (TAGO, Burlingame CA - raskas- ja kevytketjuspesifillä) 30 minuuttia 4°C :ssa. Nämä valmisteet pestiin sitten kahdesti, suspensoitiin uudelleen ja analysoitiin virtaussytometrisesti suhteellisen fluoresenssin suhteen. Tulokset esitetään taulukossa III. Annetut arvot ovat kun-

20 kin preparaatin lineaarifluoresenssiekvivalenssi (LFE).

Taulukko III

Hiiren ja raskasketjuisten kimeeristen L20 vasta-aineiden
antigeenispesifisyys

	Kloonit	Ab conc		LFE	
		huIgG	mIgG	2981 Kohde	
				<u>α-hu</u>	<u>α-m</u>
	7E6-10	1,0	0	35	6
	8H12-8	1,0	0	38	7
10	8F8-8	1,0	0,5	39	11
	9H12-1	1,0	0,1	42	7
	8F8-10	0	0,4	2	10
	10G3-5	0	1,0	2	31
	mL20	0	1,0	2	18
15	alusta	0	0	2	2
				3347 Kohde	
				<u>α-hu</u>	<u>α-m</u>
	7E6-10	0,4	0	7	3
20	mL20	0	0,4	2	3
	alusta	0	0	2	2

Niinpä vanhemmais L20 solulinja mitä luultavimmin
säilyttää kaksi kopiota produktiivisesta raskasketjuises-
ta alleelistä, joista vain yhdelle tapahtuu spesifinen
rekombinaatio tietyssä solussa. Tuotantomäärien vain
kimeeristä vasta-ainetta ekspressoivilla soluilla ha-
vaittiin olevan luokkaa 5-10 $\mu\text{g/ml}$ 10 ml viljelmäsuperna-
tanteissa kasvun tasaisessa vaiheessa.

Southern blot -analyysi

Southern blot -analyysi käyttäen koetinta, joka
on spesifinen ihmisen C γ 1:lle osoitti yhteisiä integraa-
tiospesifejä fragmentteja kaikkien ihmisen IgG1 tuotta-
vien solulinjojen välillä kolmella eri entsyymillä. Bam HI
kohta kartoitettiin 1,4 kb ylävirtaan kohdesekvenssistä

L20 vanhemmaislinjassa, siksi rekombinaatiovektorin lisäämisen kohdepaikkaan odotetaan tuottavan 5,5 kb Bam HI -fragmentti, joka hybridisoituu huC γ 1 koettimeen. Sellainen fragmentti havaittiin kaikissa kolonneissa, jotka tuottavat ihmisen IgG1.

ADCC -analyysi

Hiiren L20 IgG1 vasta-ainetta verrattiin proteiiniin, jossa on kimeerinen raskas ketju aktiivisuuden suhteen ADCC-määrittäksessä (Hellstrom et. al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502). Kuten voidaan nähdä tuloksista taulukossa IV, raskasketjuisten vakioalueiden vaihtaminen ihmisen IgG1:n vastaaviin tuottaa uuden efektorifunktion tähän spesifiteettiin.

Taulukko IV

2981 kohdesolun ADCC välitettynä hiiren MAb L20:llä ja kimeerisellä raskasketjuisella L20

	Immunoglobuliini	Konsentraatio (μ g/ml)	2981 kohde- solun ADCC
20	L20 8F8-8	4	58 %
	L20 7E6-10	8	53 %
	MAb L20	10	31 %
	Ei mitään*	0	31 %

* Vain efektorisoluja (lymfosyyttejä)

Kimeerinen L20 raskas ketju tuotettuna eri kohdevektoria käyttäen

Lisäesimerkeissä olemme käyttäneet toista plasmidia, joka on kuvattu kuviossa 4A viemään ihmisen C γ 1 eksonit hiiren hybridoomasoluihin L20, mistä seuraa ihmisen IgG1 kimeeristen raskasketjuisten proteiinien tuotantoon. Plasmidi 4A transfektoitiin hybridoomasolulinjaan L20 saaden 4 kalvoa tuottamaan huIgG noin 700 integraatiotapauksen ELISA-määrittäksessä.

Kimeeristen G28.1 raskaiden ketjujen konstruktio

Tässä esimerkissä olemme käyttäneet kuvion 3 esittämää plasmidia muuntamaan hiiren hybridoomasolulinja G28.1 (Ledbetter et. al., Leukocyte typing III, A. J. McMichael, toim., Oxford Univ. Press ss. 339-340 (1987)) antigeenispesifisen ihmisen IgG1 raskaan ketjun tuotantoon samalla menetelmällä. Tehty yksi koe tuotti 4 huIgG1 tuottajaa 864 integraatiotapauksesta. Nämä solulinjat identifioitiin ELISA:lla, verifioitiin ja testattiin sitten kyvyn suhteen sitoa tonsili B soluja seuraavasti: Ihmisen tonsili B soluja inkuboitiin supernatantilla esitetyistä solulinjoista (tai alustalla), pestiin ja vastavärjättiin joko vuohen anti-ihmis IgG:llä (α hu) tai vuohen anti-hiiri IgG:llä (α m) kuten aiemmin on kuvattu ja analysoitiin virtaussytometrialla. Tulokset esitetään taulukossa V. Supernatantit mitattiin ELISA:lla hiiren ja ihmisen IgG:n suhteen ja arvot annettiin ng/ml. Fluoresenssitiedot annetaan lineaarisina fluoressenssiekvivalentteina.

20

Taulukko V

Raskasketjuisten kimeeristen G28.1 supernatanttien
antigeenispesifisyys

25

	<u>Solulinja</u>	<u>huIgG</u>	<u>mIgG</u>	<u>LFE</u> <u>α-hu</u>
	11F10	0	87	9
	1F11	97	89	93
	4F5	86	91	38
30	3D2	90	86	77
	3D11	56	85	16
	Alusta	0	0	9
				<u>α-m</u>
35	<u>G28.1</u>	0	83	53
	Alusta	0	0	3

Tulokset osoittavat jälleen antigeenispesifisyyden säilymisen vasta-ainemolekyyllissä, joka sisältää ihmisen IgG1 kimeerisen raskaan ketjun.

Kimeeristen L6 raskaiden ketjujen konstruktio

5 Kuviassa 4B kuvattu rekombinanttikohdeplasmidi transfektoitiin hiiren hybridoomasolulinjaan L6, mistä seurasi yksi solulinja, joka tuotti klooneja, jotka sta-
biilisti tuottivat kimeeristä raskasta ketjua (hiiren
10 raskaan ketjun puuttuessa). Vasta-aineen osoitettiin si-
toutuvan ihmisen tuumorisoluihin ja välittää tuhoutumis-
ta ADCC:n välityksellä ihmisen efektorisoluilla tehok-
kaammin kuin hiiren L6 (taulukko VI), mikä on verrattavis-
sa raskas- ja kevytketjuiseen kimeeriseen L6:teen tuotet-
tuna tavanomaisilla rekombinanttitekniikoilla (patentti-
15 hakemus nro 684 759, jätetty 21.12.1984 ja patenttihakemus
nro 776 321, jätetty 18.10.1985 ja niihin sisältyvät
viitteet).

Taulukko VI

20

	Konsentraatio	3347 kohde-
<u>Immunoglobuliini</u>	<u>(µg/ml)</u>	<u>solun ADCC</u>
L6 7B7.16	0,01	83 %
L6 7B7.7	0,01	82,5 %
25 MAb L6	0,01	58 %
Ei mitään*	0,01	53 %

* Vain efektorisoluja (lymfosyyttejä)

30

Southern blotit varmistivat 10 kb Ava I -fragmen-
tin ja 8 kb Bgl II -fragmentin läsnäolon, jotka molem-
mat hybridoituvat huCgl koetttimeen. Nämä fragmentit ovat
konsistentteja vektoriplasmidin lisäämisessä kohdepaik-
kaan perustuen aiempaan kloonatun genomisen L6 raskas-
35 ketjuisen muuttuvan alueen geenisegmentin kartoitukseen.

Tätä keksintöä ei ole tarkoitus rajata esimerk-
kien kuvaamiin toteutustapoihin, jotka on tarkoitettu
ainoastaan kuvauksiksi keksinnön eri puolista ja mitkä
tahansa menetelmät, jotka ovat funktionaalisesti vastaa-
5 via kuuluvat tämän keksinnön piiriin. Todellakin, eri-
laiset keksinnön muunnelmät tässä kuvattujen lisäksi
ovat selviä alaa taitaville edellisestä kuvauksesta.
Sellaisten muunnosten tarkoitetaan kuuluvan liitteenä
olevien patenttivaatimusten puitteisiin.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä muunnettua vasta-ainemolekyyliä ekspressoivan solulinjan tuottamiseksi, t u n n e t t u
5 siitä, että
- a) transfektoidaan vasta-ainetta tuottava imusolulinja kohdevektorilla, joka sisältää
- (i) korvausgeenin imusolulinjan immunoglobuliinigeenien genomisekvenssin osan muuntamiseksi ja
10 (ii) kohdesekvenssin, joka on homologinen toiselle, muunnettavan immunoglobuliinisekvenssin vieressä olevalle DNA-sekvenssille,
- siten, että korvausgeeni muuntaa immunoglobuliinisekvenssin kohdespesifisellä, homologisella rekombinaatiolla genom
15 in kromosomaalisen DNA:n kanssa in vivo; ja
- b) valitaan transfektantti, joka tuottaa muunnettua vasta-ainemolekyyliä.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että muunnettava immunoglobuliinisekvenssi sisältää vakioaluegeenin tai sen osan.
20
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että korvausgeeni koodaa toisen immunoglobuliinin vakioaluetta tai sen osaa.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että muunnettava immunoglobuliinisekvenssi sisältää muuttuvan alueen geenin tai sen osan.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että muunnettava immunoglobuliinisekvenssi sisältää raskaan ketjun geenin.
30
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdesekvenssi on homologisen muunnettavan raskaan ketjun geenin viereisille J-alueelle tai introneille.
- 35 7. Menetelmä muunnetun vasta-ainemolekyylin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään muunnettua vasta-ainetta tuottavaa solulinjaa, joka valmistettiin transfektoimalla vasta-ainetta tuottava imusolulinja kohdevektorilla, joka sisältää:

5 (i) korvausgeenin imusolulinjan immuno-globuliinigeenien genomisekvenssin osan muuntamiseksi, ja

 (ii) kohdesekvenssin, joka on homologinen toiselle, muunnettavan immunoglobuliinisekvenssin vieressä olevalle DNA-sekvenssille,
10 siten, että korvausgeeni muuntaa immunoglobuliinisekvenssiä kohdespesifisellä, homologisella rekombinaatiolla genomin kromosomaalisen DNA:n kanssa in vivo; ja transfektoitu solulinja ekspressoii muunnettua vasta-ainetta; ja

 b) eristetään muunnettu vasta-ainemolekyyli viljelmästä.
15

8. Patenttivaatimuksen 1 tai 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että muunnettava vasta-ainemolekyyli sisältää muuttuvan alueen hiirestä ja vakioalueen ihmisestä.

20 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transfektoitava imusolulinja on imusolulinja ATCC HB8677, joka tuottaa monoklonaalista vasta-ainetta L6.

 10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että transfektoitava imusolulinja on imusolulinja ATCC HB8913, joka tuottaa monoklonaalista vasta-ainetta L20.

 11. Kohdevektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää

30 (i) korvausgeenin imusolulinjan immunoglobuliinigeenien genomisekvenssin osan muuntamiseksi, ja

 (ii) kohdesekvenssin, joka on homologinen toiselle, muunnettavan immunoglobuliinisekvenssin vieressä olevalle DNA-sekvenssille.

Patentkrav

1. Förfarande för producering av en cellinje som
expresserar en modifierad antikroppmolekyl, k ä n n e -
5 t e c k n a t av, att man

a) transfekterar en antikroppproducerande lymfcell-
linje med en målvektor vilken innehåller

(i) en ersättningsgen för modifiering av en genom-
sekvensdel av lymfcellinjens immunoglobulingener och (ii)
10 en målsekvens vilken är homologisk med en andra DNA-sek-
vens som befinner sig intill immunoglobulinsekvensen som
skall modifieras,
så att ersättningsgenen modifierar immunoglobulinsekven-
sen med målspecifik, homologisk rekombination med geno-
15 mens kromosomala DNA in vivo; och

b) väljer en transfektant som producerar en modi-
fierad antikroppmolekyl.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att immunoglobulinsekvensen som skall
20 modifieras innehåller en gen för ett konstant område el-
ler ett fragment därav.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e -
t e c k n a t av att ersättningsgenen kodar ett konstant
område av en andra immunoglobulin eller ett fragment dä-
25 rav.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att immunoglobulinsekvensen som skall
modifieras innehåller en gen för ett varierande område
eller ett fragment därav.

30 5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t av att immunoglobulinsekvensen som skall
modifieras innehåller en gen för en tung kedja.

6. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e -
t e c k n a t av att målsekvensen är homologisk med J-
35 regioner eller introner vilka befinner sig intill genen
för den tunga kedjan som skall modifieras.

7. Förfarande för framställning av en modifierad antikroppmolekyl, k ä n n e t e c k n a t av att man

5 a) odlar en cellinje som producerar en modifierad antikropp och som framställdes genom transfektering av en lymfcellinje vilken producerar antikroppen med en målvektor vilken innehåller

(i) en ersättningsgen för modifiering av en genomsekvensdel av en lymfcellinjes immunoglobulingener och

10 (ii) en målsekvens vilken är homologisk med en andra DNA-sekvens som befinner sig intill immunoglobulinsekvensen som skall modifieras,

så att ersättningsgenen modifierar immunoglobulinsekvensen med målspecifik, homologisk rekombination med genomens kromosomala DNA in vivo; och den transfekterade cellinjen expresse-
15 rar den modifierade antikroppen; och

b) separerar den modifierade antikroppmolekylen från odlingen.

8. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 7, k ä n n e t e c k n a t av att antikroppmolekylen som skall
20 modifieras innehåller ett varierande område från en mus och ett konstant område från en människa.

9. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att lymfcellinjen som skall transfekteras är lymfcellinjen ATCC HB8677, vilken producerar en
25 monoklonal antikropp L6.

10. Förfarande enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k n a t av att lymfcellinjen som skall transfekteras är lymfcellinjen ATCC HB8913, vilken producerar en monoklonal antikropp L20.

30 11. Målvektor, k ä n n e t e c k n a t av att den innehåller

(i) en ersättningsgen för modifiering av en genomsekvensdel av lymfcellinjens immunoglobulingener och

35 (ii) en målsekvens vilken är homologisk med en andra DNA-sekvens som befinner sig intill immunoglobulinsekvensen som skall modifieras.

FIG. 1

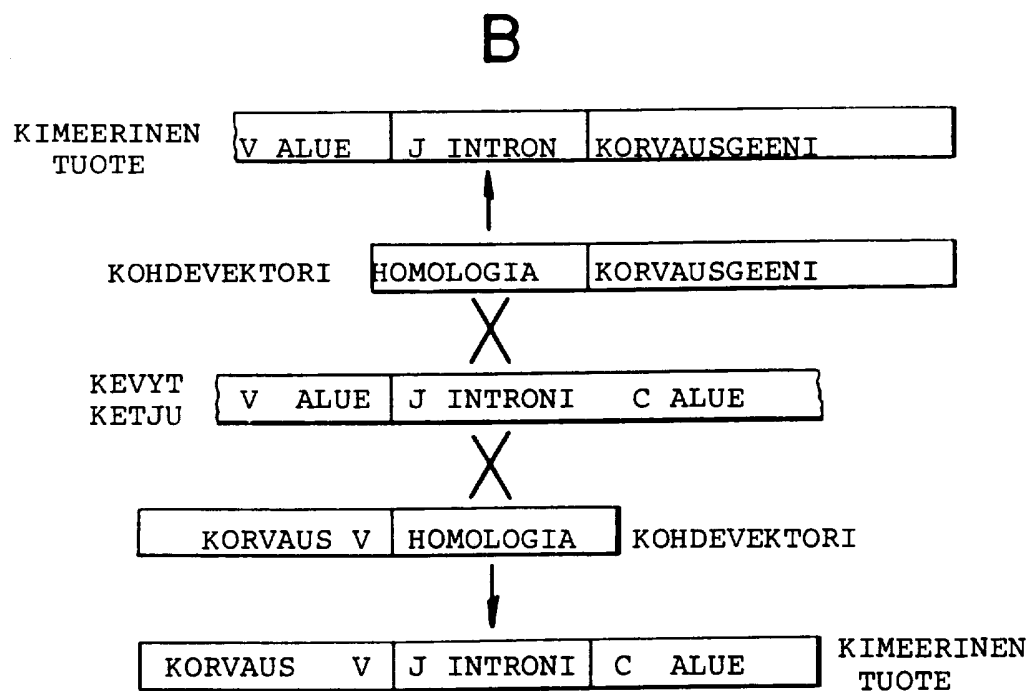
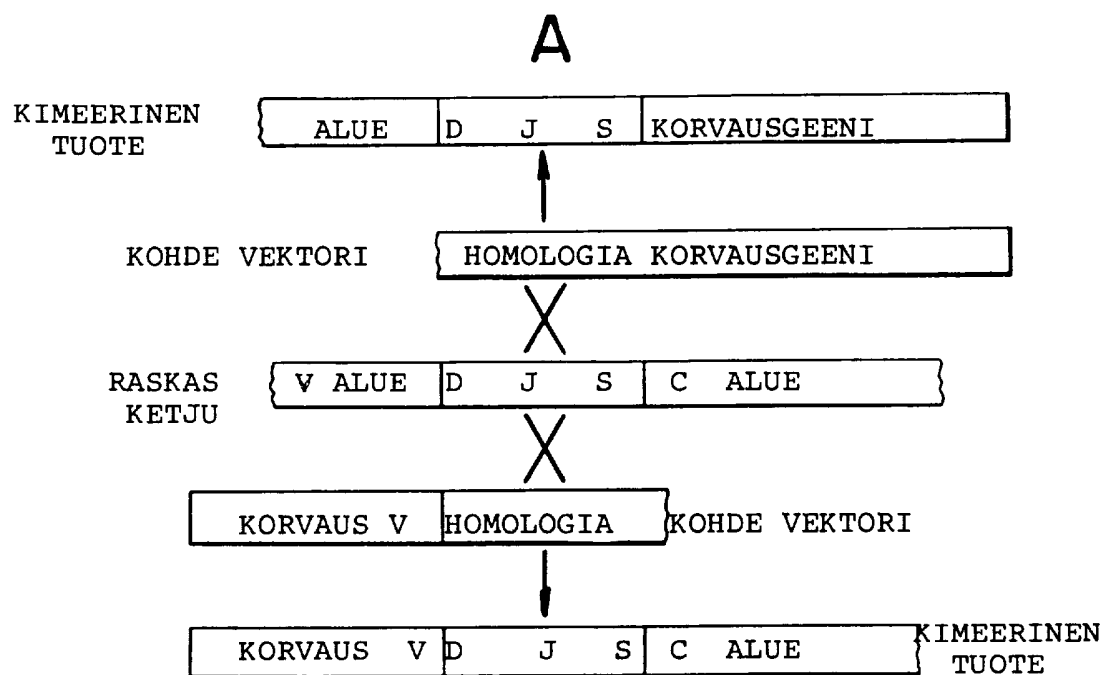


FIG. 1 (JATKOA)

C

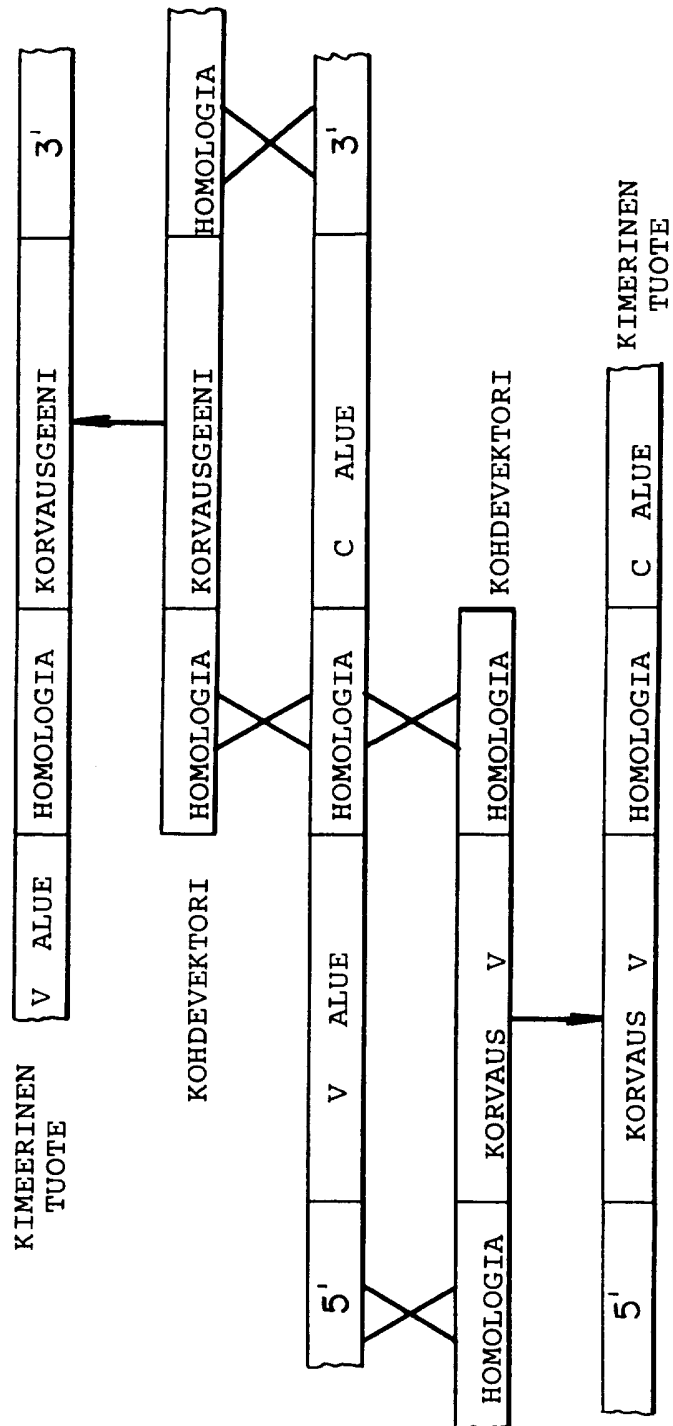


FIG. 2

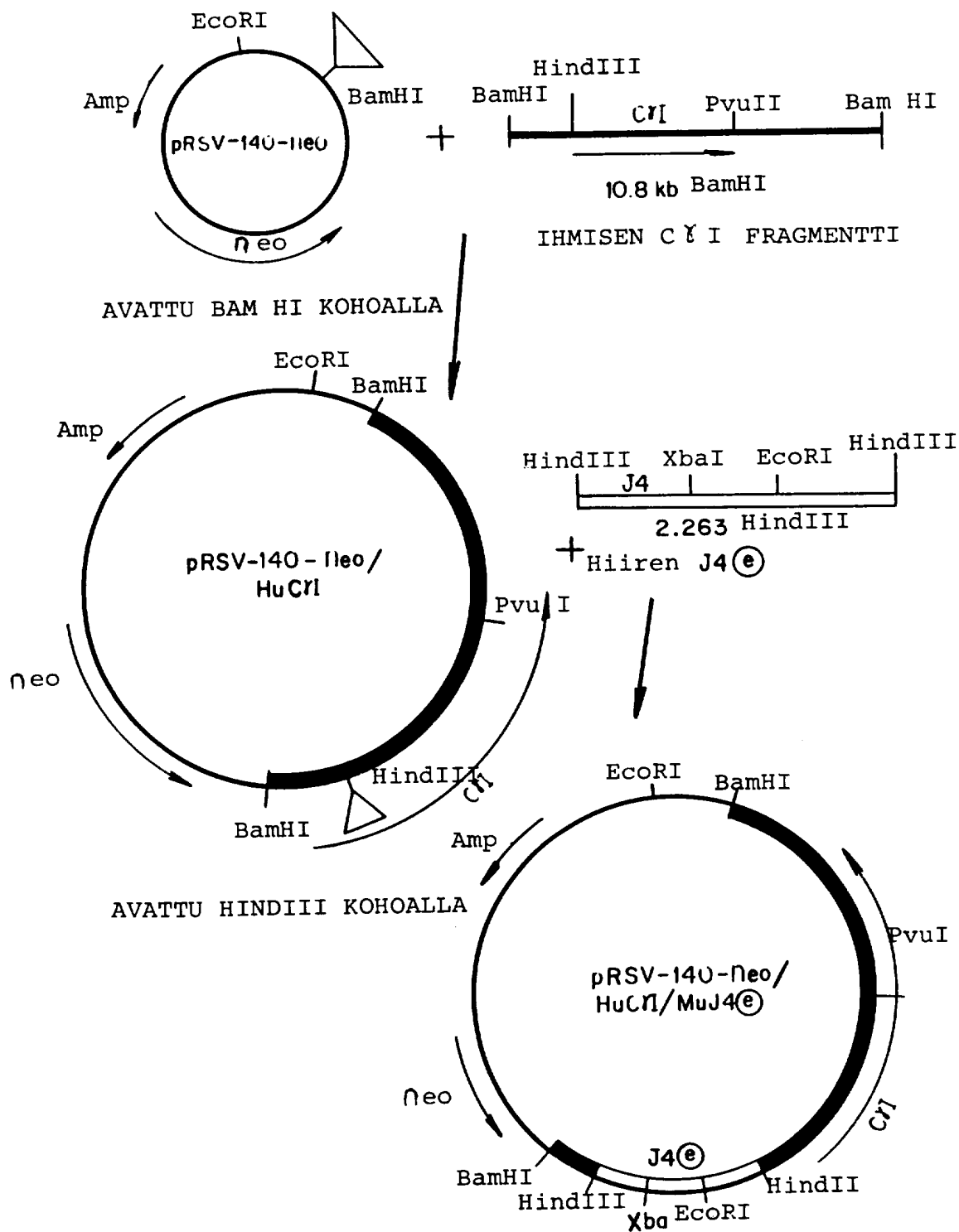


FIG. 3

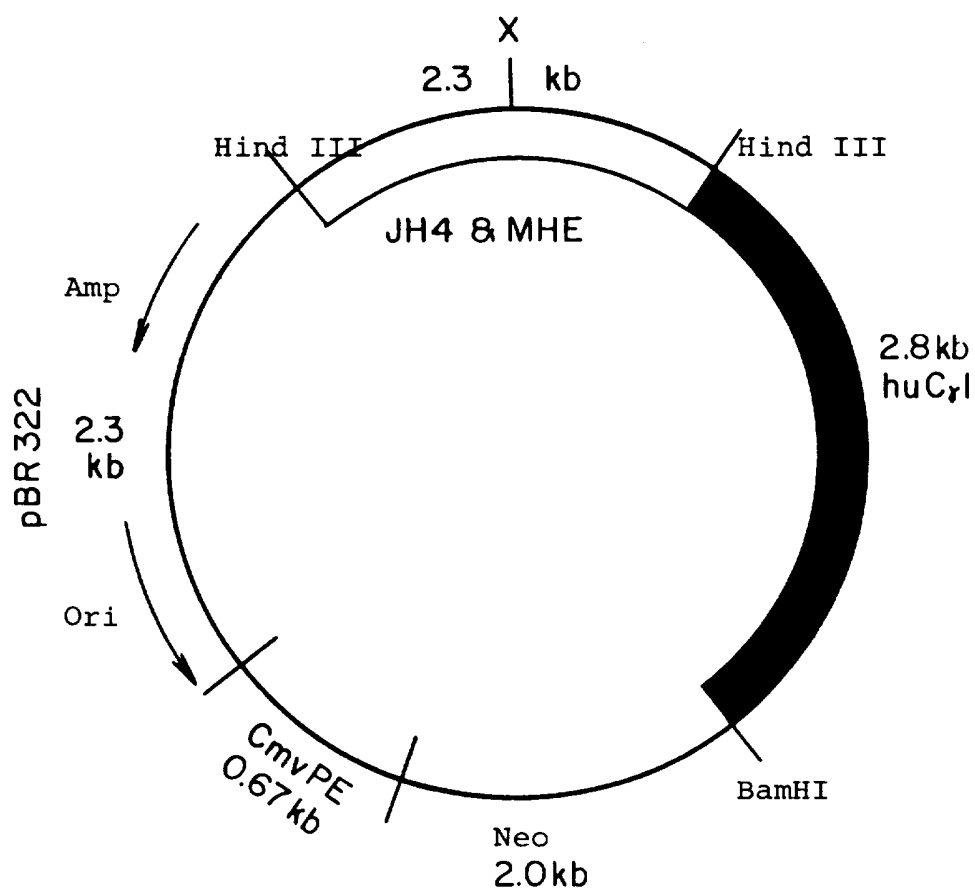


FIG. 4A

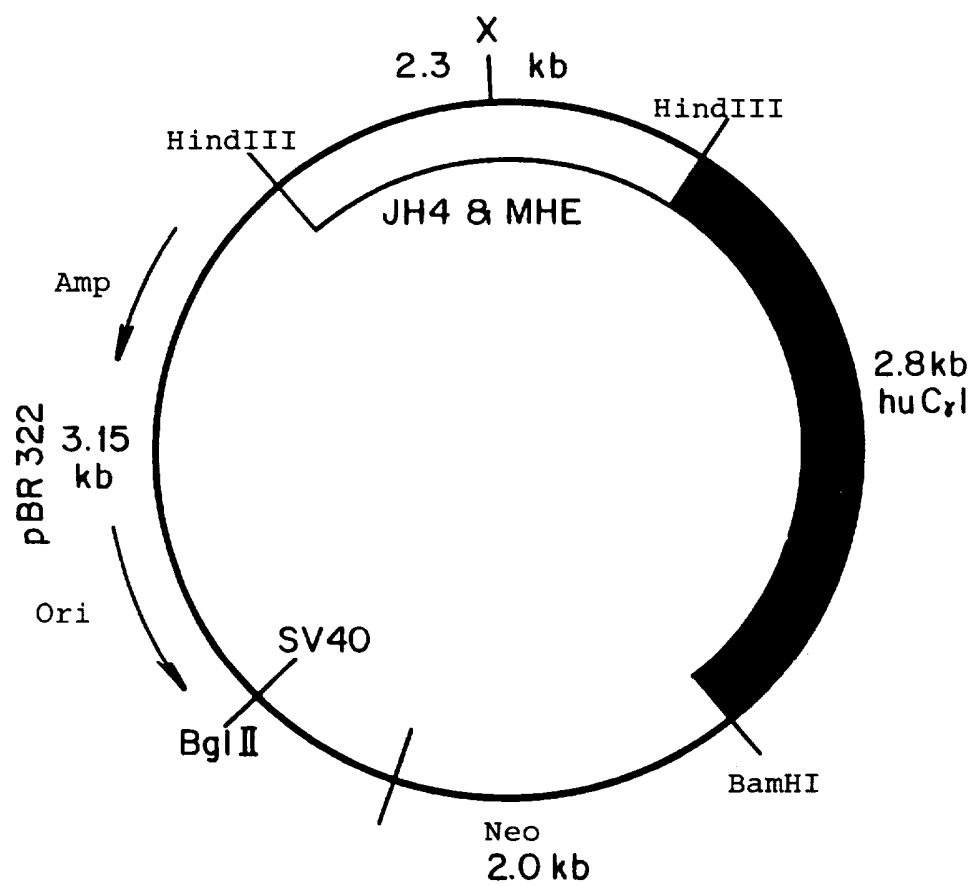


FIG. 4B

