(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 960743 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 960743

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 14/52
C07K 16/24
C07K 19/00
C12N 15/19
C12N 15/62
C12N 15/13

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **17.08.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.02.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **19.02.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **17.08.1994 PCT/US1994/009282**

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

20.08.1993 US 109745
03.12.1993 US 161132
30.08.1993 US 114426
09.05.1994 US 240124

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Immunex Corporation, 51 University Street, Seattle, WA 98101, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Beckmann, Mary Patricia, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Cerretti, Douglas Pat, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Sytokiineja, jotka sitoutuvat solun pinnan hekreseptoriin
Cytokiner som binder sig till cellytans hekreceptor

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

69384 ATCC 69395 ATCC

Sytokiineja, jotka sitoutuvat solun pinnan hek-reseptoriin

Keksinnön tausta

Proteiineilla, joista käytetään nimitystä reseptorityrosiinikinaasit, on ligandin sitoutumisen jälkeen aktivoituvaa sisäistä kinaasiaktiivisuutta. Tälle proteiinien ryhmälle ovat tunnusomaisia katalyyttisten domeenien alueella esiintyvät säilyneet rakenteelliset ryhmittymät (motif) [Hanks, et al., Science 242 (1988) 42] ja kyseiset proteiinit voidaan jakaa alaryhmiin katalyyttisen domeenin suhteen 5'-puolella olevien alueiden rakennepiirteiden perusteella.

Boyd, et al. [J. Biol. Chem. 267 (1992) 3262] ovat puhdistaneet solun pinnan glykoproteiinin, jossa esiintyy tyrosiinikinaasiaktiivisuutta. Tämä proteiini tunnistettiin eph/elk-ryhmän jäseneksi N-terminaalisen aminohapposekvenssin perusteella ja tälle proteiinille annettiin siten nimitys hek (eph/elk:ta muistuttava humaanikinaasi). Hek:n kanssa immunologisesti reagoivaa monoklonaalista vasta-ainetta käytettiin hek:n ilmentymisen tutkimiseen useista humaanisolutyypeistä (Boyd, et al., edellä). Hek-antigeeni havaittiin humaani-esi-B-soluleukemiasolulinjassa LK63 (solulinjassa, jota käytettiin immunogeeninä, jota vastaan vasta-aine oli muodostettu) ja humaani-T-soluleukemialinjassa JM. Hek-antigeeni osoittautui ilmentyvän heikosti Raji B -lymfoomasolulinjassa ja jäljelle jääneet tutkitut solulinjat (nämä olivat sekä normaaleja solulinjoja että tuumorisolulinjoja, joihin kuului esi-B- ja -T-solulinjoja sisältäviä hemopoieettisia solulinjoja), antoivat yhdenmukaisen negatiivisen tuloksen. Niistä normaaleista biopsianäytteistä ja tuumorikudosbiopsianäytteistä, joista myös hek-antigeenin ilmentyminen tutkittiin, ei mikään normaalikudos ollut positiivinen ja hemopoieettisista tuumoreista ainoastaan hyvin pieni osa antoi positiivisen tuloksen.

Hek:n transkriptiotuotteiden on osoitettu ilmentyvän edellä kuvatuissa LK63- ja JM-solulinjoissa sekä humaani-T-soluleukemialinjassa HSB-2 northern-blottianalyysillä [Wicks, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1611]. Eristetyn hek-cDNA-kloonin nukleotidisekvenssi ja aminohapposekvenssi on esitetty julkaisussa Wicks, et al., edellä.

Hek-proteiini muistuttaa hyvin läheisesti useita muita reseptorityrosiinikinaaseja, joita ovat elk [Letwin, et al., Oncogene 3 (1988) 621 ja Lhotak, et al., Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 2496]; hek-homologit mek4 ja cek4 [Sajjadi, et al., New Biol. 3 (1991) 769]; eek [Chan, et al., Oncogene 6 (1991) 1057]; erk (Chan, et al., edellä), eck [Lindberg, et al., Mol. Cell. Biol. 10 (1990) 6316]; cek5 [Pasquale, E.B., Cell Regulation 2 (1991) 523]; ja eph [Hirai, et al., Science 238 (1987) 1717]. Tämän alaryhmän proteiinit eivät muistuta ainoastaan toisiaan sytoplasmisilta domeeneiltaan vaan myös solunulkoisilta domeeneiltaan, jotka ovat 41 - 68-%:isesti identtisiä. On mielenkiintoista panna merkille, että näiden useiden eri reseptorien jakautuminen kudoksiin on hyvin erilaista. Elk:n mRNA:n ilmentymisen on esimerkiksi raportoitu rajoittuvan kiveksiin ja aivoihin (Lhotak, et al., edellä), kun taas eck ei ainoastaan esiinny näissä samoissa kahdessa kudoksessa, vaan myös keuhkoissa, suolistossa, munuaisissa, pernassa, munasarjoissa sekä ihossa.

Reseptorityrosiinikinaasien ligandit ovat sellaisten eri tahoille suuntautuneiden proteiinien ryhmä, jotka vaikuttavat näitä reseptoreja ilmentävien solujen kasvuun, erilaistumiseen ja elossa pysymiseen. Tähän päivämäärään mennessä ei hek:lle ole löydetty ligandia. Jos hek:ia sitova otaksuttava ligandi tai ligandit saataisiin tunnistettua, niin tällainen saattaisi osoittautua käyttökelpoiseksi hek-proteiinin säätelemien solutason ilmiöiden luonteen tutkimisessa.

Keksinnön yhteenveto

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön hek:n ligandeiksi (hek-L) nimitettyjä uusia sytokiineja, jotka sitoutuvat hek:ksi nimitettyyn solun pinnan reseptoriin. Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön hek-proteiineja koodaava eristetty DNA, eristettyä DNA:tä sisältäviä ilmentämisvektoreita ja menetelmä hek-L:n valmistamiseksi viljelemällä näitä ilmentämisvektoreita sisältäviä isäntäsoluja sellaisissa asiaankuuluvissa olosuhteissa, jotka mahdollistavat hek-L-proteiinin ilmentymisen. Keksinnössä on myös kuvattu hek-L-proteiineja tai tämän immunogeenistä fragmenttia vastaan suunnattuja vasta-aineita.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämän keksinnön mukaisesti on eristetty sellaisia uusia proteiiniligandeja koodaavia cDNA-molekyylejä, jotka sitoutuvat hek:na tunnettuun solun pintaproteiiniin. Keksinnöstä saadaan myös käyttöön hek:n ligandin (hek-L:n) cDNA:ta sisältäviä ilmentämisvektoreita ja menetelmiä yhdistelmä-hek-L-polypeptidien tuottamiseksi viljelemällä näitä ilmentämisvektoreita sisältäviä isäntäsoluja hek-L:n ilmentymisen mahdollistavissa olosuhteissa ja ottamalla ilmentynyt hek-L talteen. Tämä keksintö kattaa myös puhdistetun hek-L-proteiinin, mukaan lukien proteiinin liukoiset muodot.

Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön hek-L tai tämän antigeenisiä fragmentteja, jo(t)ka voi(vat) toimia immunogeen(e)inä hek-L-immunogeenien suhteen spesifisten vasta-aineiden aikaansaamiseksi. Voidaan siten valmistaa hek-L:lle tai tämän antigeenisille fragmenteille spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita.

Tässä keksinnössä kuvatut uudet sytokiinit ovat hek:n, solun pinnassa olevaan reseptorityrosiinikinaasien ryhmään kuuluvan reseptorin, ligandeja. Yksi tämän keksinnön mukaisten hek-ligandien käyttömuoto on niiden käyttö tutkimusvälineinä tutkimuksissa, jotka koskevat hek-L:n

mahdollista osallistumista hek:n kanssa hek-reseptoria sisältävien solujen kasvuun tai erilaistumiseen. Voidaan tutkia niitä biologisia signaaleja, joiden muodostumisen hek-L:n sitoutuminen solun pinnalla olevaan hek:iin voi käynnistää. Hek:lla on ehdotettu olevan mahdollisesti osuutta tuumorien syntyyn (Boyd, et al., edellä). Tästä keksinnöstä käyttöön saatavat hek-ligandit ovat käyttökelpoisia sen vaikutuksen tutkimiseen, mikä hek-L:n sitoutumisella omaan reseptoriinsa voi olla tuumorien syntyyn.

Tämän keksinnön mukaisia hek-L-polypeptidejä voidaan myös käyttää in vitro -olosuhteissa käytettävissä määrityksissä, jotka on tarkoitettu hek:n tai hek-L:n tai näiden välisten vuorovaikutusten havaitsemiseen. Koska hek-antigeeni on havaittu tietyissä leukeemisissa solulinjoissa, voidaan hek-L:a käyttää kantajana diagnostisten tai sytotoksisten aineiden toimittamiseen näihin soluihin. Seuraavaksi on tarkasteltu näitä ja muita hek-ligandien käyttömuotoja.

Tämän keksinnön mukaisten hek-L-proteiinien on myös havaittu sitoutuvan reseptorityrosiinikinaasiin, josta on käytetty nimitystä elk. Elk:n ovat kuvanneet Letwin, et al., Oncogene 3 (1988) 621 ja Lhotak, et al., Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 2496. Scatchardin analyysistä on käynyt ilmi, että elk:n sitoutuminen kumpaankiin hek-L-proteiiniin on kaksivaiheista, kuten esimerkissä 5 on kuvattu. Tässä keksinnössä kuvattuja hek-L-proteiineja voidaan siten myös käyttää elk:n sitomiseen esimerkiksi useissa erilaisissa määritysmenetelmissä. Esimerkissä 5 kuvattu elk-ligandi (elk-L) -proteiini on kuitenkin edullinen näissä käyttömuodoissa käytettäväksi, koska elk-L:n affiniteetti elk:n suhteen on korkea.

Esimerkissä 5 kuvatuissa sitoutumistutkimuksissa on myös käynyt ilmi, että elk-ligandi (elk-L) sitoo hek:ia (kaksivaiheinen sitoutuminen). Tätä muistuttavan proteiinin, josta käytetään nimitystä B61 [Holzman, et al., Mol.

Cell. Biol. 10 (1990) 5830], havaittiin sitovan sekä hek:ia (lineaarinen sitoutuminen) että elk:iä (kaksivaiheinen sitoutuminen). Suhteelliset affiniteetit on esitetty esimerkin 5 taulukoissa I ja II.

Sellaisten solujen tunnistamiseksi, jotka soveltuisivat käytettäväksi nukleiinihappolähtömateriaaliksi hek-L-DNA:n kloonausta koskevissa kokeiluissa, seulottiin soluista esiin ne solut, jotka kykenivät sitomaan hek:ia (tätä käytettiin humaani-hek:ia ja vasta-aineen Fc-polypeptidiä sisältävän fuusioproteiinin muodossa). Humaani-T-soluleukemiasolulinjasta saatiin positiivinen tulos hek/Fc:n sitoutumisen suhteen ja tästä valmistettiin cDNA-ilmentämiskirjasto. Seulomalla klooneista esimerkissä 3 kuvatulla tavalla esiin hek/Fc:tä sitovaa proteiinia ilmentävät kloonit onnistuttiin eristämään kaksi erillistä humaani hek-L:a koodaavaa cDNA-kloonia. SEKVENSSI ID NO:1:ssä ja SEKVENSSI ID NO:2:ssa on esitetty toisen humaani-hek-L:n cDNA-kloonin DNA-sekvenssi ja tämän koodaama aminohapposekvenssi ja SEKVENSSI ID NO:3:ssa ja SEKVENSSI ID NO:4:ssä on esitetty toisen humaani-hek-L-kloonin DNA-sekvenssi ja tämän koodaama aminohapposekvenssi. Humaani-hek-L:n cDNA-kloonien nukleotidisekvenssien ja aminohapposekvenssien vertaaminen Genbank- ja Swisspro-tietokantoihin osoitti hek-ligandien sekvenssien olevan ainutlaatuiset. Näiden kahden kloonin koodaamien hek:ia sitovien proteiinien aminohapposekvenssit ovat 38%:isesti identtisiä.

Humaani-hek-L:n cDNA eristettiin ensimmäisestä positiivisesta kloonista ja se liitettiin Stratagene Cloning Systems -yhtiöstä, La Jolla, Ca, saatavilla olevan pBLUESCRIPT® SK(-) -kloonausvektorin Bam HI -kohtaan [tämä sijaitsee monikäyttöisen kloonauskohdan (multiple cloning site) alueella]. Tulokseksi saatu E. coli DH5α -soluissa oleva yhdistelmävektori, jolle oli annettu nimitys A2/pBS, talletettiin 11.8.1993 talletuslaitokseen American Type

Culture Collection ja sille annettiin hakunumero ATCC 69384. Humaani-hek-L:n cDNA eristettiin toisesta positiivisesta kloonista ja se liitettiin pBLUESCRIPT® SK(-) -kloonausvektorin Bam HI -kohtaan. Tulokseksi saatu E. coli DH5α -soluissa oleva yhdistelmävektori, jolle oli annettu nimitys C6/pBS, talletettiin 25.8.1993 talletuslaitokseen American Type Culture Collection ja sille annettiin hakunumero ATCC 69395. Molemmat talletukset tehtiin Budapestin sopimuksen ehtoja noudattaen.

SEKVENSSI ID NO:2:n mukainen hek-L (kloonin A2 cDNA:n koodaama hek-L) sisältää N-terminaalisen signaalipeptidin (aminohapot -19 - -1), solunulkoisen domeenin (aminohapot 1 - 202) ja aminohaposta 203 alkavan C-terminaalisen hydrofobisen alueen. SEKVENSSI ID NO:4:n mukainen hek-L (kloonin C6 cDNA:n koodaama hek-L) sisältää N-terminaalisen signaalipeptidin (aminohapot -22 - -1), solunulkoisen domeenin (aminohapot 1 - 160) ja aminohaposta 161 alkavan C-terminaalisen hydrofobisen alueen.

Kloonien A2 ja C6 ilmentämien hek-L-proteiinien havaittiin kiinnittyvän solun pintaan glykosyylifosfatidyyli-inositoli (GPI) -sidoksella. GPI-membraanikiinnikkeitä (anchor), mukaan lukien näiden kemiallinen rakenne ja muokkautuminen, on kuvattu julkaisussa Ferguson, M. ja Williams, A., Ann. Rev. Biochem. 75 (1988) 285 (tämä julkaisu on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla). Tietyt proteiinit sisältävät siinä alkuperäisessä muodossa, jossa ne ovat ilmentyneet, C-terminaalisen hydrofobisen domeenin, joka sisältää signaalit GPI:n välityksellä tapahtuvaa kiinnittymistä varten. Pilkkoutumiskohta sijaitsee hydrofobisen domeenin N-terminaalisesta päästä katsottuna vastasuuntaan, usein noin 10 - 12 aminohapon verran vastasuuntaan. Translaation jälkeiseen muokkaukseen sisältyy proteiinin pilkkoutuminen tästä pilkkoutumiskohdasta. GPI-kiinnike kiinnittyy juuri paljastuneeseen muokatun kypsän proteiinin C-terminaali-

seen aminohappoon. Kun hek-L-proteiini ilmentyy hydrofobisessa domeenissa olevat GPI-kiinnittymissignaalit tunnistavissa soluissa, niin SEKVENSSI ID NO:2:n ja 4:n mukaiset täysimittaiset aminohapposekvenssit edustavat näiden proteiinien prekursorimuotoja.

Muista GPI:lla kiinnittyneistä proteiineista peräisin olevien konsensus-sekvenssien perusteella ovat tämän keksinnön mukaisten hek-L-proteiinien todennäköiset pilkkoutumiskohdat SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisten aminohappojen 194 ja 195 välissä ja sekvenssi ID NO:4:n mukaisten aminohappojen 148 ja 149 välissä. GPI-ryhmä kiinnittyy proteiinin pilkkouduttua siihen seriiniryhmään, josta on tullut muokatun proteiinin C-terminaalinen pää (SEKVENSSI ID NO:2:n mukainen aminohappo 194 ja SEKVENSSI ID NO:4:n mukainen aminohappo 148). On olemassa se mahdollisuus, että pilkkoutuminen hek-L-proteiineissa tapahtuu hydrofobisen alueen sisällä jossakin toisessa vastasuuntaan olevassa kohdassa.

Termi "hek-L" tarkoittaa tässä keksinnössä sellaisista polypeptideistä muodostuvaa ryhmää, jotka kykenevät sitomaan hek:ia ja joissa on homologiaa (tämä on edullisesti vähintään 80-%:inen homologia) SEKVENSSI ID NO:2:n tai SEKVENSSI ID NO:4:n mukaisen hek-L-proteiinin suhteen. Tämän keksinnön suojapiiriin kuuluu humaani-hek-L samoin kuin ne hek-L-proteiinit, jotka ovat peräisin muista nisäkäslajeista, joita ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta hiiri, rotta, nauta tai sika tai useat erilaiset kädellislajit. Tässä keksinnössä termi "hek-L" sisältää sekä membraaniin sitoutuneen proteiinimuodon että liukoisen (erittyneen) proteiinimuodon. Tähän keksintöön kuuluvat typistetyt proteiinit, joissa hek:ia sitova ominaisuus on säilynyt. Tällaisia typistettyjä proteiineja ovat esimerkiksi liukoinen hek-L, joka sisältää ainoastaan solunulkoisen (reseptoria sitovan) domeenin, mutta josta puuttuu hydrofobinen domeeni.

Humaani-hek-L cDNA voidaan varustaa radioaktiivisella leimalla ja käyttää koettimena muiden nisäkkäiden hek-L-cDNA-molekyylien eristämiseksi lajien välisellä hybridisaatiolla. Muiden nisäkäslajien T-soluleukemiasolulinjoista valmistetulle cDNA-kirjastolle voidaan esimerkiksi suorittaa seulonta positiivisen kloonin eristämiseksi radioaktiivista humaani-hek-L-cDNA:ta käyttäen. Vaihtoehtoisesti useista erilaisista solulinjoista eristetyille mRNA-molekyyleille voidaan northern-hybridisaatiota käyttäen suorittaa seulonta hek-L-geenin kloonaamisessa käytettävän sopivan nisäkkäiden hek-L:n mRNA-materiaalilähteen määrittämiseksi.

Vaikkakin tuonnempana olevissa esimerkeissä 2 ja 3 kuvatuissa seulontamenetelmissä käytettiin hek/Fc-fuusioproteiinia, voidaan hek:ia käyttää hek-L-proteiineja ilmentävien kloonien ja ehdokkaaksi asetettavien solulinjojen esiin poimimiseksi käytettävään seulontaan. Hek/Fc-fuusioproteiini tarjoaa kuitenkin sen edun, että se on helposti puhdistettavissa. Lisäksi kahden erillisen fuusioproteiiniketjun välille muodostuu Fc-alueiden välisiä disulfidisidoksia, mikä muodostaa dimeereitä.

Esimerkissä 1 kuvattu humaani-IgG1:n Fc-alueen muteiini voidaan korvata muiden vasta-aineiden Fc-alueilla. Muita sopivia Fc-alueita ovat sellaiset Fc-alueet, jotka voivat sitoutua suurella affiniteetilla proteiini A:han tai proteiini G:hen ja näitä ovat hiiren IgG1:n Fc-alue tai humaani IgG1:n Fc-alueen fragmentit, esimerkiksi ainakin ketjujen välisten disulfidisidosten muodostumiseen johtavan sarana-alueen sisältävät fragmentit.

Yhdestä tämän keksinnön sovellutusmuodosta saadaan käyttöön liukoisia hek-L-polypeptidejä. Liukoiset hek-L-polypeptidit sisältävät natiivin hek-L:n kokonaisen solunulkoisen domeenin tai tämän osan, mutta niistä puuttuu hydrofobinen alue, joka sisältää signaaleja, jotka saattaisivat saada aikaan polypeptidin jäämisen kiinni solu-

membraaniin. Liukoiset hek-L-polypeptidit sisältävät erittymisen edistämiseksi edullisesti natiivin (tai heterologisen) signaalipeptidin siinä alkuperäisessä muodossa, jossa ne ovat syntetoituneet, mutta signaalipeptidi pilkkoutuu hek-L:n erityttyä solusta. Niissä liukoisissa hek-L-polypeptideissä, joiden käyttö voi tulla kysymykseen, on säilynyt kyky sitoutua hek-reseptoriin. Liukoiseen hek-L:iin voi myös sisältyä osa hydrofobisesta alueesta edellyttäen, että liukoinen hek-L-proteiini kykenee erittymään.

Liukoinen hek-L voidaan tunnistaa (ja erottaa liukenemattomasta membraaniin sitoutuneesta vastineistaan) erottamalla haluttua proteiinia ilmentävät kokonaiset solut viljelymediumista esimerkiksi sentrifugoimalla ja määrittämällä mediumista (supernatantista) halutun proteiinin esiintyminen. Jos hek-L:a löytyy mediumista, merkitsee tämä sitä, että proteiini on erittynyt soluista ja on siten halutun proteiinin liukoinen muoto. Liukoinen hek-L voi olla tämän proteiinin luonnossa esiintyvä muoto, joka on toisin sanoen syntynyt vaihtoehtoisesta silmukoitumisesta. GPI:hin liittynyt hek-L voi lisäksi vapautua tai irrota solun pinnasta viljelymediumiin esimerkiksi proteaasin tai jonkin muun entsyymin vaikutuksesta.

Hek-L:n liukoisten muotojen käyttö on edullista tiettyjen sovellutusten kyseessä ollessa. , Koska liukoiset proteiinit erittyvät yhdistelmäisäntäsoluista, niin tämä edistää proteiinien puhdistamista näistä soluista. Liukoiset proteiinit soveltuvat tavallisesti muita proteiineja paremmin suonensisäisesti annosteltaviksi.

Esimerkkejä liukoisista hek-L-polypeptideistä ovat polypeptidit, jotka sisältävät natiivin hek-L-proteiinin kokonaisen solunulkoisen domeenin. Yksi tällainen liukoinen hek-L-proteiini sisältää SEKVENSSI ID NO:2:n mukaiset aminohapot 1 - 202 ja toinen sisältää SEKVENSSI ID NO:4:n mukaiset aminohapot 1 - 160. Liukoinen proteiini voi siinä

alkuperäisessä muodossa, jossa se on ilmentynyt isäntäsolussa, sisältää lisäksi yhden käytetyssä isäntäsolussa toiminnallisen ja tuonnempana kuvatun heterologisen signaalipeptidin. Vaihtoehtoisesti proteiini voi sisältää alkuperäisessä muodossaan sellaisen natiivin signaalipeptidin, että hek-L sisältää SEKVENSSI ID NO:2:n mukaiset aminohapot -19 - 202 tai SEKVENSSI ID NO:4:n mukaiset aminohapot -22 - 160. Liukoiset hek-L-proteiinit voivat myös olla sillä tavoin typistettyjä, että C-terminaalinen pää on deletoitu GPI-kiinnittymiskohtana toimivaan aminohappoon asti tämä aminohappo mukaan luettuna. Esimerkkejä näistä ovat aikaisemmin tarkastellut proteiinit, jotka sisältävät SEKVENSSI ID NO:2:n mukaiset aminohapot 1 - 193 tai SEKVENSSI ID NO:4:n mukaiset aminohapot 1 - 147. Vaikkakin GPI:n kiinnittymiskohta voidaan deletoida, niin hydrofobisen domeenin deleetion arvellaan riittävän estämään proteiinin kiinnittymisen GPI:n välityksellä solumembraaniin. Vielä muissa sovellutusmuodoissa nämä proteiinit voivat olla C-terminaalisesta päästä sillä tavoin typistettyjä, että C-terminaalinen aminohappo on mikä tahansa SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisten aminohappojen 193 ja 202 välinen aminohappo tai SEKVENSSI ID NO:4:n mukaisten aminohappojen 147 ja 160 välinen aminohappo. Tähän keksintöön kuuluvat liukoisia hek-L-proteiineja koodaavat DNA-sekvenssit.

Typistetty hek-L, mukaan lukien liukoiset polypeptidit, voidaan valmistaa käyttäen mitä tahansa monista tavanomaisista menetelmistä. Haluttu DNA-sekvenssi voidaan syntetoida kemiallisesti tunnettuja menetelmiä käyttäen. Voidaan myös valmistaa DNA-fragmentteja pilkkomalla täysimittaista kloonattua DNA-sekvenssiä restriktioendonukleaasilla ja eristää tämä agaroosigeeleissä suoritettavalla elektroforeesilla. Voidaan syntetoida oligonukleotideja, jotka rekonstruoivat DNA-fragmentin 5'- tai 3'-puoleisen pään haluttuun kohtaan. Oligonukleotidi voi

sisältää restriktioendonukleaasin pilkkomiskohdan vastasuuntaan halutusta koodaavasta sekvenssistä ja siinä voi olla aloituskodoni (ATG), joka sijaitsee koodaavan sekvenssin 5'-päässä. Tunnettua polymeraasiketjureaktiomenetelmää voidaan myös käyttää haluttua proteiinifragmenttia koodaavan DNA-sekvenssin eristämiseksi. Vielä yhtenä vaihtoehtona voidaan käyttää tunnettuja mutageneesimenetelmiä lopetuskodonin liittämiseksi haluttuun kohtaan, esimerkiksi myötäsuuntaan heti solunulkoisen domeenin viimeistä aminohappoa vastaavan kodonin jälkeen.

Tietyistä tämän keksinnön sovellutusmuodoista saadaan käyttöön eristetty DNA, joka sisältää nukleotidisekvenssin, joka on SEKVENSSI ID NO:1:n mukaisista nukleotideista 83 - 796 (koko koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi, 83 - 745 (signaalipeptidiä ja solunulkoista domeenia koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi, 140 - 796 (signaalipeptidiä vailla olevaa proteiinia koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi tai 140 - 745 (solunulkoista domeenia koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi. Keksinnöstä saadaan myös käyttöön eristetty DNA, joka sisältää nukleotidisekvenssin, joka on SEKVENSSI ID NO:3:n mukaisista nukleotideista 28 - 630 (koko koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi, 28 - 573 (signaalipeptidiä ja solunulkoista domeenia koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi, 94 - 630 (signaalipeptidiä vailla olevaa proteiinia koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi tai 94 - 573 (solunulkoista domeenia koodaavasta alueesta) muodostuva sekvenssi. Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön DNA-molekyylejä, jotka koodaavat SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisten proteiinien ja SEKVENSSI ID NO:4:n mukaisten proteiinien biologisesti aktiivisia fragmentteja, joihin kuuluvat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta DNA, joka koodaa edellä kuvattuja C-terminaalisesta päästä typistettyjä hek-L-proteiineja.

Tämän keksinnön mukaista hek-L:n DNA:ta on cDNA, kemiallisesti syntetoitu DNA, PCR:n avulla eristetty DNA, genominen DNA sekä näiden yhdistelmät. Genominen hek-L-DNA voidaan myös eristää hybridisoimalla se kloonien A2 tai C6 cDNA:han vakiomenetelmiä käyttäen.

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön puhdistettuja hek-L-polypeptidejä, jotka ovat sekä yhdistelmämolekyylejä että ei-yhdistelmämolekyylejä. Tämän keksinnön suojapiiriin kuuluvat myös sellaiset natiivien hek-L-proteiinien variantit ja johdannaiset, joissa haluttu biologinen aktiivisuus (esimerkiksi kyky sitoa hek:ia) on säilynyt. Yhdessä tämän keksinnön sovellutusmuodossa on kypsälle hek-L-proteiinille luonteenomaista, että se sisältää N-terminaalisen aminohapposekvenssin Leu-Leu-Ala-Gln-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Leu-Gly-Asn. Toisessa sovellutusmuodossa kypsälle hek-L-proteiinille on luonteenomaista, että se sisältää N-terminaalinen aminohapposekvenssin Gly-Ser-Ser-Leu-Arg-His-Val-Val-Tyr-Trp-Asn-Ser.

Hek-L:n variantteja voidaan saada aikaan esimerkiksi mutatoimalla natiiveja hek-L-polypeptidejä koodaavien nukleotidisekvenssejä. Hek-L:n variantti on tässä keksinnössä polypeptidi, joka on huomattavan homologinen natiivin hek-L:n suhteen mutta eroaa aminohapposekvenssiltään natiivin hek-L:n sekvenssistä (humaanisekvenssistä, muriinisekvenssistä tai jonkin muun nisäkäslajin sekvenssistä) yhden tai useamman deleetion, insertion tai substituution vuoksi. Tällaiset hek:ia sitovat variantit ovat sellaisten natiivien hek:ia sitovien proteiinien vastineita, joiden aminohapposekvenssit ovat SEKVENSSI ID NO:2:ssa ja SEKVENSSI ID NO:4:ssä esitettyjen sekvenssien mukaiset.

Tämän keksinnön mukaiset DNA-sekvenssi- ja aminohapposekvenssivariantit ovat natiivin hek-L-sekvenssin suhteen, kuten SEKVENSSI ID NO:1 - 4 mukaisten natiivien sekvenssien suhteen, edullisesti vähintään 80-%:isesti identtisiä ja edullisimmin vähintään 90-%:isesti identti-

siä. Fragmenttien kyseessä ollessa lasketaan identtisyys-% fragmentissa esiintyvän natiivin sekvenssin osan suhteen. Tietyissä tämän keksinnön sovellutusmuodoista saadaan käyttöön hek-L-polypeptidejä, jotka sisältävät aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen sekvenssin suhteen, joka on SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisten aminohappojen 1 - 194, 1 - 202 ja 1 - 219 tai SEKVENSSI ID NO:4:n mukaisten aminohappojen 1 - 148, 1 - 160 tai 1 - 179 mukainen sekvenssi.

Natiiveja aminohapposekvenssejä voidaan muuttaa käyttämällä mitä tahansa tunnettua menetelmää. Tiettyihin nimenomaisiin kohtiin voidaan muodostaa mutaatioita syntetoimalla mutatoidun sekvenssin sisältäviä oligonukleotideja, joiden molemmin puolin on käytetty restriktiokohtia, joiden avulla nämä ligatoidaan natiivin sekvenssin fragmentteihin. Tulokseksi saatu rekonstruoitu sekvenssi koodaa ligatoinnin jälkeen analogia, joka sisältää halutun aminohappoinsertion, -substituution tai -deleetion.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää oligonukleotidikohdemutageneesiä sellaisen muunnetun geenin aikaansaamiseksi, jossa tietyt nimenomaiset kodonit on muunnettu vaaditun substituution, deleetion tai insertion mukaisesti. Kuvaavia esimerkkejä edellä esitettyjen muunnosten valmistamisesta on kuvattu julkaisuissa Walder, et al. [Gene 42 (1986) 133], Bauer, et al. [Gene 37 (1985) 73]; Craik [BioTechniques, January (1985) 12 - 19]; Smith, et al. [Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, (1981)]; Kunkel [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 488]; Kunkel, et al. [Methods in Enzymol. 154 (1987) 367]; sekä US-patenttijulkaisuissa nro 4 518 584 ja 4 737 462, jotka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Variantit voivat sisältää konservatiivisesti substituoituja sekvenssejä, mikä tarkoittaa sitä, että tietyn aminohapporyhmän tilalla on käytetty ryhmää, jonka

fysikaaliskemialliset ominaisuudet ovat samanlaiset. Esimerkkejä konservatiivista substituutioista ovat yhden tai useamman alifaattisen ryhmän korvaaminen toisella samanlaisella ryhmällä, kuten Ile:n, Val:n, Leu:n tai Ala:n korvaaminen toinen toisillaan, tai yhden polaarisen ryhmän substituutio toisella polaarisella ryhmällä, kuten Lys:n ja Arg:n välinen substituutio, Glu:n ja Asp:n tai Gln:n ja Asn:n välinen substituutio. Tunnetaan muita tällaisia konservatiivisia substituutioita, kuten esimerkiksi kokonaisten alueiden substituointi toisilla hydrofobisilta ominaisuuksiltaan vastaavilla alueilla.

Hek-L:a voidaan myös modifioida hek-L-johdannaisten aikaansaamiseksi muodostamalla kovalenttisia tai aggregaatioon perustuvia konjugaatteja muiden kemiallisten ryhmien, kuten glykosyyliryhmien, lipiden, fosfaatin, asetyyliryhmien ja muiden näitä vastaavien ryhmien kanssa. Hek-L:n kovalenttisia johdannaisia voidaan valmistaa yhdistämällä kemiallisia ryhmiä hek-L:n aminohapposivuketjujen funktionaalisiin ryhmiin tai hek-L-polypeptidin tai tämän solunulkoisen domeenin N-terminaaliseen tai C-terminaaliseen päähän. Muita tämän keksinnön suojapiiriin kuuluvia hek-L:n johdannaisia ovat hek-L:n tai sen fragmenttien kovalentit tai aggregaatioon perustuvat konjugaatit muiden proteiinien tai polypeptidien kanssa, kuten käyttämällä yhdistelmäviljelmässä tapahtuvaa synteesiä N-terminaalisina tai C-terminaalisina fuusioina.

Hek-ligandi voi siinä alkuperäisessä muodossa, jossa se on yhdistelmäjärjestelmässä ilmentynyt, sisältää hek-L-polypeptidin N-terminaalisessa päässä sijaitsevan (natiivin tai heterologisen) signaali- eli johtosekvenssin. Signaali- eli johtopeptidi ohjaa translaation kanssa samanaikaisesti tai translaation jälkeen proteiinin siirtoa sen synteesipaikasta solumembraanin tai soluseinämän ulkopuolella olevaan kohtaan ja se pilkkoutuu kypsästä proteiinista erittymistapahtuman aikana. Tuonnem-

pana on kuvattu esimerkkejä sopivista heterologisista signaalipeptideistä, jotka tavallisesti valitaan käytettävän ilmentämisjärjestelmän mukaan.

Hek-L-polypeptidifuusiot voivat sisältää peptidejä, jotka on lisätty hek-L:n puhdistamisen ja tunnistamisen edistämiseksi. Tällaisia peptidejä ovat esimerkiksi poly-His-peptidi tai antigeeniset tunnistuspeptidit, joita on kuvattu US-patenttijulkaisussa nro 5 011 912 ja julkaisussa Hopp, et al., Bio/Technology 6 (1988) 1204. Yksi tällainen peptidi on Flagg®-peptidi, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK), joka on erittäin antigeeninen ja josta saadaan käyttöön spesifisen monoklonaalisen vasta-aineen palautuvasti sitoma epitooppi, jonka avulla ilmentynyt yhdistelmäproteiini on nopeasti määritettävissä ja helposti puhdistettavissa. Fuusioproteiinit, joiden toiseen päähän tämä peptidi on liitetty, voivat myös olla kestäviä E. colissa tapahtuvaa solunsisäistä pilkkoutumista vastaan. Hiiren hybridooma, jolle on annettu nimitys 4E11, tuottaa monoklonaalista vasta-ainetta, joka tiettyjen kahdenarvoisten metallikationien läsnäollessa sitoo peptidiä DYKDDDDK (US-patenttijulkaisussa 5 011 912 kuvatulla tavalla, joka patenttijulkaisu on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla) on talletettu talletuslaitokseen American Type Culture Collection hakunumerolla HB 9259.

Tähän keksintöön sisältyvät lisäksi hek-L-polypeptidit, jotka ovat glykosyloituneet natiivia muotoa vastaavasti tai tästä poikkeavasti. Hiiva- tai nisäkäsilmentämisjärjestelmissä (esimerkiksi COS-7-soluissa) ilmennetty hek-L voi valitun ilmentämisjärjestelmän mukaan muistuttaa natiivia hek-L-polypeptidiä tai poiketa tästä merkittävästi molekyylipainonsa ja glykosyloitumisensa suhteen. Kun hek-L-polypeptidejä ilmennetään bakteeri-ilmentämisjärjestelmissä, kuten E. colissa, niin saadaan glykosyloitumattomia molekyylejä.

Voidaan valmistaa DNA-konstruktioita, jotka koodaavat aminohapporyhmien tai sekvenssien useita erilaisia additioita tai substituutioita tai sellaisten terminaalisten tai sisäisten ryhmien tai sekvenssien deleetioita, jotka ovat tarpeettomia biologisen aktiivisuuden tai sitoutumisen kyseessä ollessa. Esimerkiksi hek-L:n solunulkoisessa domeenissa olevat N-glykosylaatiokohdat voidaan modifioida sellaisiksi, että näissä ei tapahdu glykosylaatiota, mikä tekee mahdolliseksi ilmentää nisäkäs- ja hiivailmentämisjärjestelmissä homogeenisempaa ja vähemmän hiilihydraattia sisältävää analogia. Luonteenomainen piirre eukaryoottisissa polypeptideissä oleville N-glykosylaatiokohdille on aminohappotripletti Asn-X-Y, jossa X on mikä tahansa aminohappo Pro:ta lukuunottamatta ja Y on Ser tai Thr. Tätä triplettiä koodaavaan nukleotidisekvenssiin tehdyistä asiaankuuluvista modifikaatioista on tuloksena substituutioita, additioita ja deleetioita, jotka estävät hiilihydraattiryhmien kiinnittymisen Asn:n sivuketjuun. Esimerkiksi yhden nukleotidin muutos, joka on valittu siten, että Asn:n tilalle tulee eri aminohappo, riittää inaktivoimaan N-glykosylaatiokohdan. Tunnettuja menetelmiä proteiineissa olevien N-glykosylaatiokohtien inaktivoimiseksi ovat menetelmät, joita on kuvattu US-patenttijulkaisussa 5 071 972 ja julkaisussa EP 276 846, jotka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Kloonin A2 koodaamassa hek-L:ssa esiintyy kolme N-glykosylaatiokohtaa, jotka sijaitsevat SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisten aminohappojen 19 - 21, 48 - 50 ja 81 - 83 kohdalla. Kloonin C6 koodaamassa hek-L:ssa on SEKVENSSI ID NO:4:n mukaisten aminohappojen 11 - 13 kohdalla oleva yksi N-glykosylaatiokohta.

Toisessa esimerkissä voidaan biologiselle aktiivisuudelle tarpeettomia Cys-ryhmiä koodaavia sekvenssejä muuttaa siten, että muutos johtaa Cys-ryhmien deletoitumi-

seen tai korvautumiseen muilla aminohapoilla, mikä estää väärien intramolekulaaristen disulfidisiltojen muodostumisen molekyyliä uudelleen naturoitaessa. Muita variantteja valmistetaan muokkaamalla toistensa vieressä olevia kaksiemäksisiä aminohapporyhmiä, minkä tarkoituksena on tehostaa ilmentymistä hiivajärjestelmissä, joissa esiintyy KEX2-proteaasiaktiivisuutta. Julkaisussa EP 212 914 on kuvattu kohdemutageneesin käyttö KEX2-proteaasilla muokkautuvien kohtien inaktivoimiseksi proteiinissa. KEX2-proteaasilla muokkautuvat kohdat inaktivoidaan deletoimalla, lisäämällä tai substituoimalla ryhmiä, minkä tarkoituksena on muuttaa Arg-Arg, Arg-Lys- ja Lys-Arg-pareja sen lopputuloksen aikaansaamiseksi, että näitä toistensa vieressä olevia emäksisiä ryhmiä ei molekyylissä esiinny. Lys-Lys-parien herkkyys pilkkoutua KEX2:n vaikutuksesta on huomattavan heikkoa ja Arg-Lys- tai Lys-Arg-parien muuntaminen Lys-Lys-pariksi edustaa konservatiivista ja edullista lähestymistapaa KEX2-kohtien inaktivoimiseksi. KEX2-proteaasin muokkauskohtia esiintyy SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisessa hek-L:ssa aminohappojen 26 - 27, 87 - 88 ja 199 - 200 kohdalla. SEKVENSSI ID NO:4:n mukainen hek-L sisältää KEX2-proteaasin muokkauskohdat aminohappojen 73 - 74 ja 134 - 135 kohdalla.

Tähän keksintöön kuuluvat myös luonnossa esiintyvät hek-L:n variantit. Esimerkkejä näistä varinteista ovat proteiinit, joita syntyy vaihtoehtoisesta mRNA:n silmukoitumistapahtumasta tai hek-L-proteiinin proteolyyttisestä pilkkoutumisesta ja joissa hek:ia sitova ominaisuus on säilynyt. Vaihtoehtoinen mRNA:n silmukoituminen voi tuottaa typistetyn mutta biologisesti aktiivisen hek-L-proteiinin, kuten esimerkiksi luonnossa esiintyvän proteiinin liukoisen muodon. Variaatioita, jotka on katsottava johtuvaksi proteolyysistä, ovat esimerkiksi N- tai C-terminaalisten päiden erot molekyyliä erityyppisissä isäntäsoluissa ilmennettäessä, mikä johtuu yhden tai useamman

terminaalisen aminohapon poistamisesta hek-L-proteiinista (tavallisesti 1 - 5 terminaalista aminohappoa) proteolyyttisesti. Signaalipeptidit voidaan tietyssä nimenomaisessa proteiinissa pilkkoa eri asemista, mikä johtaa kypsän proteiinin N-terminaalisen aminohapon vaihteluihin.

Yhdessä ilmentämisjärjestelmässä oli kloonin C6 koodaaman hek-L-proteiinin N-terminaalinen aminohappo SEKVENSSI ID NO:4:n mukainen aminohappo 4 (Leu). Yksi liukoisen hek-L/Fc-fuusioproteiinin preparaatti, joka oli peräisin kloonista A2, sisälsi fuusioproteiinien seoksen, jossa N-terminaalisena aminohappona oli SEKVENSSI ID NO:2:n mukainen aminohappo 12 (Asn) (noin 60 %) ja fuusioproteiineja, joissa N-terminaalinen aminohappo oli SEKVENSSI ID NO:2:n mukainen aminohappo 1 (Leu). Tietyt tämän keksinnön sovellutusmuodot kohdistuvat siten proteiineihin (liukoisiin tai membraaniin sitoutuneisiin proteiineihin), joissa N-terminaalinen aminohappo on mikä tahansa SEKVENSSI ID NO:4:n mukaisista aminohapoista 1 - 4 tai mikä tahansa SEKVENSSI ID NO:2:n mukaisista aminohapoista 1 - 12.

Koska geneettinen koodi on tunnetusti degeneratiivista, joka on sellaista, että useampi kuin yksi kodoni koodaa samaa aminohappoa, voi DNA-sekvenssi poiketa SEKVENSSI ID NO:1:ssä tai 3:ssa esitetystä sekvenssistä ja koodata kuitenkin hek-L-proteiinia, jonka aminohappo-sekvenssi on SEKVENSSI ID NO:2:n tai 4:n mukainen sekvenssi. Tällaiset DNA-sekvenssien variantit voivat johtua vaikutuksettomista mutaatioista (toisin sanoen PCR-monistuksen aikana tapahtuvista mutaatioista) ja ne voivat olla natiiviin sekvenssiin tehdyn tarkoituksellisen mutageneesin tuottamia.

Tästä keksinnöstä saadaan siten käyttöön biologisesti aktiivista hek-L:a koodaavia eristettyjä DNA-sekvenssejä, jotka ovat: (a) DNA:ta, joka on peräisin natiivia nisäkkäiden hek-L-geeniä koodaavalta alueelta (esimerkiksi SEKVENSSI ID NO:1:ssä tai SEKVENSSI ID NO:3:ssa

esitetyn koodaavan alueen sisältävä cDNA); tai (b) DNA:ta, joka geneettisen koodin perusteella on degeneratiivinen kohdassa (a) kuvatun biologisesti aktiivista hek-L:a koodaavan DNA:n suhteen. Tällaisten DNA-sekvenssien koodaamat hek-L-proteiinit kuuluvat tähän keksintöön.

Tämän keksinnön mukaista hek-L-DNA:ta on cDNA, kemiallisesti syntetoitu DNA, PCR:n avulla eristetty DNA, genominen DNA ja näiden yhdistelmät. Genominen hek-L-DNA voi olla eristetty hybridisoimalla tämä kloonien A2 tai C6 cDNA:han vakiomenetelmiä käyttäen.

Biologisen aktiivisuuden määritykset

Variantit, jotka kykenevät sitomaan hek:ia, voidaan tunnistaa millä tahansa sopivalla määrityksellä. Tavanomaiset määritysmenetelmät ovat myös käyttökelpoisia natiivin hek-L-proteiinin hek:ia sitovan aktiivisuuden analysoimiseen. Hek-L:n biologinen aktiivisuus voidaan määrittää esimerkiksi käyttämällä hek:n ligandia sitovaan domeeniin tapahtuvan sitoutumisen kompetitiota (kompetitiiviset sitoutumismääritykset.

Yhdentyyppisessä hek-L-polypeptidin kompetitiivisessa sitoutumismäärityksessä käytetään hyväksi radioaktiivisella leimalla varustettua liukoista humaani-hek-L:a ja kokonaisia soluja, jotka ilmentävät solun pinnalla olevaa hek:ia. Kokonaiset solut voidaan korvata liukoisella hek:lla (kuten hek/Fc-fuusioproteiinilla), joka on sidottu kiinteään faasiin proteiini-A:n tai proteiini-G:n ja fuusioproteiinin Fc-alueen välisen vuorovaikutuksen välityksellä. Toisentyyppisessä kompetitiivisessa sitoutumismäärityksessä käytetään hyväksi radioaktiivisella leimalla varustettua hek:ia, kuten hek/Fc-fuusioproteiinia, ja hek-L:a ilmentäviä kokonaisia soluja. Vaihtoehtoisesti voi liukoinen hek-L olla sidottu kiinteään faasiin.

Kompetitiivisia sitoutumismäärityksiä voidaan suorittaa käyttäen tavanomaisia menetelmiä. Radioaktiivisella leimalla varustettua hek-L:a voidaan sitoutumis-

aktiivisuuden määrittämiseksi käyttää kilpailemaan otaksutun hek-L:n homologin kanssa sitoutumisesta pintaan sidottuun hek:iin. Kvalitatiivisia tuloksia voidaan saada käyttämällä maljoilla suoritettavia kompetitiivisia autoradiografisia sitoutumismäärityksiä tai voidaan käyttää Scatchard'in kuvaajia kvantitatiivisten tulosten laskemiseksi.

Vaihtoehtoisesti voidaan liukoinen hek sitoa havaittavan ryhmän, kuten ^{125}I-leimalla varustetun hek-L:n, analysointiin soveltuvaan kiinteään faasiin, kuten kolonnikromatografiamatriksiin tai tätä vastaavaan alustaan. Sitominen kiinteään faasiin voidaan suorittaa esimerkiksi sitomalla hek/Fc-fuusioproteiini proteiini-A:ta tai proteiini-G:tä sisältävään matriksiin.

Hek-L:n (mukaan lukien tämän varianttien) sitoutumisominaisuudet voidaan myös määrittää käyttäen leimalla varustettua liukoista hek:ia (esimerkiksi ^{125}I-hek/Fc:tä) edellä kuvattuja määrityksiä muistuttavissa kompetitiomäärityksissä. Tässä tapauksessa käytetään kuitenkin hek-L:a ilmentäviä kokonaisia soluja tai kiinteään alustaan sidottua liukoista hek-L:a sen määrittämiseksi, missä määrin otaksuttavaa hek-varianttia sisältävä näyte kilpailee leimalla varustetun liukoisen hek:n kanssa sitoutumisesta hek-L:iin.

Edullinen määritys membraaniin sidotun hek-L:n hek:ia sitovan aktiivisuuden havaitsemiseksi on seuraava. Laadittiin modifioitu epäsuora sitoutumismääritys käyttäen hyväksi esimerkissä 1 valmistettua hek/Fc-fuusioproteiinia ja esimerkissä 3 kuvattua ^{125}I-leimalla varustettua hiiressä tehtyä anti-humaani-IgG Fc -vasta-ainetta sen tilanteen välttämiseksi, että radioaktiivinen leima kiinnittyisi suoraan hek/Fc:hen. Endogeenista hek-L:a ilmentäviä soluja (esimerkiksi esimerkissä 2 kuvattua CCRF-HSB-2-solulinjaa) käsiteltiin vaihtelevilla hek/Fc-konsentraatioilla, minkä

jälkeen käytettiin ^{125}I-leimalla varustetun vasta-aineen vakioista kylläisyystasoista konsentraatiota seuraavasti.

CCRF-HSB-2-soluja viljellään suspensioviljelmässä 96-kuoppaisissa soluviljelylevyissä. Soluja (2 x 10^6 solua/kuoppa) inkuboidaan 1 tunnin ajan 37 °C:ssa sitoutumismediumissa (RPMI 1640 -medium, 1 % naudan seerumialbumiinia, 0,2 % natriumatsidia ja 20 mM HEPES'iä, pH 7,2) useiden erilaisten hek/Fc-konsentraatioiden läsnäollessa tai ilman hek/Fc:tä. Solut pestään sitten kerran PBS:llä ja niitä inkuboidaan yhden tunnin ajan 37 °C:ssa sitoutumismediumissa ^{125}I-leimalla varustetun hiiressä tehdyn anti-humaani IgG Fc:n (40 ng/ml) kanssa seosta samalla varovasti sekoittaen. Solut ja sitoutumaton ^{125}I-leimalla varustettu vasta-aine erotetaan ftalaattiöljyerotusmenetelmällä menetellen olennaisesti julkaisussa Dover, et al., J. Immunol 132 (1984) 751, kuvatulla tavalla.

Määritys, jolla on tarkoitus havaita hek/Fc:n sitoutuminen membraaniin sitoutunutta hek-L:a ilmentäviin soluihin, voidaan suorittaa esimerkissä 5 kuvatulla tavalla. Käytettiin epäsuoraa sitoutumismääritystä.

Edullinen määritys liukoisen hek-L:n hek:ia sitovan aktiivisuuden analysoimiseksi on seuraava. Määrityksessä havaitaan esimerkissä 2 kuvatulla tavalla liukoisen hek-L:n kyky inhiboida hek/Fc-fuusioproteiinin sitoutumista endogeenistä hek-L:a ilmentävään CCRF-HSB-2-solulinjaan.

Solujen kasvatukseen käytetty supernatantti (viljelymedium), joka on peräisin liukoista hek-L:a ilmentävällä ilmentämisvektorilla transfektoidusta CV-1/EBNA-soluista, titrataan 96-kuoppaisessa levyssä. Kuhunkin kuoppaan lisätään vakiomäärä hek/Fc:tä (1 μg/kuoppa), minkä jälkeen kuhunkin kuoppaan lisätään sitoutumismediumissa olevia CCRF-HSB-2-soluja, joiden solutiheys on 1 - 2 x 10^6. Levyä inkuboidaan 37°C:ssa yhden tunnin ajan. Solut pestään kaksi kertaa PBS:llä, ja ne sentrifugoidaan sen jälkeen napiksi. Kuhunkin kuoppaan lisätään vakio-

konsentraatioon ^{125}I-leimalla varustettua hiiressä tehtyä anti-humaani-IgG Fc:tä ja levyä inkuboidaan vielä tunnin ajan 37°C:ssa. ^{125}I-leimalla varustettu hiiressä tehty anti-humaani-IgG Fc sitoutuu siihen hek/Fc:hen, joka on sitoutunut CCRF-HSB-2-soluihin. Viimeisen inkuboinnin jälkeen solut kootaan talteen ftalaattiöljyä sisältävissä putkissa sitoutuneen ja vapaan ^{125}I-leimalla varustetun hiiressä tehdyn anti-humaani IgG Fc:n erottamiseksi. Radioaktiivisuus lasketaan gammalaskijaa käyttäen.

Hek-L:n käyttömuodot

Tämän keksinnön mukaista hek-L:a voidaan käyttää hek:ia ilmentävien solujen havaitsemiseen tarkoitetuissa sitoutumismäärityksessä. Esimerkiksi hek-L tai tämän solunulkoinen domeeni tai fragmentti voidaan konjugoida havaittavaan ryhmään, kuten ^{125}I:hin. Radioaktiivisella ^{125}I-leimalla varustaminen voidaan suorittaa millä tahansa useista vakiomenetelmistä, joilla saadaan aikaan korkean ominaisaktiivisuuden sisältävää toiminnallista ^{125}I-leimalla varustettua hek-L-molekyyliä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää jotakin muuta havaittavissa olevaa ryhmää, kuten kolorimetristä ja fluorimetristä reaktiota katalysoimaan kykenevää entsyymiä, biotiinia tai avidiinia. Solut, joista hek:n ilmentymistä on määrä tutkia, voidaan saattaa kosketukseen leimalla varustetun hek-L:n kanssa. Sitoutumaton leimalla varustettu hek-L poistetaan inkuboinnin jälkeen ja sitoutuminen määritetään käyttäen havaittavissa olevaa ryhmää.

Tässä keksinnössä kuvattuja hek-ligandiproteiineja voidaan myös käyttää hek-proteiinin biologisen aktiivisen määrittämiseen niiden sisältämän hek-L:iin kohdistuvan sitoutumisaffiniteetin johdosta. Tämän valaisemiseksi voidaan hek-L:a käyttää sitoutumisaffiniteettimäärityksessä, jolla on määrä määrittää eri lämpötiloissa varastoidun tai eri solutyypeissä tuotetun hek-proteiinin biologinen aktiivisuus. Siten hek-proteiinin biologinen aktiivisuus

voidaan saada selville ennen kuin sitä käytetään esimerkiksi tutkimuksessa.

Hek-L-proteiineilla on käyttöä reagensseina, joita voidaan käyttää "laadunvarmistus"tutkimuksia suoritettaessa, esimerkiksi hek-proteiinin varastoinninkestävyyden ja stabiilisuuden seuraamiseksi eri olosuhteissa. Hek-ligandeja voidaan käyttää sen määrittämisessä, säilyykö biologinen aktiivisuus hek-proteiinin modifikaation (esimerkiksi kemiallisen modifikaation, typistämisen, mutatoinnin ja niin edelleen) jälkeen. Modifioidun hek-proteiinin hek-L:a kohtaan suuntautunutta sitoutumisaffiniteettia voidaan verrata modifioimattoman hek-proteiinin affiniteettiin, jotta kyettäisiin havaitsemaan mikä tahansa modifikaation haitallinen vaikutus hek:n biologiseen aktiivisuuteen.

Toinen hek-ligandin käyttömuoto on sen käyttö reagenssina proteiinien puhdistamismenetelmissä. Hek-L- tai hek-L/Fc-fuusioproteiinit voidaan kiinnittää kiinteään tukimateriaaliin tavanomaisin menetelmin ja käyttää hek:n puhdistamiseen affiniteettikromatografian avulla.

Hek-L-polypeptideillä on myös käyttöä kantaja-aineina näihin liitettyjen aineiden toimittamiseksi solun pinnalla olevaa hek-antigeenia sisältäviin soluihin. Hek-antigeenin on raportoitu ilmentyvän tietyissä leukemisissa solulinjoissa, joita ovat humaani-T-soluleukemiasolulinjat, joille on annettu nimitykset JM ja HSB-2, ja humaani-esi-B-soluleukemiasolulinja, jolle on annettu nimitys LK63 [Boyd, et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 3262 ja Wicks, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 1611]. Siten hek-L-proteiineja voidaan käyttää diagnostisten tai terapeuttisten aineiden toimittamiseen in vitro- tai in vivo -olosuhteissa käytettävissä menetelmissä näihin soluihin (tai muihin solutyyppeihin, joiden on havaittu ilmentävän hek:ia solun pinnalla).

Yksi esimerkki tällaisesta käyttömuodosta on käsitellä leukemista hek$^+$-solulinjaa terapeuttisen aineen ja hek-L:n konjugaatilla sen arvioimiseksi, onko tällä aineella sytotoksisuutta leukemiasoluja vastaan. Lukuisa määrä hek-L:iin kiinnitettyjä erilaisia terapeuttisia aineita voidaan sisällyttää määritykseen, jonka tarkoituksena on havaita näiden aineiden sytotoksinen vaikutus leukemiasoluihin ja verrata näitä vaikutuksia toisiinsa. Hek-L:n ja diagnostisen aineen konjugaatteja voidaan käyttää hek$^+$-solujen havaitsemiseen in vitro -olosuhteissa tai in vivo -olosuhteissa.

Diagnostisia ja terapeuttisia aineita, joita voidaan kiinnittää hek-L-polypeptidiin, ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta lääkeaineet, toksiinit, radionuklidit, kromoforit, fluoresoivat yhdisteet, kolorimetrisiä tai fluorimetrisiä reaktioita katalysoivat entsyymit ja muut näitä vastaavat aineet, ja tietty nimenomainen aine on valittu aiotun sovellutuksen mukaisesti. Esimerkkejä lääkeaineista ovat lääkeaineet, joita käytetään useiden erilaisten syöpämuotojen hoidossa, esimerkiksi typpisinappiyhdisteet, kuten L-fenyylialaniinityppisinappiyhdiste tai syklofosfamidi, interkaloivat aineet, kuten cis-diaminodiklooriplatina, antimetaboliitit, kuten 5-fluoriurasiili, vinca-alkaloidit, kuten vinkristiini, ja antibiootit, kuten bleomysiini, doksorubisiini, daunorubisiini ja näiden johdannaiset. Toksiineja ovat risiini, abriini, difteriatoksiini, Pseudomonas aeruginosan eksotoksiini A, ribosomia inaktivoivat proteiinit, mykotoksiinit, kuten trikotekeenit, sekä näiden johdannaiset ja fragmentit (esimerkiksi yksittäiset ketjut). Diagnostiseen käyttöön soveltuvia radionuklideja ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta ^{123}I, ^{131}I, ^{99m}Tc, ^{111}In ja ^{76}Br. Terapeuttiseen käyttöön soveltuvia radionuklideja ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta ^{131}I, ^{211}At, ^{77}Br, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{109}Pd, ^{64}Cu ja ^{67}Cu.

Näitä aineita voidaan kiinnittää hek-L:iin millä tahansa soveltuvalla tavanomaisella menetelmällä. Hek-L, joka on proteiini, sisältää aminohappojen sivuketjuissa olevia funktionaalisia ryhmiä, jotka voidaan saattaa reagoimaan halutun aineen funktionaalisten ryhmien kanssa esimerkiksi kovalenttisten sidosten muodostamiseksi. Proteiinista tai aineesta voidaan vaihtoehtoisesti valmistaa johdannainen halutun reagoivan funktionaalisen ryhmän muodostamiseksi tai kiinnittämiseksi. Johdannaisen muodostamiseen voi sisältyä yhden tai useamman sellaisen bifunktionaalisen kytkentäreagenssin kiinnittäminen, joita on saatavilla useiden erilaisten molekyylien liittämiseksi proteiineihin (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Tunnetaan useita menetelmiä proteiinien varustamiseksi radioaktiivisella leimalla. Radionuklidimetallit voidaan kiinnittää hek-L:iin käyttämällä esimerkiksi sopivaa bifunktionaalista kelatoivaa ainetta.

Näin valmistetaan konjugaatteja, jotka sisältävät hek-L:a ja sopivaa diagnostista tai terapeuttista ainetta (edullisesti kiinnitettynä kovalenttisesti). Konjugaatteja annetaan tai käytetään muulla tavoin sellainen määrä, joka on asianmukainen tietyn nimenomaisen sovellutuksen kyseessä ollessa.

Kuten esimerkissä 5 on kuvattu, kykenevät tästä keksinnöstä käyttöön saatavat hek-L-proteiinit sitoutumaan reseptoriin, josta käytetään nimitystä elk. Hek-L:lla on muita tästä elk:ia sitovasta ominaisuudesta johtuvia käyttömuotoja, jotka ovat analogisia edellä kuvattujen hek:ia sitovasta ominaisuudesta johtuvien käyttömuotojen suhteen. Hek-L:a voidaan käyttää elk:in havaitsemiseen useissa erilaisissa määrityksissä. Hek:ia sitovaa vasta-ainetta voidaan käyttää määrityksessä estämään hek:n sitoutumisen hek-L:iin silloin, kun näin on asiaankuuluvaa menetellä, mikä mahdollistaa samalla elk:n sitoutumisen hek-L:iin. Hek-ligandeja voidaan käyttää elk-proteiinien

biologisen aktiivisuuden määrittämisessä, koska elk-proteiinilla tai tämän variantilla on hek-L:iin kohdistuvaa sitoutumisaffiniteettia. Hek-L-proteiineilla voi myös olla käyttöä elk-proteiinien puhdistamisessa affiniteettikromatografian avulla.

Hek-L-oligomeerit

Tämä keksintö kattaa oligomeerien, kuten dimeerien tai trimeerien muodossa olevat hek-L-polypeptidit. Oligomeerejä voidaan muodostaa käyttämällä eri hek-L-polypeptidien kysteiiniryhmien välille muodostuneita disulfidisidoksia. Yhdessä tämän keksinnön sovellutusmuodossa valmistetaan hek-L-dimeeri fuusioimalla hek vasta-aineen (IgG1) Fc-alueeseen sillä tavoin, että tämä ei häiritse hek-L:n sitoutumista hek:n ligandia sitovaan domeeniin. Termi "Fc-polypeptidi" sisältää natiivin muodon ja muteiinimuodot sekä typistetyt Fc-polypeptidit, jotka sisältävät dimerisoitumista edistävän sarana-alueen. Fc-polypeptidi fuusioidaan edullisesti liukoisen hek-L:n (tämä sisältää ainoastaan solunulkoisen domeenin) C-terminaaliseen päähän. Sellaisten fuusioproteiinien valmistus, jotka sisältävät vasta-aineesta peräisin olevien polypeptidien (mukaan lukien Fc-domeenin) eri osiin fuusioituja heterologisia polypeptidejä, on kuvattu esimerkiksi julkaisuissa Ashkenazi, et al. [PNAS USA 88 (1991) 10535] ja Byrn, et al. [Nature 344 (1990) 677], jotka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla.

Fuusio, joka sisältää hek-L:n sekä Fc-polypeptidin tai Fc-muteiinipolypeptidin, voidaan valmistaa sellaisten menetelmien avulla, jotka ovat analogisia niiden menetelmien suhteen, joita esimerkissä 1 on kuvattu hek/Fc-muteiinifuusion valmistamisen kyseessä ollessa. Hek-L/Fc-fuusioproteiinia koodaava geenifuusio liitetään asiaankuuluvaan ilmentämisvektoriin ja tämä transfektoidaan isäntäsoluihin. Ilmentyneiden hek-L/Fc-fuusioproteiinien kokoonpanon annetaan tapahtua suurelta osin samoin kuin

vasta-ainemolekyylien kokoonpanon suhteen on asianlaita, minkä jälkeen Fc-polypeptidien välille muodostuu ketjujen välisiä disulfidisidoksia, mikä tuottaa divalenttisen hek-L:n. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää natiivia Fc-polypeptidiä, josta tämä muteiini oli peräisin.

Jos fuusioproteiineja valmistetaan käyttäen vasta-aineen raskasta ja kevyttä ketjua, on mahdollista muodostaa hek-L-oligomeeri, joka sisältää jopa neljä hek-L:n solunulkoista aluetta. Vaihtoehtoisesti voidaan yhdistää kaksi liukoista hek-L-domeenia peptidikytkijäjaksoon, kuten yhdysvaltalaisessa patenttijulkaisussa 5 073 627 kuvattuihin peptidikytkijäjaksoihin.

Tämän keksinnön tietyissä nimenomaisissa sovellutusmuodoissa hek-L-DNA, joka koodaa SEKVENSSI ID NO:1:n mukaisia aminohappoja -19 - 202 tai SEKVENSSI ID NO:3:n mukaisia aminohappoja -22 - 157, fuusioitiin esimerkissä 1 kuvattua Fc-muteiinia koodaavan DNA:n 5'-päähän ja liitettiin ilmentämisvektoriin pDC410 (tämä on kuvattu esimerkissä 3). Tulokseksi saadulla yhdistelmäilmentämisvektorilla transfektoituja CV1-EBNA1-soluja viljeltiin liukoisen hek-L/Fc-fuusioproteiinin ilmentämiseksi.

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön hek-L:n solunulkoisten domeenien tai näiden fragmenttien oligomeerejä, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfidien kesken tapahtuneiden vuorovaikutusten avulla tai ilmennetty fuusiopolymeereinä, joissa on mahdollisesti käytetty loitontajana toimivia aminohappokytkijäryhmiä. Esimerkiksi hek-L:n solunulkoisen domeenin dimeeri voidaan liittää IgG:n Fc-alueesta koostuvalla kytkevällä ryhmällä.

Ilmentämisjärjestelmät

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön hek-L:n ilmentämiseen soveltuvia ilmentämisvektoreita ja näillä ilmentämisvektoreilla transformoituja isäntäsoluja. Voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa ilmentämisjärjestelmää. Nämä vektorit sisältävät hek-L:n DNA-sekvenssin, joka on

liitetty toiminnallisesti sopivaan transkriptiota tai translaatiota säätelevään nukleotidisekvenssiin, kuten tällaiseen nisäkkään, mikrobin, viruksen tai hyönteisen geenistä peräisin olevaan nukleotidisekvenssiin. Esimerkkejä säätelysekvensseistä ovat transkription promoottorit, operaattorit tai käynnistäjät ja mRNA:n ribosomia sitova kohta sekä transkription ja translaation alkamista ja päättymistä säätelevät asianmukaiset sekvenssit. Nukleotidisekvenssit ovat toiminnallisesti liittyneitä silloin, kun säätelysekvenssi on toiminnallisesti yhteydessä hek-L:n DNA-sekvenssiin. Siten promoottorinukleotidisekvenssi on liittynyt toiminnallisesti hek-L:n DNA-sekvenssiin, jos promoottorinukleotidisekvenssi säätelee hek-L:n DNA-sekvenssin transkriptiota. Ilmentämisvektoriin voidaan lisäksi liittää tavallisesti replikaation alkukohdan antama kyky replikoitua halutussa isäntäsolussa sekä transformanttien tunnistamiseen käytettävä selektiogeeni.

Ilmentämisvektoreihin voidaan lisäksi liittää sekvenssejä, jotka koodaavat sellaisia asiaankuuluvia signaalipeptidejä, jotka eivät luontaisesti kuulu hek-L-geeniin. Samaan lukukehykseen hek-L-sekvenssin kanssa voidaan fuusioida esimerkiksi signaalipeptidiä (erittymisen johtosekvenssiä) vastaava DNA-sekvenssi, niin että hek-L:n translaatio tapahtuu alunperin signaalipeptidin sisältävänä fuusioproteiinina. Aiotussa isäntäsolussa toimintakykyinen signaalipeptidi edistää hek-L-polypeptidin erittymistä solunulkoiseen tilaan. Signaalipeptidi pilkkoutuu pois hek-L-polypeptidistä hek-L:n erityttyä solusta.

Sopivia isäntäsoluja hek-L-polypeptidien ilmentämiseksi ovat prokaryootit, hiivat tai korkeammat eukaryoottisolut. Asiaankuuluvia kloonaus- ja ilmentämisvektoreita käytettäviksi bakteeri-, sieni-, hiiva- ja nisäkässoluisäntien yhteydessä on kuvattu esimerkiksi teoksessa Pouwels, et al., Cloning Vectors: A Laboratory

Manual, Elsevier, New York, (1985). Hek-L-polypeptidien valmistamiseen voitaisiin myös käyttää soluttomia translaatiojärjestelmiä käyttämällä tässä keksinnössä kuvatuista DNA-konstruktioista peräisin olevia RNA-molekyylejä.

Prokaryootteja ovat gramnegatiiviset tai grampositiiviset organismit, esimerkiksi E. coli tai Bacillukset. Sopivia prokaryoottisia isäntäsoluja transformaatioon ovat esimerkiksi E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium ja useat erilaiset muut Pseudomonas-, Streptomyces- ja Staphylococcus-sukuihin kuuluvat lajit. Hek-L-polypeptidi voi prokaryoottisessa isäntäsolussa, kuten E. colissa, sisältää N-terminaalisen metioniiniryhmän yhdistelmäpolypeptidin prokaryoottisessa isäntäsolussa tapahtuvan ilmentymisen edistämiseksi. N-terminaalinen Met voidaan pilkkoa ilmennetystä yhdistelmä-hek-L-polypeptidistä.

Prokaryoottisissa isäntäsoluissa käytettävät ilmentämisvektorit sisältävät tavallisesti yhden tai useamman fenotyyppisesti selektoitavissa olevan markkerigeenin. Fenotyyppisesti selektoitavissa oleva markkerigeeni on esimerkiksi sellaista proteiinia koodaava geeni, joka antaa antibioottiresistenssin tai joka tuottaa vaadittavan autotrofisen kasvun. Esimerkkejä prokaryoottisille isäntäsoluille soveltuvista ilmentämisvektoreista ovat kaupallisesti saatavilla olevista plasmideista peräisin olevat vektorit, kuten kloonausvektori pBR322 (ATCC 37017). pBR322 sisältää ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssigeenit, jotka tarjoavat yksinkertaisen keinon transformoitujen solujen tunnistamiseksi. pBR322-vektoriin liitetään asiaankuuluva promoottori- ja hek-L:n DNA-sekvenssi. Muita kaupallisesti saatavilla olevia vektoreita ovat esimerkiksi pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Ruotsi) ja pGEM1 (Promega Biotech, Madison WI, USA).

Promoottorisekvenssejä, joita käytetään tavallisesti prokaryoottisten yhdistelmä-isäntäsoluilmentämisvektorien kyseessä ollessa, ovat β-laktamaasi (penisillinaasi), laktoosipromoottorijärjestelmä [Chang, et al., Nature 275 (1978) 615 ja Goeddel, et al., Nature 281 (1979) 544], tryptofaani (trp) -promoottorijärjestelmä [Goeddel, et al., Nucl. Acids Res. 8 (1980) 4057; ja EP-A-36 776] ja tac-promoottori [Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, (1982)]. Erityisen käyttökelpoisessa prokaryoottisessa isäntäsoluilmentämisjärjestelmässä käytetään hyväksi faagi λ:n P_L-promoottoria ja lämpölabiilia cI857ts-repressorisekvenssiä. Plasmidivektoreita, joita on saatavilla talletuslaitoksesta American Type Culture Collection ja jotka sisältävät λ:n P_L-promoottorin johdannaisia, ovat plasmidi pHUB2 [tämä on E. coli -kannassa JMB9 (ATCC 37092)] ja pPLc28 [tämä on E. coli RR1:ssa (ATCC 53082)].

Hek-L:a voidaan vaihtoehtoisesti ilmentää hiivaisäntäsoluissa, jotka ovat edullisesti peräisin Saccharomyces-suvusta (esimerkiksi S. cerevisiae). Voidaan myös käyttää muita hiivasukuja, kuten Pichiaa tai Kluyveromycestä. Hiivavektorit sisältävät usein 2μ-hiivaplasmidista peräisin olevan replikaation alkukohtasekvenssin, autonomisesti replikoituvan sekvenssin (ARS), promoottorialueen, polyadenylaatiosekvenssit, transkription lopetussekvenssit ja selektoitavissa olevan markkerigeenin. Hiivavektoreille soveltuvia promoottorisekvenssejä ovat muun muassa metallotioneiinin, 3-fosfoglyseraattikinaasin [Hitzeman, et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 2073] tai muiden glykolyyttisten entsyymien [Hess, et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7 (1968) 149; ja Holland, et al., Biochem. 17 (1978) 4900], kuten enolaasin, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaaasin, heksokinaasin, pyruvaattidekarboksylaasin, fosfofruktokinaasin, glukoosi-6-

fosfaatti-isomeraasin, 3-fosfoglyseraattimutaasin, pyruvaattikinaasin, trioosifosfaatti-isomeraasin, fosfoglukoosi-isomeraasin ja glukokinaasin, promoottorit. Muita sopivia promoottoreita hiivassa tapahtuvaa ilmentämistä varten on kuvattu vielä julkaisussa Hitzeman, EPA-73 657. Toinen vaihtoehto on glukoosilla repressoitavissa oleva ADH2-promoottori, joka on kuvattu julkaisuissa Russell, et al. [J. Biol. Chem. 258 (1982) 2674] ja Beier, et al. [Nature 300 (1982) 724]. Sukkulavektoreita, jotka kykenevät replikoitumaan sekä hiivassa että E. colissa, voidaan konstruoida liittämällä edellä kuvattuihin hiivavektoreihin pBR322:sta peräisin olevia DNA-sekvenssejä, joita tarvitaan selektioon ja replikaatioon E. colissa (Amp^r-geeni ja replikaation alkukohta).

Hek-L-polypeptidin erittymistä ohjaamaan voidaan käyttää hiivan α-tekijän johtosekvenssiä. α-tekijän johtosekvenssi liitetään usein promoottorisekvenssin ja rakennegeenisekvenssin väliin. Tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa Kurjan, et al., Cell 30 (1982) 933; Bitter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 5330; US-patenttijulkaisu 4 546 082; ja julkaisu EP 324 274. Tämän alan ammattikokemuksen perusteella tunnetaan muita johtosekvenssejä, jotka soveltuvat edistämään yhdistelmäpolypeptidien erittymistä hiivaisäntäsoluista. Johtosekvenssiä voidaan modifioida sen 3'-pään läheisyydestä sellaiseksi, että se sisältää yhden tai useamman restriktiokohdan. Tämä edistää johtosekvenssin fuusiointia rakennegeeniin.

Hiivan transformaatiomenetelmät ovat alan ammattikokemuksen perusteella tunnettuja. Yksi tällainen menetelmä on kuvattu julkaisussa Hinnen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1929. Hinnen, et al.':n menetelmässä valikoidaan Trp^+-transformantteja selektiomediumissa, jossa selektiomedium sisältää 0,67 % hiivan

typpiperusravinnetta, 0,5 % kasaminohappoja, 2 % glukoosia, 10 µg/ml adeniinia ja 20 µg/ml urasiilia.

ADH2-promoottorisekvenssin sisältävillä vektoreilla transformoituja hiivaisäntäsoluja voidaan kasvattaa ilmentymisen aikaansaamiseksi "rikkaassa" mediumissa. Esimerkki rikkaasta mediumista on medium, joka sisältää 1 % hiivauutetta, 2 % peptonia ja 1 % glukoosia ja jota on täydennetty adeniinilla, jonka konsentraatio on 80 µg/ml ja urasiililla, jonka konsentraatio on 80 µg/ml. ADH2-promoottorin derepressio tapahtuu glukoosin kuluttua loppuun mediumista.

Yhdistelmä-hek-L-polypeptidien ilmentämiseen voitaisiin myös käyttää nisäkäs- tai hyönteisisäntäsolujärjestelmiä. Luckow ja Summers, Bio/Technology 6 (1988) 47, ovat esittäneet katsauksen baculovirusjärjestelmistä, jotka soveltuvat heterologisten proteiinien tuotantoon hyönteissoluissa. Voidaan myös käyttää nisäkkäistä peräisin olevia vakiintuneita solulinjoja. Esimerkkejä sopivista nisäkäsisäntäsolulinjoista ovat apinan munuaissolujen COS-7-linja (ATCC CRL 1651) [Gluzman, et al., Cell 23 (1981) 175], L-solut, C127-solut, 3T3-solut (ATCC CCL 163), kiinanhamsterin munasarja (CHO) -solut, HeLa-solut ja BHK (ATCC CRL 10) -solulinjat ja CV-1/EBNA-1-solulinja, joka on peräisin afrikkalaisen viherapinan munuaissolulinjasta CV1 (ATCC CCL 70) sellaisena kun tämä on kuvattu julkaisussa McMahan, et al. [EMBO J. 10 (1991) 2821].

Nisäkäsisäntäsoluilmentämisvektoreiden transkription ja translaation säätelysekvenssejä voidaan irrottaa virusten genomeista. Tavallisesti käytetyt promoottorisekvenssit ja käynnistäjäsekvenssit ovat peräisin polyomaviruksesta, adenovirus 2:sta, Simian virus 40:stä (SV40) ja humaanisytomegaloviruksesta. SV40-viruksen genomista peräisin olevia DNA-sekvenssejä, esimerkiksi SV40:n aloituskohtaa, varhaista ja myöhäistä promoottoria, käynnistäjäkohtaa, silmukoitumiskohtaa ja polyadenylaatio-

kohtaa, voidaan käyttää antamaan käyttöön muita geneettisiä elementtejä, jotka soveltuvat rakennegeenisekvenssin ilmentämiseen nisäkäsisäntäsolussa. Virusten varhaiset ja myöhäiset promoottorit ovat erityisen käyttökelpoisia, koska näitä molempia saadaan vaikeuksitta virusgenomista fragmenttina, joka voi myös sisältää viruksen replikaation alkukohdan [Fiers, et al., Nature 273 (1978) 113]. Voidaan myös käyttää pienempiä tai suurempia SV40:n fragmentteja edellyttäen, että ne sisältävät noin 250 ep:n suuruinen sekvenssi, joka ulottuu HindIII-kohdasta SV40-viruksen replikaation alkukohdassa sijaitsevan BglI-kohdan suuntaan.

Julkaisussa Okayama ja Berg [Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 280] kuvatulla tavalla voidaan konstruoida kuvaaviksi esimerkeiksi soveltuvia ilmentämisvektoreita, joita on määrä käyttää nisäkäsisäntäsoluissa. Käyttökelpoinen järjestelmä nisäkkäiden cDNA-molekyylien ilmentämiseksi pysyvästi ja voimakkaasti hiiren maitorauhasen C127-epiteelisoluissa voidaan konstruoida olennaisesti julkaisussa Cosman, et al. [Mol. Immunol. 23 (1986) 935] kuvatulla tavalla. Käyttökelpoinen ilmentymisvektori voimakasta ilmentymistä varten, PMLSV N1/N4, joka on kuvattu julkaisussa Cosman, et al., Nature 312 (1984) 768, on talletettu hakunumerolla ATCC 39 890. Muita käyttökelpoisia nisäkäsilmentämisvektoreita on kuvattu julkaisuissa EP-A-0 367 566 ja US-patenttihakemusjulkaisussa nro 07/701 415, joka on jätetty 16.5.1991, jotka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Vektorit voivat olla peräisin retroviruksista.

Vektori voi natiivia signaalisekvenssiä koodaavan DNA:n tilalla sisältää heterologista signaalisekvenssiä koodaavaa DNA:ta. Esimerkkejä näistä ovat interleukiini-7:n (IL-7) signaalisekvenssi, joka on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 965 195; interleukiini-2-reseptorin signaalisekvenssi, joka on kuvattu julkaisussa Cosman, et

al., Nature 312 (1984) 768; interleukiini-4:n signaalipeptidi, joka on kuvattu julkaisussa EP 367 566; tyypin I interleukiini-1 -reseptorin signaalipeptidi, joka on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 968 607; ja tyypin II interleukiini-1-reseptorin signaalipeptidi, joka on kuvattu julkaisussa EP 460 846.

Proteiinin puhdistus

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön huomattavan homogeeninen hek-L-proteiini, jota voidaan valmistaa edellä kuvatulla tavalla yhdistelmäilmentämisjärjestelmiä käyttäen tai joka voidaan puhdistaa luonnossa esiintyvistä soluista. Hek-L puhdistuu huomattavan homogeeniseksi, mikä käy ilmi SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE) suoritetun analyysin jälkeen havaittavasta yhdestä proteiinivyöhykkeestä.

Yksi menetelmä hek-L-proteiinin valmistamiseksi sisältää sen, että hek-L:a koodaavaa DNA-sekvenssiä sisältävällä ilmentämisvektorilla transformoitua isäntäsolua viljellään olosuhteissa, joissa hek-L ilmentyy. Tämän jälkeen hek-L-proteiini otetaan talteen käytetyn ilmentämisjärjestelmän mukaan solujen viljelymediumista tai soluuutteista. Alan ammattikokemuksen perusteella yhdistelmä-hek-L:n puhdistetaan eri menetelmillä sellaisten tekijöiden, kuten käytettyjen isäntäsolutyyppien, mukaan ja sen mukaan, erittyykö hek-L viljelymediumiin vai ei.

Esimerkiksi käytettäessä yhdistelmäproteiinin erittymiseen perustuvia ilmentämisjärjestelmiä voidaan viljelymedium ensin konsentroida käyttäen kaupallisesti saatavilla olevaa proteiinien konsentrointisuodatinta, esimerkiksi Amicon- tai Millipore Pellicon -ultrasuodatusyksikköä. Konsentrointivaiheen jälkeen konsentraattia voidaan käsitellä puhdistusmatriksilla, kuten geelisuodatusmediumilla. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää anioninvaihtohartsia, esimerkiksi ulospäin suuntautuneita dietyyliaminoetyyli (DEAE) -ryhmiä sisältävää matriksia tai

substraattia. Matriksit voivat olla akryyliamidia, agaroosia, dekstraania, selluloosaa tai muun tyyppisiä proteiinien puhdistamisessa tavallisesti käytettäviä matrikseja. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää kationinvaihtovaihetta. Sopivia kationinvaihtimia ovat sulfopropyyli- tai karboksimetyyliryhmiä sisältävät useat erilaiset liukenemattomat matriksit. Edullisia ovat sulfopropyyliryhmät. Hek-L:n jatkopuhdistamisessa voidaan lopuksi käyttää yhtä tai useampaa korkean suorituskyvyn käänteisfaasinestekromatografia (RP-HPLC) -vaihetta, jossa käytetään hydrofobista RP-HPLC-mediumia (esimerkiksi silikageeli, jossa on ulospäin suuntautuneita metyyliryhmiä tai muita alifaattisia ryhmiä). Joitakin edellä olevia puhdistusvaiheita tai niitä kaikkia voidaan käyttää useina eri yhdistelminä olennaisesti homogeenisen yhdistelmäproteiinin aikaansaamiseksi.

Ilmennettyjen hek-L-polypeptidien affiniteettipuhdistamiseen on myös mahdollista käyttää affiniteettikolonnia, joka sisältää hek:n ligandia sitovan domeenin. Hek-L-polypeptidit voidaan poistaa affiniteettikolonnista eluointipuskurissa, jonka suolapitoisuus on korkea, ja dialysoida se tämän jälkeen käyttöä varten puskuria vastaan, jonka suolapitoisuus on matalampi. Affiniteettikolonni voi vaihtoehtoisesti sisältää hek-L:a sitovaa vasta-ainetta. Vielä yhdessä vaihtoehdossa affiniteetti kolonni sisältää hek/Fc-fuusioproteiinia, joka on sidottu proteiini-A-kolonniin.

Bakteeriviljelmässä tuotettu yhdistelmäproteiini eristetään tavallisesti hajottamalla ensin isäntäsolut, sentrifugoimalla, uuttamalla solunapeista, jos tämä on liukenematon polypeptidi, tai supernatanttinesteestä, jos tämä on liukoinen polypeptidi, minkä jälkeen suoritetaan yksi tai useampi konsentrointi-, ulossuolaus-, ioninvaihto-, affiniteettipuhdistus- tai geelisuodatuskromatografiavaihe. Lopullisiin puhdistusvaiheisiin voi-

daan lopuksi käyttää RP-HPLC:tä. Mikrobisolut voidaan hajottaa käyttäen mitä tahansa asiaankuuluvaa menetelmää, mukaan lukien toistettavat jäädytys-sulatus-syklit, ultraäänikäsittely, mekaaninen hajotus tai soluja hajottavien aineiden käyttö.

Transformoituja hiivaisäntäsoluja voidaan käyttää ilmentämään hek-L:a erittyvänä polypeptidinä. Hiivaisäntäsolujen fermentoinnista peräisin oleva eritetty yhdistelmäpolypeptidi voidaan puhdistaa menetelmillä, jotka ovat analogisia julkaisussa Urdal, et al., [J. Chromatog. 296 (1984) 171] kuvattujen menetelmien suhteen. Julkaisussa Urdal, et al. on kuvattu kaksi peräkkäistä käänteisfaasi-HPLC-vaihetta yhdistelmä-humaani-IL-2:n puhdistamiseksi preparatiivisessa HPLC-kolonnissa.

Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät hek-L-polypeptidiä ja fysiologisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta, laimenninta tai lisäainetta. Tällaiset koostumukset voivat sisältää puskureita, antioksidantteja, kuten askorbiinihappoa, pienimoolimassaisia (vähemmän kuin noin 10-ryhmäisiä) polypeptidejä, proteiineja, aminohappoja, hiilihydraatteja, joita ovat glukoosi, sakkaroosi tai dekstriinit, kelatoivia aineita, kuten EDTA:a, glutationia ja muita stabilisaattoreita ja lisäaineita. Esimerkkejä asiaankuuluvista laimentimista ovat neutraali puskuroitu fysiologinen suolaliuos tai fysiologinen suolaliuos, johon on yhdistetty samalle lajille spesifistä seerumialbumiinia.

Nukleiinihappofragmentit

Tästä keksinnöstä saadaan lisäksi käyttöön siinä esitettyjen hek-L-nukleotidisekvenssien fragmentteja. Nämä fragmentit sisältävä edullisesti vähintään noin 14 nukleotidia SEKVENSSI ID NO:1:ssä tai 3:ssa esitetystä sekvenssistä. Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön mainittuja frag-

mentteja vastaavia DNA- ja RNA-muotoja sekä hek-L-DNA:n yksijuosteisia ja kaksijuosteisia muotoja.

Tällaisten hek-L-nukleiinihappofragmenttien käyttömuotoja ovat niiden käyttö koettimena. Tällaisia koettimia voidaan käyttää lajien välisissä hybridisaatiomenetelmissä hek-L-DNA:n eristämiseksi muista nisäkäslajeista. Yhtenä esimerkkinä tällaisesta on se, että voidaan käyttää koetinta, joka vastaa hek-L:n solunulkoista domeenia. Näillä koettimilla on myös käyttöä hek-L-nukleiinihappojen havaitsemisessa in vitro -olosuhteissa suoritettavissa määrityksissä ja menetelmissä, kuten Northern- ja Southern-bloteissa. Voidaan tunnistaa hek-L:a ilmentäviä solutyyppejä. Tällaiset menetelmät ovat tunnettuja ja alan ammattikokemuksen perusteella voidaan aiotun tietyn nimenomaisen sovellutuksen mukaan valita sopivan mittainen koetin.

Muita käyttökelpoisia hek-L-nukleiinihappojen fragmentteja ovat antisense- tai sense-oligonukleotidit, jotka sisältävät yksijuosteisen nukleiinihapposekvenssin (joko RNA- tai DNA-sekvenssin), joka kykenee sitoutumaan kohteena olevaan hek-L-mRNA- (sense) tai hek-L-DNA (antisense) -sekvenssiin. Tämän keksinnön mukaiset antisense- tai sense-oligonukleotidit voivat sisältää SEKVENSSI ID NO:1:ssä tai SEKVENSSI ID NO:3:ssa esitetyn hek-L-cDNA:ta koodaavan alueen fragmentin tai tämän komplementaarisen DNA- tai RNA-muodon. Tällainen fragmentti sisältää tavallisesti vähintään noin 14 nukleotidia ja edullisesti noin 14 - 30 nukleotidia. Se, miten antisense- tai sense-oligonukleotidi kyetään valmistamaan tiettyä proteiinia vastaavan cDNA-sekvenssin perusteella, on kuvattu esimerkiksi julkaisuissa Stein ja Cohen, Cancer Res. 48 (1988) 2659 ja van der Krol, et al., BioTechniques 6 (1988) 958.

Kun antisense- tai sense-oligonukleotidit sitoutuvat nukleiinihapposekvenssikohteisiinsa, niin tämän tuloksena muodostuu duplekseja, jotka estävät translaation

(RNA) tai transkription (DNA) yhdellä monista tavoista, joita ovat dupleksien pilkkoutumisen kiihtyminen, transkription tai translaation loppuminen ennenaikaisesti tai jollakin muulla keinolla. Siten antisense-oligonukleotideja voidaan käyttää estämään hek-L-proteiinien ilmentymistä. Antisense- tai sense-oligonukleotidit sisältävät lisäksi oligonukleotideja, joiden sokeri-fosfodiesterirunkoja (tai muita sokerisidoksia, kuten julkaisussa WO 91/06 629 kuvattuja sidoksia) on muunnettu ja joissa tällaiset sokerisidokset kestävät endogeenisten nukleaasien vaikutusta. Tällaiset resistenttejä sokerisidoksia sisältävät oligonukleotidit ovat pysyviä in vivo -olosuhteissa (toisin sanoen kykenevät kestämään entsyymien vaikutuksesta tapahtuvaa pilkkoutumista), mutta ne ovat säilyttäneet sekvenssispesifisyyden, jotta ne kykenisivät sitoutumaan nukleotidisekvenssikohteisiinsa. Muita esimerkkejä sense- tai antisense-oligonukleotideista ovat oligonukleotidit, jotka on liitetty kovalenttisesti orgaanisiin ryhmiin, kuten julkaisussa WO 90/10448 kuvattuihin ryhmiin ja muihin ryhmiin, kuten poly-L-lysiiniin, joka lisää oligonukleotidin affiniteettiä kohdenukleiinihapposekvenssiä kohtaan. Sense- tai antisense-oligonukleotideihin voidaan vielä lisäksi liittää interkaloivia aineita, kuten elliptisiiniä, ja alkyloivia aineita tai metallikomplekseja antisense- tai sense-oligonukleotidin sitoutumisspesifisyyksien muokkaamiseksi kohteena olevaa nukleotidisekvenssiä kohtaan.

Antisense- tai sense-oligonukleotideja voidaan siirtää kohdenukleiinihapposekvenssin sisältävään soluun millä tahansa geenien siirtomenetelmällä, mukaan lukien esimerkiksi $CaPO_4$:n välityksellä tapahtuvalla DNA:n transfektiolla, elektroporaatiolla tai käyttämällä geenien siirtovektoreita, kuten Epstein-Barr-virusta. Antisense- tai sense-oligonukleotidit siirretään kohdenukleiinihapposekvenssin sisältävään soluun edullisesti liittämällä

antisense- tai sense-oligonukleotidi sopivaan retrovirusvektoriin, saattamalla solu sitten kosketukseen liitetyn sekvenssin sisältävän retrovirusvektorin kanssa joko in vivo- tai ex vivo -olosuhteissa. Sopivia retrovirusvektoreita ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta muriiniretrovirus M-MuLV, N2 (M-MuLV:sta peräisin oleva retrovirus) tai kaksikopioiset (double copy) vektorit, joille on annettu nimitykset DCT5A, DC75B ja DC75C (näitä on käsitelty PCT-patenttihakemusjulkaisussa US 90/02 656).

Sense- tai antisense-oligonukleotideja voidaan myös siirtää kohdenukleotidisekvenssin sisältävään soluun muodostamalla konjugaatti ligandia sitovan molekyylin kanssa julkaisussa WO 91/04753 kuvatulla tavalla. Sopivia ligandia sitovia molekyylejä ovat mainittuihin kuitenkaan rajoittumatta solun pinnan reseptorit, kasvutekijät, muut sytokiinit tai muut solun pinnan reseptoreihin sitoutuvat ligandit. Ligandia sitovan molekyylin konjugointi ei edullisesti häiritse huomattavasti ligandia sitovan molekyylin kykyä sitoutua sitä vastaavaan molekyyliin tai reseptoriin tai estä sense- tai antisense-oligonukleotidin tai sen konjugoidun muunnoksen siirtymistä soluun.

Sense- tai antisense-oligonukleotidi voidaan viedä kohdenukleotidisekvenssiä sisältävään soluun vaihtoehtoisesti muodostamalla oligonukleotidin ja lipidin välinen kompleksi julkaisussa WO 90/10448 kuvatulla tavalla. Endogeeninen lipaasi dissosioi edullisesti solussa sense- tai antisense-oligonukleotidin ja lipidin muodostaman kompleksin.

Seuraavat esimerkit esitetään tiettyjen nimenomaisten sovellutusmuotojen valaisemiseksi eikä tämän keksinnön suojapiirin rajoittamiseksi.

Esimerkki 1: Liukoisen hek/Fc-fuusioproteiinin valmistus

Tässä esimerkissä kuvataan sellaisen liukoista hek/Fc-fuusioproteiinia koodaavan ilmentämisvektorin kons-

truktio, joka on tarkoitettu käytettäväksi hek:n ligandia (hek-L:a) koodaavien cDNA-kloonien eristämisessä. Humaani-hek:n cDNA:n DNA-sekvenssi ja tämän koodaama aminohapposekvenssi on esitetty julkaisussa Wicks, et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 1611], joka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Tämä hek-proteiini sisältää (N-terminaalisesta päästä C-terminaaliseen päähän lueteltuna) solunulkoisen domeenin, transmembraanidomeenin ja sytoplasmisen domeenin.

Käyttämällä polymeraasiketjureaktiota (PCR), joka oli suoritettu vakio-olosuhteissa käyttäen Wicks, et al.':n (edellä) julkaiseman hek:n nukleotidisekvenssiin perustuvia alukkeita, eristettiin kaksi DNA-fragmenttia, joista toinen koodasi hek:n solunulkoisen domeenin N-terminaalista fragmenttia ja toinen koodasi hek:n solunulkoisen domeenin C-terminaalista fragmenttia. PCR:ään käytetty templaatti oli humaani-T-soluleukemiasolulinjasta, jolle on annettu nimitys CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1) eristetystä mRNA:sta valmistettu cDNA. Hek:n DNA:n 5'-pään sisältävät PCR-tuotteet pilkottiin SpeI:llä ja HindIII:lla sellaisen DNA-fragmentin eristämiseksi, joka ulottui kypsän humaani-hek:n sekvenssin 5'-päästä (tästä toisin sanoen puuttui signaalisekvenssiä koodaava DNA) hek-geenissä olevaan HindIII-kohtaan. Hek:n solunulkoisen domeenin DNA:n 3'-pään sisältävät PCR-tuotteet pilkottiin HindIII:lla ja ClaI:llä sellaisen fragmentin eristämiseksi, joka ulottui sisäisestä HindIII-kohdasta heti hek:n solunulkoista domeenia koodaavan sekvenssin 3'-pään jälkeen myötäsuuntaan sijaitsevaan ClaI-kohtaan. Tämä ClaI on monikäyttöisessä kloonauskohdassa (multiple cloning site, mcs), joka on liitetty molekyyliin myötäsuuntaan heti solunulkoisen domeenin jälkeen.

Eristettiin DNA, joka koodaa humaani-IgG1-vasta-aineen muteiinin Fc-aluetta. Tämä Fc-muteiinin DNA ja tä-

män koodaama polypeptidi on kuvattu US-patenttihakemusjulkaisussa nro 08/097 827, jonka otsikko on "Novel Cytokine Which is a Ligand for OX40", joka on jätetty 23.7.1993 ja joka patenttihakemusjulkaisu on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Tämä muteiini-DNA oli valmistettu natiivia Fc-polypeptidiä koodaavasta DNA:sta kohdemutageneesilla olennaisesti Deng'in ja Nickoloff'in, Anal. Biochem. 200 (1992) 81, kuvaamalla tavalla. Tämän Fc-muteiinipolypeptidin aminohapposekvenssi on identtinen PCT-patenttihakemusjulkaisussa WO 93/10151 kuvatun natiivin Fc-polypeptidin aminohapposekvenssin suhteen lukuun ottamatta sitä, että aminohappo 19 on muutettu Leu:sta Ala:ksi, aminohappo 20 on muutettu Leu:sta Glu:ksi ja aminohappo 22 on muutettu Gly:stä Ala:ksi. Tämän muteiini-Fc:n affiniteetti immunoglobuliinireseptoreita kohtaan on normaalia pienempi.

Fc-muteiini-DNA:ta sisältävä yhdistelmävektori pilkottiin ClaI:llä ja NotI:llä, jotka katkaisevat vektorin polylinker-alueen sisällä kohdista, jotka ovat vastasuuntaan ja myötäsuuntaan, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna, heti Fc-muteiini-DNA-liitosjakson ulkopuolella. Haluttu Fc-muteiinia koodaava fragmentti eristettiin.

Tämä muteiini-Fc-polypeptidi ulottuu N-terminaalisesta sarana-alueesta natiiviin C-terminaaliseen päähän, joten se on toisin sanoen olennaisesti vasta-aineen täysimittainen Fc-alue. Voidaan myös käyttää Fc-alueiden fragmentteja, esimerkiksi C-terminaalisesta päästä typistettyjä fragmentteja. Nämä fragmentit sisältävät edullisesti useita kysteiiniryhmiä (ainakin sarana-alueella olevat kysteiiniryhmät), jotta kahden erillisen hek/Fc-fuusioproteiinin Fc-polypeptidiosien välille on mahdollista muodostua ketjujen välisiä disulfidisidoksia, mistä muodostuu dimeereitä.

Nisäkäsilmentämisvektori, jolle oli annettu nimitys SMAG4, pilkottiin SpeI:llä ja NotI:llä. SMAG4 sisältää

muriini-interleukiini-7:n signaalipeptidiä koodaavan sekvenssin (tämä on kuvattu US-patenttijulkaisussa 4 965 195), joka on liitetty voimakkaasti ilmentyvään nisäkäsilmentämisvektoriin pDC201 [tämä on kuvattu julkaisussa Sims, et al., Science 241 (1988) 585 ja PCT-patenttihakemusjulkaisussa WO 89/03 884], joka kykenee myös replikoitumaan E. colissa. SpeI pilkkoo tämän vektorin heti myötäsuuntaan IL-7:n signaalipeptidiä koodaavan sekvenssin jälkeen. Katkaisu NotI:llä tapahtuu noin 155 ep myötäsuuntaan vektorin monikäyttöisessä kloonauskohdassa olevasta SpeI-kohdasta. Eristettiin vektorin sekvenssejä ja IL-7:n signaalipeptidiä koodaavan DNA:n sisältävä suuri SpeI/NotI-fragmentti.

Kahden hek:ia koodaavan DNA-fragmentin ja edellä kuvatun Fc-muteiinia koodaavan DNA-fragmentin liittämiseksi suoritettiin neljän osapuolen ligaatio SpeI:n ja NotI:n seoksella pilkottuun SMAG4-ilmentämisvektoriin. Tällä ligaatioseoksella transfektoitiin E. coli -soluja ja näistä eristettiin haluttu yhdistelmävektori. Eristetty vektori koodaa fuusioproteiinia, joka sisältää (N-terminaalisesta päästä C-terminaaliseen päähän lueteltuna) muriini-IL-7:n signaalipeptidin, hek:n solunulkoisen domeenin, neljä liitetyn mcs-sekvenssin koodaamaa aminohappoa ja Fc-muteiinin.

Tämän jälkeen ilmentämisvektori transfektoitiin yhdessä pSV3.NEO-plasmidin kanssa CV1/EBNA-soluihin. CV1/EBNA-solulinja (ATCC CRL 10478) oli johdettu apinan munuaissolulinjasta McMahan, et al.':n julkaisussa [EMBO J. 10 (1991) 2821] kuvatulla tavalla. pSV3.NEO-vektori ilmentää SV40:n T-antigeenia, jota nämä isäntäsolut eivät tuota. pSV3.NEO on samanlainen kuin pSV3 [Mulligan ja Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 2072] mutta se sisältää lisäksi neomysiiniresistenssigeenin. Transformoituja soluja viljeltiin siinä tarkoituksessa, että fuusioproteiinilla, joka erittyy viljelymediumiin muriini-

IL-7:n signaalipeptidin välityksellä, olisi ollut tilaisuus ilmentyä väliaikaisesti. Fuusioproteiini puhdistettiin proteiini-A-Sepharose-kolonnissa, eluoitiin ja sitä käytettiin esimerkeissä 2 ja 3 kuvatulla tavalla solujen seulontaan, jolla oli tarkoitus poimia esiin solut, jotka kykenevät sitomaan hek/Fc-proteiinia.

Esimerkki 2: hek/Fc:tä sitovien solujen seulonta

Useita erilaisia solutyyppejä seulottiin sen suhteen, miten ne kykenivät sitomaan hek/Fc:tä, sellaisten ehdolle otettavien solutyyppien tunnistamiseksi, jotka olisivat käyttökelpoisia nukleiinihappomateriaalilähteenä hek:n ligandin kloonausyrityksessä. Soluja inkuboitiin esimerkissä 1 valmistetun hek/Fc-proteiinin kanssa ja sitten hiiressä tehdyn ja biotinyloidun anti-humaani-Fc-vasta-aineen kanssa ja tämän jälkeen streptavidiini-fykoerytriinin (Becton-Dickinson) kanssa. Solut pestiin vaiheiden välillä sitoutumattomien reagenssien poistamiseksi. Biotinyloitu vasta-aine hankittiin yhtiöstä Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA. Tämän vasta-aineen sitoutuminen Fcγ-reseptoriin sitoutuneisiin Fc-proteiineihin oli mahdollisimman vähäistä. Streptavidiini sitoutuu anti-humaani-Fc-vasta-aineeseen kiinnitettyyn biotiinimolekyyliin ja tämä taas puolestaan sitoutuu hek/Fc-fuusioproteiinin Fc-osaan. Fykoerytriiini on fluoresoiva fykobiliproteiini, joka toimii havaittavissa olevana leimana. Kustakin solutyypistä määritettiin fluoresenssisignaalin suuruus käyttäen FACScan®-virtaussytometriä (Becton-Dickinson).

Humaani-T-soluleukemiasolulinja, jolle oli annettu nimitys CCRF-HSB-2 (ATCC CCL 120.1) antoi hek/Fc:n sitomisen suhteen positiivisen tuloksen. CCRF-HSB-2-solut lajiteltiin neljä kertaa FACS'in (fluoresenssin perusteella aktivoituva solulajittelu) avulla sellaisten solujen aikaansaamiseksi, joissa hek/Fc:tä sitovan proteiinin ilmentyminen on voimistunut.

Esimerkki 3: hek:n ligandin cDNA:n eristys

Neljä kertaa lajitelluista CCRF-HSB-2-soluista eristettiin mRNA ja mRNA-templaatilla syntetoitiin kaksijuosteista cDNA:ta vakiomenetelmiä käyttäen. cDNA-kirjasto valmistettiin ligatoimalla cDNA pDC410:n BglII-kohtaan käyttäen adapterimenetelmää, joka on samanlainen kuin Haymerle, et al.':n [Nucl. Acids Res. 14 (1986) 8615] kuvaama menetelmä. pDC410 on ilmentämisvektori, joka on samanlainen kuin pDC406 [McMahan, et al., EMBO J. 10 (1991) 2821]. pDC410:ssa on pDC402:ssa olleen EBV:n replikaation alkukohdan tilalla DNA:ta, joka koodaa SV40:n suurta T-antigeeniä (tämän ilmentyminen on SV40-promoottorin ohjaamaa). pDC410:n monikäyttöinen kloonauskohta (mcs) eroaa pDC406:n vastaavasta kohdasta siinä suhteessa, että se sisältää muita restriktiokohtia ja kolme lopetuskodonia (yksi kussakin lukukehyksessä). Mcs-kohdan suhteen myötäsuunnassa oleva T7-polymeraasin promoottori edistää mcs:ään liitetyn DNA:n sekvensointia.

E. coli DH5α-kannan soluja, jotka oli transfektoitu pDC410:een valmistetulla cDNA-kirjastolla, maljattiin siten, että seoksesta saatiin noin 2000 pesäkettä maljaa kohti. Pesäkkeet kaavittiin kustakin maljasta, yhdistettiin ja kustakin pesäkkeistä yhdistetystä erästä valmistettiin plasmidi-DNA. Tämän jälkeen noin 2000 pesäkettä edustavaa yhdistettyä DNA:ta käytettiin transfektoimaan vielä toisiinsa kiinnikasvamattomista pesäkkeistä muodostunut CV1/EBNA-1-solukerros (nämä solut on kuvattu esimerkissä 1). CV1/EBNA-1-soluja oli kasvatettu ennen transfektiota täydellisessä mediumissa [Dulbeccon modifioima Eaglen medium (DMEM), joka sisälsi 10-%:ista fetaalista vasikanseerumia (FCS), 50 U/ml penisilliiniä, 50 U/ml streptomysiiniä, 2 mM L-glutamiinia] ja ne oli maljattu yksikammioisille aluslaseille (Lab-Tek) solutiheyteen 2 x 10^5/kuoppa. Transfektioon liittyi DEAE-dekstraanikäsittely ja tämän jälkeen tehty klorokiinikäsittely, jotka tapah-

tuivat samalla tavoin kuin Luthman, et al.':n, Nucl. Acids Res. 11 (1983) 1295 sekä McCutchan, et al.':n, J. Natl. Cancer Inst. 41 (1986) 351, kuvaamassa menetelmässä. Tarkempiin yksityiskohtiin puuttumatta, aluslaseja esikäsiteltiin 30 minuutin ajan 1 ml:lla humaanifibronektiiniä (10 µg/ml PBS:ssä), minkä jälkeen aluslasit pestiin kerran PBS:llä. Medium poistettiin alustaansa tarttuneesta solukerroksesta ja sen tilalle pipetoitiin 1,5 ml täydellistä mediumia, joka sisälsi 66,6 µM klorokiinisulfaattia. Soluihin lisättiin sitten 0,2 ml DNA-liuosta (2 µg DNA:ta, 0,5 mg/ml DEAE-dekstraania klorokiinia sisältävässä täydellisessä mediumissa) ja soluja inkuboitiin 5 tuntia. Medium poistettiin inkuboinnin jälkeen ja soluille suoritettiin sokkikäsittely lisäämällä kuoppaan 2,5 - 20 minuutin ajaksi täydellistä mediumia, joka sisälsi 10 % DMSO:ta, minkä jälkeen liuoksen tilalle lisättiin uutta täydellistä mediumia. Soluja viljeltiin 2 - 3 päivää, jotta liittyneillä sekvensseillä olisi tilaisuus ilmentyä väliaikaisesti.

Hek-L:n ilmentyminen määritettiin transfektoiduista CV1/EBNA-1-solujen yksisolukerroksista käyttämällä Gearing, et al.':n [EMBO J. 8 (1989) 3667] aluslasiautoradiografiamenetelmää menetellen seuraavaksi kuvattavalla tavalla. Hiiressä tehty anti-humaani-Fc-vasta-aine (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) varustettiin radioaktiivisella jodileimalla kloramiini-T-menetelmällä määrityksessä käytettäväksi. Yksityiskohdat sivuuttaen esikäsiteltiin P6-kolonni valmistajan ohjeiden mukaisesti. 10 µg vasta-ainetta liuotettiin mikrosentrifugiputkessa 10 µl:aan PBS:ää. Seokseen lisättiin 2000 µCi kantaja-aineetonta $Na^{125}I$:tä ja liuosta sekoitettiin huolellisesti. Seokseen lisättiin sitten 15 µl juuri valmistettua kloramiini-T-liuosta [32 µg/ml 0,05 M natriumfosfaattipuskurissa (pH 7,2)] ja seosta inkuboitiin 30 minuuttia huoneenlämmössä. Seos pipetoitiin välittömäs-

ti P6-kolonniin. Tämän jälkeen radioaktiivisella leimalla varustettu vasta-aine eluoitiin kolonnista ottamalla talteen 100 - 150 µl:n suuruisia eluaattifraktioita. Aktiivisuushuipun kohdalla oleviin fraktioihin lisättiin sitoutumismediumia (RPMI, joka sisälsi 25 mg/ml naudan seerumialbumiinia, 2 mg/ml natriumatsidia, 20 mM Hepes'iä, pH 7,2) kunkin fraktion kokonaistilavuuden säätämiseksi 2 ml:ksi. Radiojodiointi tuotti ominaisaktiivisuustasoja, jotka olivat 5 - 10 x 10^15 cpm/mmol proteiinia.

Aluslasiautoradiografia suoritettiin seuraavasti. Transfektoidut CV1/EBNA-1-solut (nämä olivat kiinnittyneenä kammioihin jaettuihin aluslaseihin) pestiin kerran sitoutumismediumilla, joka sisälsi rasvatonta kuivamaitoa (BM-NFDM) [RPMI-medium 1640, joka sisälsi 25 mg/ml naudan seerumialbumiinia (BSA), 2 mg/ml natriumatsidia, 20 mM HEPES'iä, pH 7,2, ja 50 mg/ml rasvatonta kuivamaitoa]. Soluja inkuboitiin sitten 1 tunnin ajan huoneenlämmössä hek/Fc:n (tämä oli valmistettu esimerkissä 1) kanssa BM-NFDM:ssä (1 µg/ml). Kammioihin jaetuissa aluslaseissa olevat solun paksuiset solukerrokset pestiin kolme kertaa BM-NFDM:llä sitoutumattoman hek/Fc-fuusioproteiinin poistamiseksi ja niitä inkuboitiin sitten 1 tunnin ajan huoneenlämmössä ^{125}I-leimalla varustetun hiiressä tehdyn anti-humaani-Fc-vasta-aineen (suhteessa 1 : 50 valmistettu laimennos) kanssa, jonka konsentraatio oli 40 ng/ml. Solut pestiin kolme kertaa BM-NFDM:llä ja sitten kaksi kertaa fosfaatilla puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (PBS) kiinnittymättömän ^{125}I-leimalla varustetun hiiressä tehdyn anti-humaani-Fc-vasta-aineen poistamiseksi. Solut kiinnitettiin inkuboimalla niitä 30 minuuttia huoneenlämmössä PBS:ään valmistetussa 2,5-%:isessa gluraarialdehydissä, jonka pH oli 7,3, pestiin kaksi kertaa PBS:ssä ja kuivattiin ilmassa. Soluja sisältävät kammioihin jaetut aluslasit vietiin valotettavaksi Phophorimager-laitteeseen (Molecular Dynamics) ja kastettiin sitten Ko-

dak'in GTNB-2-valokuvausemulsioon (veteen tehty kuusinkertainen laimennos) ja valotettiin pimeässä 3 - 5 päivää 4 °C:ssa valonpitävässä kammiossa.Tämän jälkeen aluslasit kehitettiin noin 4 minuutin ajan Kodak'in D19-kehitteessä (40 g/500 ml vettä), huuhdeltiin vedessä ja kiinnitettiin Agfan G433C-kiinnitteessä. Aluslasit tutkittiin yksitellen mikroskoopilla 25 - 40-kertaisella suurennoksella ja hek-L:a ilmentävät positiiviset solut tunnistettiin vaaleaa taustaa vastaan havaittujen autoradiografisten hopeajyvästen perusteella.

Noin 300 000 cDNA-molekyyliä seulottiin noin 2000 cDNA-molekyylistä kootuissa yhdistetyissä erissä sellaisten koottujen transfektanttiyhdistelmien tunnistamiseksi, joissa esiintyi useita hek/Fc:n sitoutumisen suhteen positiivisia soluja. Tämän jälkeen positiivisen reaktion antanut yhdistetty erä jaettiin 500 molekyylistä koottuihin yhdistettyihin eriin ja seulottiin uudelleen aluslasiautoradiografiaa käyttäen. Näistä tunnistettiin positiivinen yhdistetty erä, tämä jaettiin 100 molekyylistä yhdistettyihin eriin ja seulottiin samalla menetelmällä. Positiivisesta yhdistetystä erästä peräisin olevia yksittäisiä pesäkkeitä seulottiin siihen asti, kunnes tunnistettiin yksittäinen klooni (klooni #2), joka ohjasi sellaisen pintaproteiinin synteesiä, jolla oli havaittavaa hek/Fc:tä sitovaa aktiivisuutta. Toinen klooni, jolle annettiin nimitys C6, eristettiin edellisestä poikkeavasta positiivisesta yhdistetystä erästä. Kummankin kloonin cDNA-liitosjaksot sekvensoitiin.

Kloonin A2 humaani-hek:n ligandin cDNA:n koodaavan alueen nukleotidisekvenssi ja sen koodaama aminohapposekvenssi on esitetty SEKVENSSI ID NO:1:ssa ja SEKVENSSI ID NO:2:ssa. Proteiini sisältää N-terminaalisen signaalipeptidin (aminohapot -19 - -1), solunulkoisen domeenin (aminohapot 1 - 202) ja hydrofobisen alueen sisältävän C-terminaalisen domeenin (aminohapot 203 - 219).

Humaani-hek-L:n cDNA irrotettiin kloonista A2 pilkkomalla tämä BglII:lla. Irrotettu cDNA kloonattiin pBLUESCRIPT® SK(-):n (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) BamHI-kohtaan (tämä sijaitsi monikäyttöisessä kloonauskohdassa). Tulokseksi saatu E. coli DH5α-soluissa oleva vektori (tälle oli annettu nimitys A2/pBS) talletettiin 11.8.1993 talletuslaitokseen American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) ja sille annettiin hakunumero ATCC 69384. Talletus tehtiin Budapestin sopimuksen ehtoja noudattaen.

Kloonista C6 peräisin olevan humaani-hek:n ligandin cDNA:n koodaavan alueen nukleotidisekvenssi ja sen koodaama aminohapposekvenssi on esitetty SEKVENSSI ID NO:3:ssa ja SEKVENSSI ID NO:4:ssä. Proteiini sisältää N-terminaalisen signaalipeptidin (aminohapot -22 - -1), solunulkoisen domeenin (aminohapot 1 - 160) ja hydrofobisen alueen sisältävän C-terminaalisen domeenin (aminohapot 161 - 179).

Humaani-hek-L:n cDNA irrotettiin kloonista C6 pilkkomalla tämä BglII:lla ja se liitettiin pBLUESCRIPT® SK(-):n BamHI-kohtaan. Tulokseksi saatu E. coli DH5α-soluissa oleva vektori (tälle oli annettu nimitys C6/pBS) talletettiin 25.8.1993 talletuslaitokseen American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) ja sille annettiin hakunumero ATCC 69395. Talletus tehtiin Budapestin sopimuksen ehtoja noudattaen.

Edellä kuvatut hek-L-proteiinien domeenien rajakohdat ovat likimääräiset, mikä on selvää alan ammattikokemuksen perusteella. Esimerkiksi kloonin A2 koodaaman hek-L:n kyseessä ollessa signaalipeptidi sisältää todennäköisimmin aminohapot -19 - -1, mutta on mahdollista, että signaalipeptidi muodostuu aminohapoista -19 - 3. Signaalipeptidin pilkkoutuminen voi siten tapahtua aminohappojen -1 ja 1 välistä tai aminohappojen 3 ja 4 välistä tai näistä molemmista kohdista. Termien "signaalipeptidi" ja "kypsä proteiini" on siinä muodossa, missä niitä on

käytetty tässä keksinnössä tarkoittamaan kloonin A2 koodaamaa hek-L:a, katsottava sisältävän molemmat vaihtoehdot sekä muut kloonien A2 tai C6 koodaamia hek-L-polypeptidejä koskevat tässä keksinnössä kuvatut vaihtoehdot.

Kloonin A2 tai kloonin C6 koodaamien hek-L-proteiinien on havaittu kiinnittyvän solumembraaniin glykosyylifosfatidyyli-inositoli (GPI) -ryhmien välityksellä. Hydrofobisten domeenien arvellaan siten sisältävän GPI:n välityksellä tapahtuvaa kiinnittymistä vastaavia signaaleja. GPI:n välityksellä tapahtuvan kiinnittymisen aikaansaamiseen tarvittavaa proteiinien muokkausta, joka sisältää C-terminaalisten sekvenssien pilkkomista, on kuvattu edellä.

Esimerkki 4: hek-L:a vastaan suunnatut monoklonaaliset vasta-aineet

Tämä esimerkki valaisee hek-L:a vastaan suunnattujen monoklonaalisten vasta-aineiden valmistusta. Hek-L:a ilmennetään nisäkäsisäntäsoluissa, kuten COS-7- tai CV-1/EBNA-1-soluissa, ja se puhdistetaan hek/Fc-affiniteettikromatografiaa käyttäen. Puhdistettua hek-L:a (tai tämän fragmenttia, kuten solunulkoista domeenia tai tämän immunogeenisiä peptidifragmentteja) voidaan käyttää hek-L:a vastaan suunnattujen monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseen tavanomaisia menetelmiä käyttäen, esimerkiksi käyttäen US-patenttijulkaisussa 4 411 993 kuvattuja menetelmiä. Yksityiskohdat sivuuttaen immunisoidaan hiiriä käyttäen hek-L:a täydelliseen Freundin adjuvanttiin emulgoituna immunogeeninä ja tätä injektoidaan eläimiin ihonalaisesti tai vatsaontelonsisäisesti alueelta 10 - 100 μg olevia määriä. 10 - 12 päivän kuluttua immunisoiduille hiirille annetaan tehosterokotus uudella hek-L-erällä, joka on emulgoitu epätäydelliseen Freundin adjuvanttiin. Tämän jälkeen hiirille annetaan tehosterokotuksia määrävälein viikosta kahteen viikkoon muodostuvista jaksoista koostuvaa immunisointiaikataulua noudattaen.

Seeruminäytteitä otetaan ajoittain ottamalla verta silmäkuopan takaa tai katkaisemalla hännän pää hek-L-vasta-aineiden tutkimiseksi täpläblottimäärityksen tai ELISA:n (entsyymivälitteisen immunosorbenttimäärityksen) avulla.

Kun asiaankuuluvan vasta-ainetiitterin on havaittu syntyneen, annetaan positiivisille eläimille yksi viimeinen suonensisäinen injektio fysiologiseen suolaliuokseen valmistettua hek-L:a. Eläimet tapetaan 3 - 4 päivää myöhemmin, pernasolut otetaan talteen ja pernasolut fuusioidaan hiiren myeloomasolulinjaan, esimerkiksi NS1:een tai edullisesti P3x63Ag8.653:een (ATCC CRL 1580). Fuusioista muodostuu hybridoomasoluja, jotka maljataan useille mikrotiitterilevyille HAT (hypoksantiini, aminopteriini ja tymidiini) -selektiomediumiin, jonka tarkoituksena on estää fuusioitumattomien solujen, myeloomahybridien ja pernasoluhybridien lisääntyminen.

Hybridoomasoluista seulotaan ELISA:a käyttäen niiden reagoivuus puhdistettua hek-L:a vastaan käyttämällä muunnelmia menetelmistä, jotka on kuvattu julkaisussa Engvall, et al., Immunochem. 8 (1971) 871 ja US-patenttijulkaisussa 4 703 004. Edullinen seulontamenetelmä on vasta-aineeseen perustuva pidättämismenetelmä (antibody capture), joka on kuvattu julkaisussa Beckmann, et al. [J. Immunol. 144 (1990) 4242]. Positiiviset hybridoomasolut voidaan injektoida intraperitoneaalisesti syngeenisiin BALB/c-hiiriin sellaisen askitesnesteen tuottamiseksi, joka sisältää suuria konsentraatioita hek-L:a vastaan suunnattuja monoklonaalisia vasta-aineita. Hybridoomasoluja voidaan vaihtoehtoisesti kasvattaa in vitro -olosuhteissa pulloissa tai pyörityslaitteen pulloissa useita erilaisia menetelmiä käyttäen. Monoklonaaliset vasta-aineet, joita hiiret ovat tuottaneet askitesnesteeseen, voidaan puhdistaa ammoniumsulfaattisaostuksella ja tämän jälkeen suoritettavalla geelikromatografialla. Vaihtoehtoisesti voidaan myös käyttää affiniteettikromato-

grafiaa, joka perustuu siihen, että vasta-aine sitoutuu proteiini-A:han tai proteiini-G:hen, kuten voidaan myös käyttää affiniteettikromatografiaa, joka perustuu sitoutumiseen hek-L:iin.

Esimerkki 5: Sitoutumistutkimukset

Määritettiin tämän keksinnön mukaisten hek-ligandien affiniteetti hek:ia kohtaan. Hek-ligandien havaittiin myös sitoutuvan hek:stä erotettavissa olevaan elk-reseptorityrosiinikinaasiin. Tutkittiin myös tiettyjen muiden proteiinien kykyä sitoutua hek:iin tai elk:iin. Nämä tutkimukset suoritettiin seuraavasti.

a) hek:n sitoutuminen

CV1-EBNA-1-solut (nämä on kuvattu esimerkissä 1), joita pidettiin 12-kuoppaisissa levyissä (2,5 x 10^5 solua/kuoppa), transfektoitiin kloonilla A2 tai kloonilla C6 (ilmentämisvektorissa pDC410 olevalla klooni A2:n cDNA:lla tai klooni C6:n cDNA:lla esimerkissä 3 kuvatulla tavalla). Transfektoituja soluja viljeltiin kaksi päivää, jotta lopulta solun membraaniin jääneillä hek-L-proteiineilla olisi ollut tilaisuus ilmentyä. Solut pestiin sitten BM-NFDM:llä (ks. esimerkki 3) ja niitä inkuboitiin 1 tunnin ajan huoneenlämmössä esimerkissä 1 valmistetun hek/Fc-fuusioproteiinin kanssa, josta käytettiin useita eri konsentraatioita. Tämän jälkeen solut pestiin ja niitä inkuboitiin varovasti liikutellen 1 tunnin ajan 37 °C:ssa sitoutumismediumissa esimerkissä 3 valmistetun hiiressä tehdyn ^{125}I-leimalla varustetun anti-humaani-IgG-vasta-aineen (40 mg/ml) kanssa. Solut koottiin sitten talteen trypsinisoimalla. Kaikissa määrityksissä määritettiin ^{125}I-vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen siten, että hek/Fc jätettiin pois, ja siten, että käytettiin hek/Fc:tä sekä 200-kertaista mooliylimäärää leimalla varustamatonta hiiressä tehtyä anti-humaani-IgG-vasta-ainetta. Vapaa ja soluihin sitoutunut ^{125}I-vasta-aine kvantitoitiin Packard'in Autogamma-laskijassa. Affiniteettilaskutoimitukset

[Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci 51 (1949) 660] tehtiin käyttäen RS/1:tä (BBN Software, Boston, MA), joka oli asennettu toimimaan Microvax-tietokoneeseen. Samaan sitoutumistutkimukseen oli liitetty kontrolleiksi "tyhjällä" pDC410-vektorilla transformoituja CV1-EBNA-1-soluja.

Edellä kuvatussa kokeessa analysoitiin myös hek/Fc:n sitoutuminen kahta erilaista yhdistelmäproteiinia, humaani-elk:a ja humaani B61:tä, ilmentäviin CV1-EBNA-1-soluihin. Solut oli transfektoitu pDC410-vektoriin sisältyvien elk-ligandin (elk-L) tai B61:n cDNA-molekyyleillä. Ilmennetyt proteiinit olivat solun membraaniin kiinnittyneitä.

Elk-L sitoutuu reseptoriin, josta käytetään nimitystä elk, joka hek:n tavoin on eph/elk-reseptori-tyrosiinikinaasien ryhmän jäsen (ks. edellä oleva kappale "Keksinnön tausta"). elk-L otettiin mukaan tähän tutkimukseen sen tutkimiseksi, sitoutuuko se mahdollisesti johonkin muuhun saman ryhmän reseptoriin (toisin sanoen hek:iin). Proteiini, josta käytetään nimitystä B61, on tunnistettu uuden esivarhaisen vasteen geenin tuotteeksi, jonka muodostuminen käynnistyy TNF:n vaikutuksesta humaaninapalaskimon endoteelisoluissa [Holzman, et al., Mol. Cell. Biol. 10 (1990) 5830]. B61 otettiin mukaan tähän tutkimukseen siitä syystä, että sillä on homologiaa elk-L:n suhteen (identtisyys aminohappotasolla 33 %).

Eristetyn B61:n cDNA:n nukleotidisekvenssi ja sen koodaama aminohapposekvenssi on esitetty julkaisussa Holzman, et al., edellä, joka on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Kyseisessä julkaisussa on myös kuvattu menetelmiä B61:n valmistamiseksi ja talteenottamiseksi, minkä ohella siinä on kuvattu tämän proteiinin tiettyjä rakenteellisia piirteitä ja ominaisuuksia. elk-L:n cDNA:n nukleotidisekvenssi ja sen koodaama aminohapposekvenssi on esitetty samanaikaisesti haettavana olevassa US-patenttihakemus-

julkaisussa nro 07/977 693, joka on jätetty 13.11.1993 ja joka on liitetty kokonaisuudessaan tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Kyseisessä julkaisussa on myös kuvattu elk-L:n valmistaminen ja puhdistus ja siinä on tunnistettu proteiinin tietyt toiminnalliset domeenit. E. coli DH5α-solut, jotka oli transformoitu pBLUESCRIPT®SK (Stratagene, La Jolla, CA) -kloonausvektorilla, jonka SmaI-kohtaan (mcs-alueelle) oli liitetty humaani-elk-L:n cDNA, talletettiin 9.10.1992 talletusnumerolla ATCC 69085.

Tutkimuksen tulokset olivat:

Taulukko I

	Sitoutumisaffiniteetti hek/Fc:tä kohtaan (K_a)
pDC410	---
B61	$5,5 \times 10^7\ M^{-1}$
elk-L	$2,3 \times 10^7\ M^{-1}$, $2,9 \times 10^6\ M^{-1}$
hek-L A2	$2,0 \times 10^8\ M^{-1}$
hek-L C6	$2,0 \times 10^8\ M^{-1}$

Tyhjällä vektorilla ei esiintynyt havaittavaa hek/Fc:n sitoutumista. B61:n sitoutumisaffiniteetti hek/Fc:tä kohtaan oli suhteellisen kohtalaista luokkaa ja sillä esiintyi yhden affiniteettiluokan sitoutumista. Hek/Fc:n sitoutuminen elk-L:iin tuotti kaksivaiheisen tuloksen, joka viittasi kahden affiniteetiltaan pienemmän komponentin esiintymiseen (affiniteettivakiot $2,3 \times 10^7\ M^{-1}$ ja $2,9 \times 10^6\ M^{-1}$). Kahden hek-L-proteiinin affiniteetit hek/Fc:tä kohtaan olivat vastaavansuuruiset ja suhteellisen korkeat.

b) elk:n sitoutuminen

Edellä kuvattu sitoutumismääritys toistettiin käyttämällä hek/Fc:n tilalla liukoista rotan elk/Fc-fuusioproteiinia. Rotan elk:n nukleotidisekvenssi ja sen koodaama aminohapposekvenssi on esitetty julkaisussa Lhotak, et al., [Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 2496]. elk/Fc-fuusioproteiini sisälsi elk:n solunulkoisen domeenin fuusioituna

humaani-IgG1-vasta-aineesta peräisin olevaan natiivin Fc-alueen polypeptidiin. Käytettiin epäsuoraa määritystä, (käyttäen ilman leimaa olevaa elk/Fc:tä ja hiiressä tehtyä radiojodioitua anti-humaani-IgG1-vasta-ainetta), koska elk/Fc:n varustaminen suoraan radioaktiivisella leimalla hävitti sen sitoutumisspesifisyyden.

Tutkimuksen tulokset olivat:

Taulukko II

	Sitoutumisaffiniteetti elk/Fc:n suhteen (K_a)
B61	$2,3 \times 10^8\ M^{-1}$; $7,0 \times 10^6\ M^{-1}$
elk-L	$1,08 \times 10^9\ M^{-1}$
hek-L A2	$2,7 \times 10^8\ M^{-1}$; $3,5 \times 10^7\ M^{-1}$
hek-L C6	$1,3 \times 10^8\ M^{-1}$; $5,4 \times 10^7\ M^{-1}$

B61:n kyseessä ollessa havaittiin kaksivaiheinen sitoutumistulos, jossa K_a:t olivat $2,3 \times 10^8\ M^{-1}$ ja $7,0 \times 10^6\ M^{-1}$. elk-L:a ilmentäviin transfektoituihin soluihin tapahtuvalle elk/Fc:n sitoutumiselle esitetty affiniteettivakio (K_a) on yhteensopiva niiden affiniteettivakioiden suhteen, joita on havaittu elk/Fc:n sitoutumiselle natiiviin ligandiin, joka ilmentyy useissa erilaisissa rotan neuraalisolulinjoissa. Kummankin hek-ligandin kyseessä ollessa havaitaan elk/Fc:n sitoutumisen olevan kaksivaiheista.

Esimerkki 6: Homologia

Täysimittaisen humaani elk-L-, B61-, hek-ligandi A2- ja hek-ligandi C6 -proteiinien (nämä on kuvattu esimerkissä 5) homologia toinen toistaan kohtaan aminohappotasolla on esitetty taulukossa III:

Taulukko III

aminohappojen identtisyys-%

		elk-L	B61	A2	C6
aminohappojen	elk-L	...	33	28	32
samanlaisuus-%	B61	51	...	40	37
	A2	48	63	...	38
	C6	50	55	57	...

DNA-sekvenssien identtisyys-% on esitetty taulukossa IV:

Taulukko IV

DNA:n identtisyys-%

	elk-L	B61	A2	C6
elk-L		44,0	40,7	43,7
B61			48,9	51,5
A2				47,3
C6				

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: BECKMANN, M. P.
CERRETTI, DOUGLAS P.

(ii) TITLE OF INVENTION: CYTOKINE THAT BINDS THE CELL SURFACE RECEPTOR HEK

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 4

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: IMMUNEX CORPORATION
(B) STREET: 51 UNIVERSITY STREET
(C) CITY: SEATTLE
(D) STATE: WASHINGTON
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 98101

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: Apple Macintosh
(C) OPERATING SYSTEM: Apple System 7.1
(D) SOFTWARE: Microsoft Word for Apple, Version 5.1a

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE: 17-AUG-94
(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 08/240,124
(B) FILING DATE: 09-MAY-1994

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 08/161,132
(B) FILING DATE: 03-DEC-1993

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 08/114,426
(B) FILING DATE: 30-AUG-1993

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 08/109,745
(B) FILING DATE: 20-AUG-1993

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: SEESE, KATHRYN A.
(B) REGISTRATION NUMBER: 32,172
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 2814-WO

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (206) 587-0430
(B) TELEFAX: (206) 233-0644
(C) TELEX: 756822

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1037 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: hek-L A2

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 83..799

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 83..139

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 140..796

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

```
GGATCTTGGA ACGAGACGAC CTGCTGGAGA AGCCGGGAGC GCGGGGCTCA GTCGGGGGGC      60

GGCGGCGGCG GCGGCTCCGG GG ATG GCG GCG GCT CCG CTG CTG CTG CTG CTG      112
                         Met Ala Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu
                         -19             -15                 -10

CTG CTC GTG CCC GTG CCG CTG CTG CCG CTG CTG GCC CAA GGG CCC GGA      160
Leu Leu Val Pro Val Pro Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gln Gly Pro Gly
                -5                  1               5

GGG GCG CTG GGA AAC CGG CAT GCG GTG TAC TGG AAC AGC TCC AAC CAG      208
Gly Ala Leu Gly Asn Arg His Ala Val Tyr Trp Asn Ser Ser Asn Gln
        10                  15                  20

CAC CTG CGG CGA GAG GGC TAC ACC GTG CAG GTG AAC GTG AAC GAC TAT      256
His Leu Arg Arg Glu Gly Tyr Thr Val Gln Val Asn Val Asn Asp Tyr
    25                  30                  35

CTG GAT ATT TAC TGC CCG CAC TAC AAC AGC TCG GGG GTG GGC CCC GGG      304
Leu Asp Ile Tyr Cys Pro His Tyr Asn Ser Ser Gly Val Gly Pro Gly
40                  45                  50                  55

GCG GGA CCG GGG CCC GGA GGC GGG GCA GAG CAG TAC GTG CTG TAC ATG      352
Ala Gly Pro Gly Pro Gly Gly Gly Ala Glu Gln Tyr Val Leu Tyr Met
                60                  65                  70
```

```
GTG AGC CGC AAC GGC TAC CGC ACC TGC AAC GCC AGC CAG GGC TTC AAG        400
Val Ser Arg Asn Gly Tyr Arg Thr Cys Asn Ala Ser Gln Gly Phe Lys
                75                  80                  85

CGC TGG GAG TGC AAC CGG CCG CAC GCC CCG CAC AGC CCC ATC AAG TTC        448
Arg Trp Glu Cys Asn Arg Pro His Ala Pro His Ser Pro Ile Lys Phe
         90                  95                 100

TCG GAG AAG TTC CAG CGC TAC AGC GCC TTC TCT CTG GGC TAC GAG TTC        496
Ser Glu Lys Phe Gln Arg Tyr Ser Ala Phe Ser Leu Gly Tyr Glu Phe
    105                 110                 115

CAC GCC GGC CAC GAG TAC TAC TAC ATC TCC ACG CCC ACT CAC AAC CTG        544
His Ala Gly His Glu Tyr Tyr Tyr Ile Ser Thr Pro Thr His Asn Leu
120                 125                 130                 135

CAC TGG AAG TGT CTG AGG ATG AAG GTG TTC GTC TGC TGC GCC TCC ACA        592
His Trp Lys Cys Leu Arg Met Lys Val Phe Val Cys Cys Ala Ser Thr
                140                 145                 150

TCG CAC TCC GGG GAG AAG CCG GTC CCC ACT CTC CCC CAG TTC ACC ATG        640
Ser His Ser Gly Glu Lys Pro Val Pro Thr Leu Pro Gln Phe Thr Met
            155                 160                 165

GGC CCC AAT GTG AAG ATC AAC GTG CTG GAA GAC TTT GAG GGA GAG AAC        688
Gly Pro Asn Val Lys Ile Asn Val Leu Glu Asp Phe Glu Gly Glu Asn
        170                 175                 180

CCT CAG GTG CCC AAG CTT GAG AAG AGC ATC AGC GGG ACC AGC CCC AAA        736
Pro Gln Val Pro Lys Leu Glu Lys Ser Ile Ser Gly Thr Ser Pro Lys
    185                 190                 195

CGG GAA CAC CTG CCC CTG GCC GTG GGC ATC GCC TTC TTC CTC ATG ACG        784
Arg Glu His Leu Pro Leu Ala Val Gly Ile Ala Phe Phe Leu Met Thr
200                 205                 210                 215

TTC TTG GCC TCC TAGCTCTGCC CCCTCCCCTG GGGGGGGAGA GATGGGGCGG            836
Phe Leu Ala Ser
                220

GGCTTGGAAG GAGCAGGGAG CCTTTGGCCT CTCCAAGGGA AGCCTAGTGG GCCTAGACCC      896

CTCCTCCCAT GGCTAGAAGT GGGGCCTGCA CCATACATCT GTGTCCGCCC CCTCTACCCC      956

TTCCCCCCAC GTAGGGCACT GTAGTGGACC AAGCACGGGG ACAGCCATGG GTCCCGAGCA     1016

GGTCGTCTCG TTCCAAGATC C                                               1037
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 238 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

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

```
Met Ala Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Pro
-19              -15                 -10                  -5

Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gln Gly Pro Gly Gly Ala Leu Gly Asn Arg
               1               5                  10

His Ala Val Tyr Trp Asn Ser Ser Asn Gln His Leu Arg Arg Glu Gly
     15                  20                  25

Tyr Thr Val Gln Val Asn Val Asn Asp Tyr Leu Asp Ile Tyr Cys Pro
 30                  35                  40                  45

His Tyr Asn Ser Ser Gly Val Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Pro Gly
                 50                  55                  60

Gly Gly Ala Glu Gln Tyr Val Leu Tyr Met Val Ser Arg Asn Gly Tyr
             65                  70                  75

Arg Thr Cys Asn Ala Ser Gln Gly Phe Lys Arg Trp Glu Cys Asn Arg
          80                  85                  90

Pro His Ala Pro His Ser Pro Ile Lys Phe Ser Glu Lys Phe Gln Arg
     95                  100                 105

Tyr Ser Ala Phe Ser Leu Gly Tyr Glu Phe His Ala Gly His Glu Tyr
110                 115                 120                 125

Tyr Tyr Ile Ser Thr Pro Thr His Asn Leu His Trp Lys Cys Leu Arg
                130                 135                 140

Met Lys Val Phe Val Cys Cys Ala Ser Thr Ser His Ser Gly Glu Lys
            145                 150                 155

Pro Val Pro Thr Leu Pro Gln Phe Thr Met Gly Pro Asn Val Lys Ile
        160                 165                 170

Asn Val Leu Glu Asp Phe Glu Gly Glu Asn Pro Gln Val Pro Lys Leu
    175                 180                 185

Glu Lys Ser Ile Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Glu His Leu Pro Leu
190                 195                 200                 205

Ala Val Gly Ile Ala Phe Phe Leu Met Thr Phe Leu Ala Ser
                210                 215
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 636 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: hek-L C6

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: mat_peptide
(B) LOCATION: 94..630

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 28..633

(ix) FEATURE:
(A) NAME/KEY: sig_peptide
(B) LOCATION: 28..93

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

```
GCCAGACCAA ACCGGACCTC GGGGGCG ATG CGG CTG CTG CCC CTG CTG CGG          51
                              Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Arg
                              -22     -20                 -15

ACT GTC CTC TGG GCC GCG TTC CTC GGC TCC CCT CTG CGC GGG GGC TCC        99
Thr Val Leu Trp Ala Ala Phe Leu Gly Ser Pro Leu Arg Gly Gly Ser
                -10                 -5                  1

AGC CTC CGC CAC GTA GTC TAC TGG AAC TCC AGT AAC CCC AGG TTG CTT       147
Ser Leu Arg His Val Val Tyr Trp Asn Ser Ser Asn Pro Arg Leu Leu
          5                  10                  15

CGA GGA GAC GCC GTG GTG GAG CTG GGC CTC AAC GAT TAC CTA GAC ATT       195
Arg Gly Asp Ala Val Val Glu Leu Gly Leu Asn Asp Tyr Leu Asp Ile
     20                  25                  30

GTC TGC CCC CAC TAC GAA GGC CCA GGG CCC CCT GAG GGC CCC GAG ACG       243
Val Cys Pro His Tyr Glu Gly Pro Gly Pro Pro Glu Gly Pro Glu Thr
 35                  40                  45                  50

TTT GCT TTG TAC ATG GTG GAC TGG CCA GGC TAT GAG TCC TGC CAG GCA       291
Phe Ala Leu Tyr Met Val Asp Trp Pro Gly Tyr Glu Ser Cys Gln Ala
                55                  60                  65

GAG GGC CCC CGG GCC TAC AAG CGC TGG GTG TGC TCC CTG CCC TTT GGC       339
Glu Gly Pro Arg Ala Tyr Lys Arg Trp Val Cys Ser Leu Pro Phe Gly
            70                  75                  80

CAT GTT CAA TTC TCA GAG AAG ATT CAG CGC TTC ACA CCT TTC TCC CTC       387
His Val Gln Phe Ser Glu Lys Ile Gln Arg Phe Thr Pro Phe Ser Leu
         85                  90                  95

GGC TTT GAG TTC TTA CCT GGA GAG ACT TAC TAC TAC ATC TCG GTG CCC       435
Gly Phe Glu Phe Leu Pro Gly Glu Thr Tyr Tyr Tyr Ile Ser Val Pro
    100                 105                 110

ACT CCA GAG AGT TCT GGC CAG TGC TTG AGG CTC CAG GTG TCT GTC TGC       483
Thr Pro Glu Ser Ser Gly Gln Cys Leu Arg Leu Gln Val Ser Val Cys
115                 120                 125                 130
```

```
TGC AAG GAG AGG AAG TCT GAG TCA GCC CAT CCT GTT GGG AGC CCT GGA      531
Cys Lys Glu Arg Lys Ser Glu Ser Ala His Pro Val Gly Ser Pro Gly
                135                 140                 145

GAG AGT GGC ACA TCA GGG TGG CGA GGG GGG GAC ACT CCC AGC CCC CTC      579
Glu Ser Gly Thr Ser Gly Trp Arg Gly Gly Asp Thr Pro Ser Pro Leu
            150                 155                 160

TGT CTC TTG CTA TTA CTG CTG CTT CTG ATT CTT CGT CTT CTG CGA ATT      627
Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Arg Leu Leu Arg Ile
        165                 170                 175

CTG TGAGCC                                                          636
Leu
    180
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 201 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

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

```
Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Arg Thr Val Leu Trp Ala Ala Phe Leu
-22      -20                 -15                 -10

Gly Ser Pro Leu Arg Gly Gly Ser Ser Leu Arg His Val Val Tyr Trp
     -5                  1                   5                  10

Asn Ser Ser Asn Pro Arg Leu Leu Arg Gly Asp Ala Val Val Glu Leu
                15                  20                  25

Gly Leu Asn Asp Tyr Leu Asp Ile Val Cys Pro His Tyr Glu Gly Pro
            30                  35                  40

Gly Pro Pro Glu Gly Pro Glu Thr Phe Ala Leu Tyr Met Val Asp Trp
        45                  50                  55

Pro Gly Tyr Glu Ser Cys Gln Ala Glu Gly Pro Arg Ala Tyr Lys Arg
    60                  65                  70

Trp Val Cys Ser Leu Pro Phe Gly His Val Gln Phe Ser Glu Lys Ile
75                  80                  85                  90

Gln Arg Phe Thr Pro Phe Ser Leu Gly Phe Glu Phe Leu Pro Gly Glu
                95                  100                 105

Thr Tyr Tyr Tyr Ile Ser Val Pro Thr Pro Glu Ser Ser Gly Gln Cys
            110                 115                 120

Leu Arg Leu Gln Val Ser Val Cys Cys Lys Glu Arg Lys Ser Glu Ser
        125                 130                 135
```

```
Ala His Pro Val Gly Ser Pro Gly Glu Ser Gly Thr Ser Gly Trp Arg
    140                 145                 150

Gly Gly Asp Thr Pro Ser Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
155                 160                 165                 170

Leu Ile Leu Arg Leu Leu Arg Ile Leu
                175
```

Patenttivaatimukset

1. Puhdistettu hek-ligandi (hek-L) -polypeptidi, joka kykenee sitomaan hek:ia, t u n n e t t u siitä, että mainittu hek-L sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen SEKVENSSI ID NO:2:n aminohappotähteiden 1 - 219 muodostaman sekvenssin kanssa.

2. Puhdistettu hek-L-polypeptidi, joka kykenee sitomaan hek:ia, t u n n e t t u siitä, että mainittu hek-L sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen SEKVENSSI ID NO:4:n aminohappotähteiden 1 - 179 muodostaman sekvenssin kanssa.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen hek-L-polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu hek-L sisältää aminohapposekvenssin, joka on SEKVENSSI ID NO:2:n aminohappotähteiden 1 - 219 muodostama sekvenssi, SEKVENSSI ID NO:2:n aminohappotähteiden 1 - 202 muodostama sekvenssi, SEKVENSSI ID NO:4:n aminohappotähteiden 1 - 179 muodostama sekvenssi tai SEKVENSSI ID NO:4:n aminohappotähteiden 1 - 160 muodostama sekvenssi.

4. Puhdistettu hek-L-polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu hek-L-polypeptidi sisältää aminohapposekvenssin, joka on

a) SEKVENSSI ID NO:2:n aminohapot z - x, jolloin z on SEKVENSSI ID NO:2:n asemissa 1 - 12 oleva aminohappo ja x on SEKVENSSI ID NO:2:n asemissa 193 - 219 oleva aminohappo, tai

b) SEKVENSSI ID NO:4:n aminohapot z' - y, jolloin z' on SEKVENSSI ID NO:4:n asemissa 1 - 4 oleva aminohappo ja y on SEKVENSSI ID NO:4:n asemissa 147 - 179 oleva aminohappo.

5. Puhdistettu hek-L-polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se on

a) hek-L-polypeptidi, joka sisältää SEKVENSSI ID NO:2:n aminohapot 1 - 219,

b) hek-L-polypeptidi, joka sisältää SEKVENSSI ID NO:4:n aminohapot 1 - 179, tai

c) kohdan a) tai b) hek-L-polypeptidin fragmentti, jolloin mainittu fragmentti kykenee sitomaan hek:ia.

6. Fuusioproteiini, t u n n e t t u siitä, että se sisältää liukoisen hek-L-polypeptidin, joka kykenee sitomaan hek:ia, ja Fc-polypeptidin, jolloin mainittu hek-L sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-prosenttisesti identtinen SEKVENSSI ID NO:2:n aminohappotähteiden 1 - 202 tai SEKVENSSI ID NO:4:n aminohappotähteiden 1 - 160 muodostaman sekvenssin kanssa.

7. Eristetty DNA, joka koodaa jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukaista hek-L-polypeptidiä tai hek-L/Fc-fuusioproteiinia.

8. Ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 7 mukaista DNA:ta.

9. Menetelmä hek-L-polypeptidin tai hek-L/Fc-fuusioproteiinin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään patenttivaatimuksen 8 mukaisella vektorilla transformoitua isäntäsolua hek-L-polypeptidin tai hek-L/Fc-fuusioproteiinin ilmentymistä edistävissä olosuhteissa ja otetaan hek-L-polypeptidi tai hek-L/Fc-fuusioproteiini talteen viljelmästä.

10. Puhdistettu oligomeeri, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 2 - 4 liukoista hek-L-polypeptidiä, jotka kykenevät sitomaan hek:ä, jolloin mainitut liukoiset hek-L-polypeptidit sisältävät kukin aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen SEKVENSSI ID NO:2:n aminohappotähteiden 1 - 202 tai SEKVENSSI ID NO:4:n aminohappotähteiden 1 - 160 muodostaman sekvenssin kanssa.

11. Vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että se reagoi immunologisesti patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen hek-L-polypeptidin kanssa.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että mainittu vasta-aine on monoklonaalinen vasta-aine.