



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **332513**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040249	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.07.19 PCT/IB2002/03379
(22)	Inng.dag	2004.01.19	(85)	Videreføringsdag	2004.01.19
(24)	Løpedag	2002.07.19	(30)	Prioritet	2001.07.20, US, 306984
(41)	Alm.tilgj	2004.03.18			
(45)	Meddelt	2012.10.08			

(73)	Innehaver	Absorber AB, Box 7710, Drottninggatan 33, SE-10395 STOCKHOLM, Sverige
(72)	Oppfinner	Jonas Lofling, Vibyhdmsveien 9, 2 tr, S-125 42 Alvsjö, SE-, Sverige Jan Holgersson, Växusvägen 6 A, S-141 33 Huddinge, SE-, Sverige
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vik, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Blodgruppeantigenfusjonspolypeptider, absorber, fremgangsmåte for å fjerne et antistoff fra en biologisk prøve, vertscelle og celle
(56)	Anførte publikasjoner	WO 98/42750 A1 PRIETO P. A. et al., "Expression of Human H-type alfa1,2-Fucosyltransferase Encoding for Blood Group H(O) Antigen in Chinese Hamster Ovary Cells", J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, s.2089-2097, ISSN 0021-9258 YE Y. et al., "Cardiac Allotransplantation across the ABO-Blood Group Barrier by the Neutralization of Preformed Antibodies: The Baboon as a Model for the Human", Laboratory Animal Science, 1994, vol. 44, s.121-124
(57)	Sammendrag	

Det beskrives preparater og metoder for terapi eller prevensjon av antistoffmediert graft-reaksjon.

OPPFINNELSENS OMRÅDE

Foreliggende oppfinnelse angår generelt preparater som omfatter fusjonspolypeptider omfattende blodgruppedeterminanter. Videre omfatter foreliggende oppfinnelse
5 absorber, fremgangsmåte for å fjerne et antistoff fra en biologisk prøve, vertscelle og celle.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

Det hovedsakelig humane blodgruppesystem, histoblodgruppe ABO-systemet, er defi-
10 nert ved tre karbohydratdeterminanter, blodgruppe A-, B- og H-epitopene. Glykanene som bærer ABH-determinantene finnes på glykoproteiner, på glykolipider eller som frie oligosakkarider. ABH-antigener kan finnes på N- eller O-bundne glykaner. De vanligste strukturer som er beskrevet så langt på O-forbundne glykaner er kjerne 1 (Gal β 3GalNAc), kjerne 2 (Gal β 3(GlcNAc β 6)GalNAc), kjerne 3 (GlcNAc β 3GalNAc),
15 og kjerne 4 (GlcNAc β 3(GlcNAc β 6)GalNAc). Disse er påvist å bære type 1- (Gal β 3GlcNAc), type 2- (Gal β 4GlcNAc), og type 3- (Gal β 3GalNAc α) strukturer. Type 1-strukturer finnes hovedsakelig som forlengelser av kjerne 3- og 4-strukturene, mens type 2-kjeder (polylaktosamin) ses som forlengelse på GlcNAc β 1,6-grenen av kjerne 2-struktur.

20 Transplantasjon (Tx) på tvers av ABO-barrieren unngås vanligvis i organ Tx på grunn av risikoen for antistoffmediert reaksjon (AMR) på grunn av at fortildannede antistoffer ofte er høy. Dette kan også være tilfellet når det gjelder benmargtransplan-
tasjon, selv om det lenge har vært antatt at blodgruppe ABH-inkompatibilitet ikke påvir-
25 ker resultatet. I enkelte tilfeller vil det imidlertid fremdeles være ønskelig å transplan-
tere på tvers av ABO-barrieren, én av grunnene er at det utvider massen av tilgjengelige donorer for en spesiell reseptor, selv om det ikke øker det totale antall donorer.

Fjerning av anti-A- og anti-B-antistoffer ved ekstrakorporal immunabsorpsjon (EIA)
30 eller plasmaferese (PP) har vist seg å forbedre podningsoverlevelsen etter ABO-inkompatibelt organ Tx. En annen metode som benyttes for å forhindre AMR i både ABO-inkompatibelt Tx og xeno-Tx er infusjon av frie oligosakkarider, men lav affinitet av antistoffer for frie sakkarider og den korte halveringstiden for lavmolekylvekts oligosakkarider i sirkulasjonen (Ye et al., 1994; Simon et al., 1998) forhindrer en mer utstrakt
35 bruk.

WO 98/42750 angår et antigenisk fusjonsprotein som bærer multiple Gal α 1, 3 Gal-epitoper og anvendelsen av slike fusjonsproteiner ved xenotransplantasjon.

Prieto et al (The Journal of Biological Chemistry, 1997, bind 272, nr. 4, sidene 2089 –
 5 2097) beskriver ekspresjon av human H-type α 1,2-fukosyltransferase som koder for blodgruppe H(O)-antigen i kinesisk hamster ovarie- (CHO) celler, og den preferensielle fukosylering og trunkering av polylaktosaminsekvenser på grunn av dette enzym.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

10

Foreliggende oppfinnelse er basert delvis på den oppdagelse at blodgruppeepitoper spesifikt kan uttrykkes i høy densitet og ved forskjellige kjernesakkaridkjeder på mucin-type proteinryggrader. Polypeptidene kalles her ABO-fusjonspolypeptider.

15 I ett aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et fusjonspolypeptid, som omfatter et første polypeptid operativt forbundet til et andre polypeptid, der det første polypeptid:

- (a) er et mucinpolypeptid; og
 - (b) hvori mucinpolypeptidet er glykosylert med en blodgruppe H- eller sekretor α 1,2 fukosyltransferase og en α 1,3 N-acetylgalaktosaminyltransferase; og
- 20 det andre polypeptidet omfatter minst ett Fc område av et immunoglobulinpolypeptid.

25

I en utførelsesform omfatter det første polypeptid minst et område av en P-selektiv glykoproteinligand-1.

I en videre utførelsesform inkluderer det første polypeptid en ekstracellulær del av en P-selektiv glykoprotein ligand 1.

30

Fusjonspolypeptidet er fortrinnsvis en dimer.

I et andre aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en absorber, som omfatter fusjonspolypeptidet ifølge oppfinnelsen.

35

I et ytterligere aspekt vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fjerne et antistoff fra en biologisk prøve, som omfatter

- (a) å bringe en biologisk prøve i kontakt med fusjonspolypeptidet ifølge krav 1

for å danne et fusjonspolypeptid-antistoff kompleks; og
 (b) å fjerne komplekset fra den biologiske prøve for derved å fjerne antistoffet
 fra den biologiske prøven.

- 5 Videre tilveiebringer oppfinnelsen en vertscelle, som er konstruert genetisk for å
 uttrykke fusjonspolypeptidet ifølge oppfinnelsen.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelsen en celle, som omfatter:

- (a) en nukleinsyre som koder et mucinpolypeptid operativt forbundet til en
 10 nukleinsyre som koder minst et område av et immunoglobulinpolypeptid,
 (b) en nukleinsyre som koder et blodgruppe H- eller sekretor α 1,2
 fukosyltransferase polypeptid; og
 (c) en nukleinsyre som koder et α 1,3 N-acetylgalaktosaminyltransferase
 polypeptid.

15

I en utførelsesform er cellen ifølge oppfinnelsen en COS-celle, en CHO-celle eller en
 293T-celle.

- Et mulig fusjonspolypeptid inkluderer et første polypeptid omfattende minst ett område
 20 av et mucinpolypeptid, glykosylert med en α 1,2-fukosyltransferase, operativt forbundet
 til et andre polypeptid. Det første polypeptid kan være sekvensielt glykosylert av en
 α 1,3-N-acetylgalaktosaminyltransferase og/eller en α 1,3-galaktosyltransferase.
 Mucinpolypeptidet kan for eksempel være en PSGL-1. Fortrinnsvis kan
 mucinpolypeptidet være det ekstracellulære proteinet av PSGL-1. α 1,2-fukosyltrans-
 25 ferasen er for eksempel en blodgruppe H- eller sekretor- α 1,2-fukosyltransferase som
 FUT1 eller FUT2.

- Det andre polypeptidet kan omfatte minst et område av et immunoglobulinpolypeptid.
 For eksempel kan det andre polypeptidet omfatte et område av et tungkjede
 30 immunoglobulinpolypeptid. Alternativt kan det andre polypeptidet omfatte FC-området
 av en immunoglobulin tungkjede.

ABO-fusjonspolypeptidet kan være en multimer. Fortrinnsvis er ABO-
 fusjonspolypeptidet en dimer.

35

en nukleinsyre som koder et ABO-fusjonspolypeptid, så vel som en vektor inneholdende ABO-fusjonspolypeptidkodende nukleinsyrer, og en celle som inneholder vektorene eller nukleinsyrene som her beskrevet. Alternativt kan vektoren videre omfatte en nukleinsyre som koder en α 1,2-fukosyltransferase og/eller en α 1,3-N-acetylgalaktosaminyltransferase eller en α 1,3-galaktosyltransferase.

Det kan være mulig å behandle antistoffmediert reaksjon hos et individ. Dette kan omfatte å bringe en biologisk prøve, for eksempel fullblod eller plasma fra et individ, i kontakt med et ABO-fusjonspolypeptid for å danne et fusjonspolypeptid-antistoffkompleks. Kompleks kan fjernes fra den biologiske prøve og den biologiske prøve kan refuseres inn i individet.

Det kan tilveiebringes en fremgangsmåte for å fjerne et antistoff fra en prøve ved å bringe prøven i kontakt med ABO-fusjonspeptidet, for å danne et antistoff-fusjonspeptidkompleks og å fjerne komplekset fra den biologiske prøven.

Et farmasøytisk preparat kan omfatte ABO-fusjonspolypeptidene.

Hvis ikke annet er sagt, skal alle tekniske og vitenskapelige uttrykk som her benyttes ha samme betydning som vanlig forstått av fagmannen på det området hvortil oppfinnelsen hører. Selv om metoder og materiell som er tilsvarende ekvivalent det som er beskrevet her kan benyttes ved gjennomføring eller testing av oppfinnelsen, er egnede og hensiktsmessige metoder og materiell beskrevet nedenfor. Hvis konflikt vil foreliggende beskrivelse inkludert definisjonene, være kontrollen. I tillegg er materiell, metoder og eksempler kun illustrerende og ikke i seg selv ment å være begrensende.

Andre trekk og fordeler ved oppfinnelsen vil fremgå av den følgende detaljerte beskrivelse og fra kravene.

30 KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1A – D er fotografier av SDS-PAGE- og Westernblotanalyse av immunorensset PSGL-1/mIgG_{2b}, kimerer fremstilt i 293T-celler transfektert med *H*- eller *Se*-genet alene eller i kombinasjon med det A-genkodende α 1,3GalNAcT. Etter separering på en 8% SDS-PAGE og blotting på nitricellulosemembraner ble PSGL-1/mIgG_{2b}-kimerer probet med et antimuse-IgG-antistoff (A), et antiblodgruppe A-antistoff fulgt av et

geite-antimuse-IgM-antistoff (B), et anti-H-type 1 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgG₃-antistoff (C), et anti-H-type 2 kjedespesifikt antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-HRP-antistoff (D) og et anti-H-type 3 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgM-antistoff (E). I platene A – D var de analyserte prøver fra celler transfektert med plasmid som koder CDM8 (sporene 1 og 5), PSGL-1 l/mIgG_{2b}, (sporene 2 og 6), PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*-genet (spor 3), PSGL-1/mIgG_{2b}, *H*- og *A*-genet (spor 4), PSGL-1/mIgG_{2b}, og *Se*-genet (spor 7), eller PSGL-1/mIgG_{2b}, og *Se*- og *A*-genet (spor 8). I E ble duplikatprøvene fra CDM8- og PSGL-1/mIgG_{2b}-transfekterte celler utelatt. I C ble 250 ng H-type-1 kjede-BSA benyttet som positiv kontroll.

Figur 2 A – D er fotografier av SDS-PAGE- og Westernblotanalyse av PNGaseF-behandlede immunrensede PSGL-1/mIgG_{2b}, produsert i 293T-celler transfektert med *H*- eller *Se*-genet alene eller i kombinasjon med det *A*-genkodede α 1,3 GalNAcT. Etter PNGaseF-behandling (+) eller ikke (-), immunrenset PSGL-1/mIgG_{2b}, ble PSGL-1/mIgG_{2b} separert på en 8% SDS-PAGE og blottet på nitrocellulosemembraner. PSGL-1/mIgG_{2b}-kimerer ble probet med et antimuse-IgG-antistoff (A), et antiblodgruppe A-antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-antistoff (B), et anti-H-type 2 kjedespesifikt antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-HRP-antistoff (C) og et anti-H-type 3 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgM-antistoff (D). I platene A - D var de analyserte prøver fra celler transfektert med plasmider som koder PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*-genet (sporene 1 og 2), PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*- og *A*-genet (sporene 3 og 4), PSGL-1/mIgG_{2b} og *Se*-genet (sporene 5 og 6), eller PSGL-1/mIgG_{2b} og *Se*- og *A*-genet (sporene 7 og 8).

25

Figur 3 A – E er fotografier av SDS-PAGE- og Westernblotanalyse av immunrenset PSGL-1/mIgG_{2b}-kimerer fremstilt i COS-7m6-celler transfektert med *H*- eller *Se*-genet alene eller i kombinasjon med det *A*-genkodede α 1,3 GalNAcT. Etter separering på en 8% SDS-PAGE og blotting på nitrocellulosemembraner ble PSGL-1/mIgG_{2b}-kimerer probet med et antimuse-IgG-antistoff (A), et antiblodgruppe A-antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-antistoff (B), et anti-H-type 1 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgG₃-antistoff (C), et anti-H-type 2 kjedespesifikt antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-HRP-antistoff (D) og et anti-H-type 3 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgM-antistoff (E). I platene A – D var

30

de analyserte prøver fra celler som var transfektert med plasmider kodende CDM8 (sporene 1 og 5), PSGL-1/mIgG_{2b} (sporene 2 og 6), PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*-genet (spor 3), PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*- og *A*-genet (spor 4), PSGL-1/mIgG_{2b} og *Se*-genet (spor 7) eller PSGL-1/mIgG_{2b} og *Se*- og *A*-genet (spor 8). I E var duplikatprøvene fra CDM8- og PSGL1/mIgG_{2b} transfekterte celler utelatt. I C ble 250 ng H-type-1 kjede-BSA benyttet som positiv kontroll.

Figurene 4 A – E er fotografier av SDS-PAGE- og Westernblotanalyser av immunrenset PSGL-1/mIgG_{2b}-kimerer produsert i CHO-K1-celler transfektert med *H*- eller *Se*-genet alene eller i kombinasjon med det A-genkodende $\forall$ 1,3 GalNAcT. Etter separering på en 8% SDS-PAGE og blotting på nitrocellulosemembraner ble PSGL1/mIgG_{2b}-kimerer probet med et antimuse-IgG-antistoff (A), et antiblodgruppe A-antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-antistoff (B), et anti-H-type 1 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgG₃-antistoff (C), et anti-H-type 2 kjedespesifikt antistoff fulgt av et geite-antimuse-IgM-HRP-antistoff (D) og et anti-H-type 3 kjedespesifikt antistoff fulgt av et HRP-merket geite-antimuse-IgM-antistoff (E). De analyserte prøver var fra celler transfektert med plasmider kodende CDM8 (spor 1), PSGL-1/mIgG_{2b} (spor 2), PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*-genet (spor 3), PSGL-1/mIgG_{2b} og *H*- og *A*-genet (spor 4), PSGL-1/mIgG_{2b} og *Se*-genet (spor 5) eller PSGL-1/mIgG_{2b} og *Se*- og *A*-genet (spor 6). I C ble 250 ng H-type-1 kjede-BSA benyttet som positiv kontroll.

Figur 5 er et stolpediagram som viser den relative blodgruppe A-densitet på rekombinant PSGL-1/mIgG_{2b}, produsert i COS-, CHO- og 2931-celler som kouttrykekr FUT1 eller FUT2 med α 1,3 GalNAcT. Densiteten ble beregnet som forholdet mellom volumene for blodgruppe A og mIgG-reaktiviteten og verdiene var normalisert til de som var oppnådd for det A-substituerte PSGL-1/mIgG_{2b} produsert i COS-celler som kouttrykte FUT1 og α 1,3 GalNAcT.

Figur 6 er et linjediagram som viser antiblodgruppe A-reaktivitet som er tilbake i serum etter absorpsjon på forskjellige blodgruppe A-substituerte absorbenter. Den gjenværende reaktivitet i prosent av ikke-absorbert blodgruppe O-serum, målt ved hjelp av en ELISA belagt med APAA-biotin, ble plottet mot mengden benyttet absorber. En trendlinje ble beregnet ved bruk av logaritmisk regresjon. Sirklene representerer PSGL-1/mIgG_{2b} produsert i CHO-celler med FUT2 og α 1,3 GalNAcT, og kvadratene representerer A-trisakkarider bundet via A-PAA-MPG. B-trisakkarider koblet via B-PAA-MPG ble benyttet for å oppnå den samme mengde PAA-MPG i alle absorpsjoner.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Blodgruppeepitoper kan spesifikt uttrykkes i høy densitet og ha forskjellige kjernesakkaridkjerner på mucintype proteinryggrader. Disse høyere densiteter av blodgruppeepitoper resulterer i en øket binding eller fjerning (dvs. absorpsjon) av ant blodgruppeantistoffer sammenlignet med de frie sakkarider, eller AB-determinanter bundet til fast fase.

Det tilveiebringes mucin-immunoglobulinfusjonsproteiner (her kalt "ABO-fusjonsproteiner") inneholdende multiple blodgruppeepitoper som er brukbare som en absorber for ant blodgruppeantistoffer. ABO-fusjonspeptidene er også brukbare som et modellprotein for studier av glykosylering. For eksempel er ABO-fusjonsproteinet brukbart ved eliminering av resipient-ant blodgruppe-ABO-antistoffer fra blod eller plasma før en ABO-inkompatibel organ- eller benmargtransplantasjon. ABO-fusjonsproteinet absorberer 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% eller 100% av ant blodgruppe-ABO-antistoffer fra resipientblod eller -plasma.

ABO-fusjonspeptidet er mer effektivt på en karbohydratmolar basis ved fjerning eller binding av ant blodgruppeantistoffer sammenlignet med frie sakkarider av villtype AB-determinanter. ABO-fusjonspeptider binder 2, 4, 10, 20, 50, 80, 100 eller flere ganger større antall av ant blodgruppeantistoff sammenlignet med en ekvivalent mengde av frie sakkarider av villtype AB-determinanter.

ABO-fusjonsproteinene bærer en epitop som er spesifikk for en blodgruppedeterminant. For eksempel bærer ABO-fusjonsproteinet enten A-epitopen, B-epitopen eller H-epitopen. Alternativt bærer ABO-fusjonsproteinet to epitoper for blodgruppeantigener. For eksempel bærer ABO-fusjonsproteinet både A- og B-epitopen. I noen aspekter bærer ABO-fusjonsproteinet alle tre epitoper (dvs. A, B og H).

30

Fusjonspolypeptider

I forskjellige aspekter tilveiebringes fusjonsproteiner som inkluderer et første polypeptid inneholdende minst en del av et glykoprotein, for eksempel et mucinpolypeptid, operativt bundet til et andre polypeptid. Som benyttet her inkluderer et "fusjonsprotein" eller "kimerisk protein" minst en del av et mucinpolypeptid operativt for-

35

bundet til et ikke-mucinpolypeptid. Et "mucinpolypeptid" henviser til et polypeptid med et mucindomene. Mucinpolypeptidet har 1, 2, 3, 5, 10, 20 eller flere mucindomener. Mucinpolypeptidet er et hvilket som helst glykoprotein som karakteriseres ved en aminosyresekvens substituert med O-glykaner. For eksempel har et mucinpolypeptid hver andre eller tredje aminosyre i form av et serin eller treonin. Mucinpolypeptidet er et utskilt protein. Alternativt er mucinpolypeptidet et celleoverflateprotein.

Mucindomener er rike på aminosyrene treonin, serin og prolin, der oligosakkaridene er bundet via N-acetylgalaktosamin til hydroksyaminosyrene (O-glykaner). Et mucindomene omfatter eller alternativt består av et O-forbundet glykosyleringssete. Et mucindomene har 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 eller flere O-forbundne glykosyleringsseter. Alternativt omfatter mucindomenet eller alternativt består dette av et N-forbundet glykosyleringssete. Et mucinpolypeptid har 50%, 60%, 80%, 90%, 95% eller 100% av sin masse å tilskrive glykan. Et mucinpolypeptid er et hvilket som helst polypeptid det kodes for av MUC-gener (dvs. MUC1, MUC2, MUC3, osv.). Alternativt er et mucinpolypeptid P-selektinglykoproteinligand 1 (PSGL-1), CD34, CD43, CD45, CD96, GlyCAM-1, MAdCAM eller røde blodcelleglykoforiner. Fortrinnsvis er mucinet PSGL-1. Et "ikke-mucinpolypeptid" henviser til et polypeptid der i det minste mindre enn 40% av massen er å tilskrive glykaner.

I et ABO-fusjonsprotein kan mucinpolypeptidet tilsvare hele eller en del av et mucinprotein. Et ABO-fusjonsprotein kan omfatte minst en del av et mucinprotein. "Minst en del" betyr at mucinpolypeptidet inneholder minst ett mucindomene (for eksempel et O-forbundet glykosyleringssete). Mucinprotein kan omfatte den ekstracellulære delen av polypeptidet. For eksempel omfatter mucinpolypeptidet den ekstracellulære del av PSGL-1.

Det første polypeptidet glykosyleres med én eller flere blodgruppetransferaser. Det første polypeptid glykosylerer med 2, 3, 5 eller flere blodgruppetransferaser. Glykosyleringen er sekvensiell eller konsekutiv. Alternativ glykosylering er samtidig eller vilkårlig, dvs. ikke i noen spesiell rekkefølge. For eksempel glykosyleres det første polypeptid av en α 1,2-fukosyltransferase som H- eller Se-genkodet α 1,2-fukosyltransferaser. Eksempler på α 1,2-fukosyltransferase er FUT1 (GenBank Acc. Nr: Q10984; O10983, O10981; AT455028 og NM00148) og FUT2 (GenBank Acc. Nr. P19526; BAA11638; D82933 og A56098). Alternativt glykosyleres det første polypeptid av 1,3-N-acetylgalaktosaminylnyltransferase eller α 1,3-galaktosaminylnyltransferase. Det første polypeptid kan

bli glykosylert med både et α 1,2-fukosyltransferase og et 1,3-N-acetylga-laktosaminyltransferase eller et α 1,3-galaktosaminyltransferase.

I fusjonsproteinet er uttrykket ”operativt forbundet” ment å antyde at de første og andre polypeptider er kjemisk forbundet (mest typisk via en kovalent binding som en peptid-binding) på en måte som tillater O-forbundet glykosylering av det første polypeptid. Benyttet for å henvise til nukleinsyrer som koder et fusjonspolypeptid betyr uttrykket operativt forbundet at en nukleinsyre som koder mucinpolypeptidet og ikke-mucinpolypeptidet er fusert in-frame til hverandre. Ikke-mucinpolypeptidet kan være fusert til N-terminus eller C-terminus av mucinpolypeptidet.

ABO-fusjonsproteinet kan være forbundet til én eller flere ytterligere deler. For eksempel kan ABO-fusjonsproteinet i tillegg være forbundet til et GST-fusjonsprotein hvori ABO-fusjonsproteinsekvensen er fusert til C-terminus av GST- (dvs. glutation S-transferase) sekvensene. Slike fusjonsproteiner kan lette rensingen av ABO-fusjonsproteinet. Alternativt kan ABO-fusjonsproteinet i tillegg være forbundet til en fast bærer. Forskjellige faste bærere er velkjente for fagmannen. Slike blandinger kan lette fjerning av antiblodgruppeantistoffer. For eksempel er ABO-fusjonsproteinet forbundet til en partikkel fremstilt av for eksempel metallforbindelser, silika, lateks, polymermateriale; en mikrotiterplate; nitrocellulose, eller nylon eller en kombinasjon derav. ABO-fusjonsproteinene bundet til en fast bærer benyttes som en absorber for å fjerne antiblodgruppeantistoffer fra en biologisk prøve som blod eller plasma.

Et fusjonsprotein kan inkludere en heterolog signalsekvens (dvs. en polypeptidsekvens som ikke er til stede i et polypeptid kodet av en mucinnukleinsyre) ved dennes N-terminus. For eksempel kan den native mucinsignalsekvensen fjernes og erstattes med en signalsekvens fra et annet protein. I spesielle vertsceller (for eksempel mammalvertsceller) kan ekspresjonen og/eller sekresjonen av polypeptid økes ved bruk av en heterolog signalsekvens.

Et kimerisk eller fusjonsprotein kan fremstilles ved standard rekombinante DNA-teknikker. For eksempel blir DNA-fragmenter som koder for forskjellige polypeptidsekvenser ligert sammen in-frame i henhold til konvensjonelle teknikker, for eksempel ved å benytte stumpendede eller trinnvis endede termini for ligering, restriksjonsenzymfordøyning for å gi egnede termini, innfylling av kohesive ender etter behov, alkalisk fosfatasebehandling for å unngå uønsket forening, og enzymatisk ligering. I en

annen utførelsesform kan fusjonsgenet syntetiseres ved konvensjonelle teknikker inkludert automatiserte DNA-syntetisører. Alternativt kan PCR-forsterkning av genfragmentene gjennomføres ved bruk av forankringsprimere som gir opphav til komplementære overheng mellom to konsekutive genfragmenter som deretter kan anneales og gjenforsterkes for å generere en kimerisk gensekvens (se for eksempel Ausubel et al. (utg.)
 5 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Videre er mange ekspresjonsvektorer kommersielt tilgjengelig som koder en fusjonsdel (for eksempel et Fc-område av en immunoglobulin tung kjede). Et glykoprotein Iba som koder nukleinsyre kan klones inn i en slik ekspresjonsvektor slik at fusjonsdelen er
 10 forbundet in-frame til immunoglobulinproteinet.

ABO-fusjonspolypeptider kan eksistere som oligomerer, som dimerer, trimerer eller pentamerer. Fortrinnsvis er ABO-fusjonspolypeptidet en dimer.

15 Det første polypeptidet, og/eller nukleinsyrer som koder det første polypeptid, kan konstrueres ved bruk av mucinkodende sekvenser som er kjent i teknikken. Egnede kilder for mucinpolypeptider og nukleinsyrer som koder mucinpolypeptider inkluderer GenBank aksessnumrene NP663625 og NM145650, CAD10625 og AJ417815, XP140694 og XM140694, XP006867 og XM006867 og henholdsvis NP00331777 og
 20 NM009151, og det vises også til disse.

Mucinpolypeptiddelene kan være tilveiebrakt som et variantmucinpolypeptid med en mutasjon i den naturlig forekommende mucinsekvens (villtype) som resulterer i et øket karbohydratinnhold (i forhold til den ikke-muterte sekvens). For eksempel omfattet
 25 variantmucinpolypeptidet ytterligere O-forbundne glykosyleringsseter sammenlignet med villtypemucinet. Alternativt omfatter variantmucinpolypeptidet en aminosyresekvensmutasjon som resulterer i et øket antall serin-, treonin- eller prolinres-ter sammenlignet med et villtypemucinpolypeptid. Det økede karbohydratinnhold kan bedømmes ved å bestemme protein:karbohydrat-forholdet i mucin ved i og for seg
 30 kjente metoder.

Mucinpolypeptiddelen kan bli tilveiebrakt som et variantmucinpolypeptid med mutasjoner i den naturlig forekommende mucinsekvens (villtype) som resulterer i mucinsekvenser som er mer resistente mot proteolyse (i forhold til den ikkemuterte
 35 sekvens).

Det første polypeptid kan inkludere fullengde-PSGL-1. Alternativt omfatter det første polypeptid mindre enn fullengde-PSGL-1-polypeptid som den ekstracellulære del av PSGL-1. For eksempel er det første polypeptid mindre enn 400 aminosyrer langt, for eksempel mindre eller lik 300, 250, 150, 100, 50 eller 25 aminosyrer langt. Eksempler
 5 på PSGL-1-polypeptid og nukleinsyresekvenser inkluderer GenBank aksjesjonsnr. XP006867; XM006867; XP140694 og XM140694.

Det andre polypeptid er fortrinnsvis oppløselig. Det andre polypeptid kan inkludere en sekvens som letter assosiasjon av ABO-fusjonspolypeptidet med et andre
 10 mucinpolypeptid. Det andre polypeptid kan inkludere minst ett område av et immunoglobulinpolypeptid. "Minst et område" er ment å inkludere en hvilken som helst del av et immunoglobulinmolekyl som den lette kjede, tunge kjede, Fc-område, Fab-område, Fv-område eller et hvilket som helst fragment derav. Immunoglobulinfusjonspolypeptidet er kjent i teknikken og er beskrevet for eksempel i US
 15 patenter nr. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147 og 5,455, 165.

Det andre polypeptid kan omfatte et fullengdeimmunoglobulinpolypeptid. Alternativt omfatter det andre polypeptid mindre enn fullengdeimmunoglobulinpolypeptid, for eksempel en tung kjede, lett kjede, Fab, Fab₂, Fv eller Fc. Fortrinnsvis inkluderer det
 20 andre polypeptidet den tunge kjede av et immunoglobulinpolypeptid. Mer foretrukket inkluderer det andre polypeptidet Fc-området av et immunoglobulinpolypeptid.

Det andre polypeptid kan ha mindre effektorfunksjon enn effektorfunksjonen av et Fc-område av en villtype immunoglobulin tung kjede. Fc-effektorfunksjonen inkluderer for
 25 eksempel Fc-reseptorbinding, komplementfiksering og T-celleutarmingsaktivitet, (se for eksempel US 6,136,310). Metoder for å bedømme T-celleutarmingsaktiviteten, Fc-effektorfunksjonen og antistoffstabiliteten er velkjent i teknikken. Det andre polypeptid kan ha en lav eller ingen affinitet for Fc-reseptoren. Det andre polypeptid kan ha en lav eller ingen affinitet for komplementprotein C1_q.

30 Det kan nevnes vektorer, fortrinnsvis ekspresjonsvektorer, inneholdende et nukleinsyrekodende polypeptid, eller derivater, fragmenter, analoger eller homologer derav. Vektoren kan inneholde en nukleinsyre som koder et mucinpolypeptid operativt forbundet til en nukleinsyre som koder et immunoglobulinpolypeptid, eller derivater,
 35 fragmenter, analoger eller homologer derav. I tillegg kan vektoren omfatte en nukleinsyre som koder en blodgruppetransferase som en α 1,2-fukosyltransferase, en

α 1,3-N-acetylgalaktosamininytranferase, en α 1,3-glaktosyltransferase eller en hvilken som helst kombinasjon derav. Blodgruppetransferasen letter addisjonen av blodgruppedeterminanter på peptidryggrad av mucindelen av ABO-fusjonsproteinet. Som benyttet her henviser uttrykket "vektor" til et nukleinsyremolekyl som er i stand til

5 å transportere en annen nukleinsyre hvortil den er bundet. En type vektor er et "plasmid" som henviser til en sirkulær, dobbeltrådet DNA-sløyfe inn i hvilke ytterligere DNA-segmenter kan være ligert. En annen type vektor er en viral vektor der ytterligere DNA-segmenter kan være ligert inn i det virale genom. Visse vektorer er i stand til autonom replikasjon i en vertscelle inn i hvilken de er innført (for eksempel bakterielle

10 vektorer med en bakteriell replikasjonsopprinnelse og episomale mammalvektorer). Andre vektorer (for eksempel ikke-episomale mammalvektorer) er integrert i genomet av en vertscelle etter innføring i vertscellen og blir derved replikert sammen med vertsgenomet. Videre er visse vektorer i stand til å styre ekspresjonen av gener hvortil de operativt er bundet. Slike vektorer er her angitt som "ekspresjonsvektorer". Generelt er

15 ekspresjonsvektorer av nytte i rekombinant DNA-teknikk ofte i form av plasmider. I foreliggende beskrivelse kan "plasmid" og "vektor" benyttes om hverandre da plasmidet er den vanligst benyttede form for vektor. Andre former av ekspresjonsvektorer som virale vektorer (for eksempel replikasjonsdefektive retrovirus, adenovirus og adenoassosierte virus) som tjener ekvivalente funksjoner er mulige.

20 De rekombinante ekspresjonsvektorer omfatter en nukleinsyre i en form egnet for ekspresjon av nukleinsyren i en vertscelle, noe som betyr at de rekombinante ekspresjonsvektorer inkluderer én eller flere regulatoriske sekvenser, valgt på basis av vertscellene som benyttes for ekspresjon, dvs. operativt forbundet med

25 nukleinsyresekvensen som skal uttrykkes. I en rekombinant ekspresjonsvektor er "operativt forbundet" ment å bety at nukleotidsekvensen av interesse er forbundet til den eller de regulatoriske sekvenser på en måte som tillater ekspresjon av nukleotidsekvensen (for eksempel i et *in vitro* transkripsjons/translasjonssystem eller i en vertscelle når vektoren er innført i vertscellen).

30 Uttrykket "regulatorisk sekvens" er ment å inkludere promotere, enhancere og andre ekspresjonskontrollelementer (for eksempel polyadenyleringssignaler). Slike regulatoriske sekvenser er for eksempel beskrevet hos Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Regulatoriske sekvenser inkluderer de som styrer konstitutiv ekspresjon

35 av en nukleotidsekvens i mange typer vertsceller og de som styrer ekspresjonen av

nukleotidsekvens kun i visse vertsceller (for eksempel vevsspesifikke, regulatoriske sekvenser). Det vil være klart for fagmannen at konstruksjonen av ekspresjonsvektoren kan avhenge av slike faktorer som valgt av vertsceller som skal transformeres, nivået av ekspresjon av ønsket protein osv. Ekspresjonsvektorene kan innføres i vertsceller for
 5 derved å produsere proteiner eller peptider inkludert fusjonsproteiner eller –peptider, kodet av nukleinsyrer som beskrevet her (for eksempel ABO-fusjonspolypeptider, mutante former av ABO-fusjonspolypptider osv.).

De rekombinante ekspresjonsvektorer kan konstrueres for ekspresjon av ABO-
 10 fusjonspolypeptider i prokaryotiske eller eukaryotiske celler. For eksempel kan ABO-fusjonspolypeptider uttrykkes i bakterieceller som *Escherichia coli*, insektceller (ved bruk av bakulovirusekspresjonsvektorer), gjærceller eller mammalceller. Egnede vertsceller er diskutert ytterligere hos Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).
 15 Alternativt kan den rekombinante ekspresjonsvektor transkriberes og translateres *in vitro*, for eksempel ved bruk av T7 promoterregulatoriske sekvenser og T7 polymerase.

Ekspresjon av proteiner i prokaryoter blir som regel gjennomført i *Escherichia coli* med vektorer inneholdende konstitutive eller inducible promotere som styrer ekspresjonen av
 20 enten fusjons- eller ikke fusjonsproteiner. Fusjonsvektorer føyer et antall aminosyrer til et protein kodet deri, vanligvis til aminotermus av det rekombinante protein. Slike fusjonsvektorer tjener karakteristisk tre formål: (i) å øke ekspresjonen av rekombinant protein; (ii) å øke oppløseligheten av det rekombinante protein; og (iii) å understøtte rensing av det rekombinante protein ved å virke som en ligand ved affinitetsrensing.
 25 Ofte blir i fusjonsekspresjonsvektorer et proteolytisk spaltingssete innført ved sammenføyningen mellom fusjonsdelen og den rekombinante del for å muliggjøre separering av det rekombinante protein fra fusjonsdelen etter rensing av fusjonsproteinet. Slike enzymer og deres kognate gjenkjennelsessekvenser inkluderer faktor Xa, trombin og enterokinase. Typiske fusjonsekspresjonsvektorer inkluderer
 30 pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) og pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) som fuserer glutation S-transferase (GST), maltose E-bindingsprotein henholdsvis protein A eller det rekombinante målprotein.

35 Eksempler på egnede, indusible ikke-fusjons *E.-coli* ekspresjonsvektorer inkluderer pTrc (Amrann *et al.*, (1988) *Gene* 69:301-315) og pET 11d (Studier *et al.*, Goeddel, GENE

EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

En strategi for å maksimalisere rekombinant proteinekspresjon i *E. coli* er å uttrykke
 5 proteinet i en vertsbakterie med en forringet kapasitet til proteolytisk spaltning av det
 rekombinante protein, se for eksempel Gottesman, Goeddel, GENE EXPRESSION
 TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego,
 Calif. (1990) 119-128. En annen strategi er å endre nukleinsyresekvensen for
 nukleinsyre som skal innføres i en ekspresjonsvektor slik at de individuelle kodoner for
 10 hver aminosyre er de som fortrinnsvis benyttes i *E. coli* (se for eksempel Wada, *et al.*,
 1992. *Nucl. Acids Res.* 20:2111-2118). Slik endring av nukleinsyresekvenser kan
 gjennomføres ved å benytte standard DNA synteseteknikker.

ABO-fusjonspolypeptidekspresjonsvektoren kan være en gjærekspresjonsvektor.
 15 Eksempler på vektorer for ekspresjon i gjæren *Saccharomyces Cerevisiae* inkluderer
 pYepSecl (Baldari, *et al.*, 1987. *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan og Herskowitz,
 1982. *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schutz *et al.*, 1987. *Gene* 54:113-123), pYES2
 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif), og picZ (In Vitrogen Corp. San Diego,
 Calif.).

20 Alternativt kan ABO-fusjonspolypeptid uttrykkes i insektceller ved bruk av
 baculovirus ekspresjonsvektorer. Baculovirus vektorer som er tilgjengelige for
 ekspresjon av proteiner i dyrkede insektceller (for eksempel SF9 celler) inkluderer pAc-
 serien (Smith, *et al.* 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3:2156-2165) og pVL serien (Lucklow og
 25 Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39).

En nukleinsyre kan bli uttrykt i mammalceller ved bruk av en mammal
 ekspresjonsvektor. eksempler på mammal ekspresjonsvektorer inkluderer pCDM8
 (Seed, 1987. *Nature* 329:840) og pMT2PC (Kaufman, *et al.*, 1987. *EMBO J.* 6: 187-
 30 195). Når de benyttes i mammalceller blir ekspresjonsvektorene kontrollfunksjoner ofte
 tilveiebrakt av virale regulatoriske elementer. For eksempel er vanlig benyttede
 promotere avledet fra polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus og simianvirus 40. For
 andre egnede ekspresjonssystemer for både prokaryotiske og eukaryotiske celler
 henvises det for eksempel til kapitlene 16 og 17 hos Sambrook, *et al.*, MOLECULAR
 35 CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2. utgave., Cold Spring Harbor Laboratory,
 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Vertsceller hvori en rekombinant ekspresjonsvektor er innført er mulig. Uttrykket "vertscelle" og "rekombinant vertscelle" benytter om hverandre her. Det skal være klart at slike uttrykk henviser ikke bare til den spesielle angjeldende celle men også til avkommet eller potensielt avkom av en slik celle. Fordi visse modifikasjoner kan inntre i etterfølgende generasjoner på grunn av enten mutasjon eller omgivelsespåvirkninger behøver et slikt avkom ikke nødvendigvis være identisk med opphavscellen men er fremdeles innenfor rammen av uttrykket slik det her benyttes.

En vertscelle kan være en hvilken som helst prokaryotisk eller eukaryotisk celle. For eksempel kan glukoprotein I β -fusjonspolypeptider uttrykkes i bakterieceller som *E. coli*, insektceller, gjær eller mammalceller (som humane, kinesiske hamsterovarie-(CHO) eller COS-celler). Andre egnede vertsceller er kjent for fagmannen.

Vektor DNA kan innføres i prokaryotiske eller eukaryotiske celler via konvensjonelle transformasjons- eller transfeksjonsteknikker. Som benyttet her er uttrykkene "transformasjon" og "transfeksjon" ment å henvise til et antall velkjente teknikker for innføring av fremmednukleinsyrer (for eksempel DNA) i en vertscelle, inkludert kalsiumfosfat- eller kalsiumklorid ko-presipitering, DEAE-dekstranmediert transfeksjon, lipofeksjon, eller elektroporering. Egnede metoder for transformering eller transfektering av vertsceller kan finnes hos Sambrook *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2. utgave., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) og andre laboratoriemanualer.

For stabil transfeksjon av mammalceller er det vel kjent at avhengig av benyttede ekspresjonsvektorer og transfeksjonsteknikk, kun en liten andel av cellene kan integrere det angjeldende fremmede DNA i sitt genom. For å identifisere og å velge disse integranter blir et gen som koder en valgbar markør (for eksempel resistens mot antibiotika) generelt innført i vertscellen sammen med genet av interesse. Forskjellige valgbare markører inkluderer de som gir resistens mot medikamenter som G418, hygromycin og metotreksat. Nukleinsyre som koder en selekterbar markør kan innføres i vertscellen på samme vektor som den som koder glukoprotein I β fusjonspolypeptene eller kan innføres på en separat vektor. Celler som stabilt transfekterer med den innførte nukleinsyre kan identifiseres ved medikamentsseleksjon

(for eksempel celler som har inkorporert det valgbare markørgen vil overleve mens de andre celler dør).

En vertscelle, for eksempel en prokaryotisk eller eukaryotisk vertscelle i kultur, kan
 5 benyttes for å produsere (dvs. uttrykke) ABO-fusjonspolypeptider. Metoder for å
 produsere ABO-fusjonspolypeptid ved bruk av en vertscelle er mulig. Metoden kan
 omfatte dyrking av vertscellen (hvor en rekombinant ekspresjonsvektor som koder
 ABO-fusjonspolypeptidene er innført) i et egnet medium slik at ABO-
 fusjonspolypeptidene produseres. Metoden kan videre omfatte isolering av ABO-
 10 polypeptid fra mediet eller vertscellen.

ABO-fusjonspolypeptidene kan isoleres og renses i henhold til konvensjonelle
 betingelser som ekstrahering, presipitering, kromatografering, affinitetskromatografi,
 elektroforese og liknende. For eksempel kan immunoglobulin fusjonsproteinene renses
 15 ved å føre en oppløsning gjennom en kolonne som inneholder mobilisert protein A eller
 protein G i selektivt binder Fc-delen av fusjonsprotein. Se for eksempel K. J. Reis et al.,
 J. Immunol. 132:3098-3102 (1984); PCT patentsøknad, publikasjonsnr. WO87/00329.
 Fusjonspolypeptidet kan så elueres ved behandling med et kaotropisk salt eller ved
 eluering med vandig eddiksyre (1 M).

20 Alternativt kan ABO-fusjonspolypeptidene syntetiseres kjemisk ved bruk av i og for seg
 kjente metoder. Kjemisk syntese av polypeptider er beskrevet i for eksempel , Et antall
 proteinsyntesemetoder er kjent i teknikken, inkludert syntese ved bruk av en
 peptidsyntetisør, se for eksempel *Peptide Chemistry, A Practical Textbook*, Bodansky,
 25 red. Springer-forlag, 1988; Merrifield, *Science* 232: 241-247 (1986); Barany, *et al*, *Intl.*
J. Peptide Protein Res. 30: 705-739 (1987); Kent, *Ann. Rev. Biochem.* 57:957-989
 (1988), og Kaiser, *et al.*, *Science* 243: 187-198 (1989). Polypeptidene renses slik at de
 er i det vesentlige frie for kjemiske forløpere eller andre kjemikalier ved bruk av
 standard peptidrenseteknikker. Uttrykket "i det vesentlige fri for kjemiske forløpere
 30 eller andre kjemikalier" inkluderer preparater av peptid der peptidet er separert fra
 kjemiske forløpere eller andre kjemikalier som er involvert i syntesen av peptidet. I en
 utførelsesform inkluderer språket "i det vesentlige fri for kjemiske forløpere eller andre
 kjemikalier" preparater av peptid enn rundt 30% (tørrvekt) kjemiske forløpere eller ikke
 peptidkjemikalier, helst mindre enn rundt 20% slik, aller helst mindre enn rundt 10%
 35 slike og helst spesielt mindre enn rundt 5% kjemiske forløpere eller ikke
 peptidkjemikalier.

Kjemisk syntese av polypeptider letter innarbeidingen av modifiserte eller ikke-naturlige aminosyrer, inkludert D-aminosyrer og andre små organiske molekyler. Erstatning av en eller flere L-aminosyrer i et peptid med de tilsvarende D-aminosyreisoformer kan benyttes for å øke resistensen hos peptider mot enzymatisk hydrolyse, og å forbedre en eller flere egenskaper hos biologiske aktive peptider, for eksempel reseptorbinding, funksjonell potens eller virkningsvarighet, se for eksempel Doherty, *et al.*, 1993, *J. Med. Chem.* 36: 2585-2594; Kirby, *et al.*, 1993. *J. Med. Chem.* 36:3802-3808; Morita, *et al.*, 1994. *FEBS Lett* 353: 84-88; Wang, *et al.*, 1993. *Int. J. Pept. Protein Res.* 42:392-399; Fauchere og Thiunieu, 1992. *Adv. Drug Res.* 23: 127-159.

Innføring av kovalent fornetning i en peptidsekvens kan konformasjonelt og topografisk stramme inn polypeptidryggraden. Denne strategi kan benyttes for å utvikle peptidanalogs av fusjonspolypeptider med økt potens, selektivitet og stabilitet. På grunn av at den konformasjonelle entropi for et syklisk peptid er lavere enn det lineære motstykket, kan adopsjon av en spesifikk konformasjon inntre med en mindre reduksjon i entropi for en syklisk analog enn for en asyklisk analog og derved gjøre den frie energi for binding mer gunstig. Makrosyklisering gjennomføres ofte ved å til danne en amidbinding mellom peptid N- og C-termini, mellom en sidekjede og en N- eller terminus [for eksempel ved hjelp av $K_3Fe(CN)_6$ ved pH 8,5] (Samson *et al.*, *Endocrinology*, 137: 5182-5185 (1996) eller mellom to aminosyresidekjeder, se for eksempel DeGrado, *Adv Protein Chem*, 39: 51-124 (1988). Disulfidbroer kan også innføres i lineære sekvenser for å redusere deres fleksibilitet. Se for eksempel Rose *et al.*, *Adv Protein Chem.* 37: 1-109 (1985); Mosberg *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 106: 505-512 (1982). Videre har erstatning av cysteinrester med penicillamin (Pen, 3-merkaptto-(D) valin) for å øke selektiviteten for visse opioidreseptorinteraksjoner, Lipkowski og Carr, *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*, Gutte, red., Academic Press s 287-320 (1995).

30

Mulig terapi eller forebygging av antistoffmediert graftreaksjon

Det er mulig å forebygge eller behandle antistoffmediert graft-reaksjon (AMR), for eksempel organtransplantatreaksjon. Slike transplantater kan inkludere for eksempel nyrer, lever, hud, pankreas, cornea eller hjerte. AMR kan inkludere enhver antistoff

35

mediert graft-rejeksjon hos resipienten. Dette kan inkludere å bringe en biologisk prøve fra et individ i kontakt med ABO-fusjonspeptid. Den biologiske prøve er for eksempel blod, dvs. fullblod eller plasma. Prøven er kjent eller mistenkt for å omfatte et antistoff, for eksempel et anti-blodgruppeantistoff. Den biologiske prøve kan bli trukket av fra individet før kontakten mellom prøven og AB fusjonspolypeptidet. Den biologiske prøve kan bringes i kontakt med ABO-fusjonspeptidet under betingelser som tillater dannelse av et ABO-fusjonspeptidanti-blodgruppe antistoffkompleks. ABO-fusjonspeptidkompleks blir, hvis det til stede, separert fra den biologiske prøve for å eliminere anti-blodgruppeantistoffene og den biologiske prøve reinfuseres til individet. AMR kan også behandles eller forebygges ved administrering til et individ av ABO-fusjonspolypeptid.

Individet kan for eksempel være et hvilket som helst pattedyr, for eksempel et menneske, en primat, en mus, rotte, hund, katt, ku, hest eller gris. Behandlingen kan administreres før individet mottar et ABO inkompatibelt transplantat. Alternativt kan behandlingen administreres etter at individet mottar et ABO inkompatibelt transplantat.

Den biologiske prøve kan bringes i kontakt med ABO-fusjonsprotein ved metoder som er vel kjent for fagmannen. For eksempel benyttes plasmaferese eller ekstrakorporeal immunoabsorpsjon.

Generelt mener man at enhver lidelse som etiologisk er forbundet med en antistoff mediert reaksjon kan være gjenstand for forebygging eller terapi. AMR behandles eller forhindres når overlevelsesgraden av organtransplanteringen er større enn for et organtransplantat som ikke behandles ved oppfinnelsens metode. Ved overlevelsesgrad for transplantatet menes tiden før transplantatet avvises av resipienten. For eksempel blir AMR behandlet eller forhindret når transplantatet overlever minst 1, 2, 4 eller 8 uker etter transplantering. Fortrinnsvis overlever transplantatet 3, 6, 13 måneder. Aller helst overlever transplantatet 2, 3, 5 eller flere år.

30

Metoder for å fjerne anti-blodgruppe antistoffer fra en prøve

Det kan tilveiebringes fremgangsmåter for å fjerne eller redusere anti-blodgruppe antistoffer fra en prøve. Prøven er et biologisk fluid som blod eller plasma. Alternativt er prøven et biologisk vev som hjertevev, levervev, hud eller nyrevev. Fremgangsmåten

35

inkluderer å bringe en prøve i kontakt med et ABO-fusjonspeptid. Prøven bringes i kontakt med ABO-fusjonspeptidet under betingelser som tillater dannelse av et ABO-fusjonspeptid-anti-blodgruppeantistoffkompleks. ABO-fusjonspeptid-antistoffkompleks blir, hvis det er til stede, separert fra den biologiske prøve for å fjerne eller redusere
 5 mengden av antiblodgruppeantistoffer.

Farmasøytiske preparater som inkluderer ABO-fusjonspolypeptider eller nukleinsyrer som koder disse.

10 ABO-fusjonsproteiner eller nukleinsyremolekyler som koder disse fusjonsproteiner (her også kalt "terapeutika" eller "aktive forbindelser"), og derivater, fragmenter, analoger og homologer derav, kan innarbeides i farmasøytiske preparater egnet for administrering. Slike preparater omfatter karakteristisk nukleinsyremolekylet, protein eller antistoff og en farmasøytisk akseptabel bærer. Som benyttet her er uttrykket
 15 "farmasøytisk akseptabel bærer" ment å inkludere et hvilket som helst og alle oppløsningsmidler, dispersjonsmedia, belegg, antibakterielle og anti-fungale midler, isotonisk absorpsjonsforsinkende midler, og liknende, som er kompatible med farmasøytisk administrering. Egnede bærere er beskrevet i den siste utgave av "Remington's Pharmaceutical Sciences" i standard referansetekst på dette området
 20 hvortil det vises når det gjelder detaljer. Foretrukne eksempler på slike bærere eller diluenter inkluderer men er ikke begrenset til vann, saltoppløsning, Ringers oppløsning, dekstroseoppløsning og 5% human serumalbumin. Liposomer og ikke-vandige bærere som fikserte oljer kan også benyttes. Bruken av slike medier og midler for farmasøytisk aktive stoffer er vel kjent på området. Bortsett fra i den grad ethvert konvensjonelt
 25 medium eller middel er inkompatibelt med den aktive forbindelse ligger anvendelsen av slike innenfor oppfinnelsens ramme. Ytterligere aktive forbindelser kan også innarbeides i preparatene.

De aktive midler som beskrives her kan også formuleres som liposomer. Liposomer
 30 fremstilles ved i og for seg kjente metoder som beskrevet for eksempel av Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); og U.S. patent nr. 4 485 og 4 544 545. Liposomer med øket sirkulasjonstid er beskrevet i U.S. patent nr. 5 013 556.

35 Spesielt brukbare liposomer kan genereres ved reversfasefordampingsmetode med et lipidpreparat omfattende fosfatidylkolin, kolesterol og PEG-derivatiserte

fosfatidyletanolamin (PEG-PE). Liposomer ekstruderes gjennom filtre med definert porestørrelse for å gi liposomer med ønsket diameter.

Et farmasøytisk preparat kan formuleres for å være kompatibelt med den tilsiktede administreringsmodus. Eksempler på administreringsmodi inkluderer parenteralt som
 5 intravenøst, intradermalt, subkutan, oralt (for eksempel inhalering) transdermalt (dvs. topisk), transmukosalt og rektalt. Oppløsninger eller suspensjoner som benyttes for parenteral, intradermal eller sub kutan applikering kan inkludere de følgende komponenter: en steril diluent som vann for injeksjon, saltoppløsning, fikserte oljer,
 10 polyetylenglykoler, glyserol, propylenglykol eller andre syntetiske oppløsningsmidler; antibakterielle midler som benzylalkohol eller metylparabener; antioksidanter som askorbinsyre eller natriumbisulfitt; chelateringsmidler som etylendiamintetraeddiksye (EDTA); buffere som acetater, sitrater eller fosfater, og midler for justering av tonisiteten som natriumklorid eller dekstrose. pH-verdien kan justeres med syrer eller
 15 baser som saltsyre eller natriumhydroksid. De parenterale preparater kan innelukkes i ampuller, engangssprøyter eller flerdoseampuller fremstilt av glass eller plast.

Farmasøytiske preparater som er egnet for injiseringsbruk inkluderer sterile, vandige oppløsninger der det dreier seg om vannoppløselige forbindelser) eller dispersjoner
 20 samt sterile pulvere for senere fremstilling av sterile, injiserbare oppløsninger eller dispersjoner. For intravenøs administrering inkluderer egnede bærere fysiologisk saltoppløsning, bakteriostatisk vann, "Cremophor EL" (BASF, Parsippany, N.J.) eller fosfatbufret saltoppløsning (PBS). I alle tilfeller må preparatet være stabilt og bør være fluid i den grad at det foreligger lett sprøytbarhet. Preparatet må være stabilt under
 25 fremstillingsbetingelsene og lagring og må bevares mot kontaminerende innvirkning av mikroorganismer som bakterier eller fungi. Bæreren kan være et oppløsningsmiddel eller et dispergeringsmedium inneholdende for eksempel vann, etanol, polyol (for eksempel glyserol, propylenglykol og flytende polyetylenglykol og liknende) og egnede blandinger derav. Den riktige fluiditet kan for eksempel opprettholdes ved bruk av et
 30 belegg som lecitin, ved opprettholdelse av en ønsket partikkelstørrelse når det gjelder en dispersjon og ved bruk av surfaktanter. Forebygging av virkningen av mikroorganismer kan oppnås ved hjelp av forskjellige antibakterielle og anti-fungale midler som for eksempel parabener, klorbutanol, fenol askorbinsyre, timerosal og liknende. I mange tilfeller vil det være fordelaktig å inkludere isotoniske midler som sukker, polyalkoholer
 35 som mannitol, sorbitol, natriumklorid eller liknende i preparatet. Forlenget absorpsjon

av de injiserbare preparater kan tilveiebringe ved i preparatet å innarbeide et middel som forsinket absorpsjon, for eksempel aluminium monostearat og gelatin.

5 Sterile, injiserbare oppløsninger kan fremstilles ved å innarbeide den aktive forbindelse (for eksempel et ABO-fusjonsprotein) i den krevde mengde i et egnet oppløsningsmiddel med en eller en kombinasjon av bestanddeler som angitt ovenfor etter behov, fulgt av filtreringssterilisering. Generelt fremstilles dispersjoner ved innarbeiding av den aktive forbindelse i en steril bærer som inneholder et hoveddisperseringsmiddel og de ønskede andre bestanddeler fra de som er angitt
10 ovenfor. Når det gjelder sterile pulvere for fremstilling av sterile, injiserbare oppløsningsmidler er fremstillingsmetoder for eksempel vakuumbørsting og frysetørking som gir pulvere med aktiv bestanddel pluss eventuelle ytterligere, ønskede bestanddeler fra en tidligere sterilfiltrert oppløsning derav.

15 Orale preparater inkluderer generelt en inert diluent og spiselig bærer. De kan være innelukket i gelatin kapsler eller presset til tabletter. For oral, terapeutisk administrering kan den aktive forbindelse innarbeides med eksipienser og benyttelse i form av tabletter, sugetabletter eller kapsler. Orale preparater kan også fremstilles ved anvendelse av fluidbærer for anvendelse som munnvask der forbindelsen i den fluide bærer applikeres
20 oralt og skylles eller ekspektoreres eller svelges. Farmasøytisk kompatible bindemidler og eller adjuvansstoffer kan innarbeides som en del av blandingen. Tabletter, piller, kapsler, sugetabletter og liknende kan inneholde en hvilken som helst av de følgende bestanddeler eller forbindelser av tilsvarende art: et bindemiddel som mikrokrySTALLinsk cellulose, tragakantgummi eller gelatin; en eksipiens som stivelse eller laktose; et
25 disintegreringsmiddel som alginsyre, Primogel eller en maisstivelse; et smøremiddel som magnesiumstearat eller Sterotes; et glidemiddel som kolloid silikondioksid; et søtningsmiddel som sukkrose eller sakkarin; eller et smaksstoff som peppermynte, metylsalicylat eller appelsinsmak.

30 For administrering ved inhalering blir forbindelsene avgitt i form av en aerosolspray fra trykksatte beholdere eller dispensere inneholdende et egnet drivmiddel, for eksempel en gass som karbondioksid, eller en forstøver.

Systemisk administrasjon kan også skje ved transmukosal eller transdermale midler. For
35 transmukosal eller transdermal administrering benyttes det penetranter som egnet for barrierer som skal gjennomtrenges, i formuleringen. Slike penetranter er generelt er

generelt kjent i teknikken og inkluderer for eksempel for transmukosal administrering, detergenter, gallesyresalt eller fusidinsyrederivater. Transmukosal administrering kan oppnås ved bruk av nesespray eller suppositorier. For transdermal administrering blir de aktive forbindelser formulert til salver, kremer, geler eller liknende som velkjent i

5 teknikken.

Forbindelsene kan også fremstilles i form av suppositorer (for eksempel med konvensjonelle suppositoriebaser som kakaosmør eller andre glyserider) eller retensjonemas for rektal avlevering.

10

De aktive forbindelser kan prepareres med bærere som beskytter forbindelsen mot hurtig eliminering fra kroppen som formuleringer for kontrollert frigivning, inkludert implantater og mikroinnkapslede avleveringssystemer. Bionedbrytbare, biokompatible polymerer kan benyttes, for eksempel etylenvinylacetat, polyanhydrider,

15 polyglykolsyre, kollagen, polyortoestere og polymelkesyre. Metoder for fremstilling av slike formuleringer vil være vel kjente for fagmannen. Materialene kan også oppnås kommersielt fra Alza Corporation og Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomale suspensjoner (inkludert liposomer innsiktet på infektete celler med monoklonale antistoffer mot virale antigener) kan også benyttes som farmasøytisk akseptable bærere.

20 Disse kan fremstilles i henhold til metoder som vel kjente på området, for eksempel som beskrevet i U.S. patent nr. 4,522,811.

Orale eller parenterale preparater kan formuleres til enhetsdoseformer for enkel administrering og enhetlig dosering. Enhetsdoseformer slik som kan benyttes her viser

25 til fysisk diskrete enheter egnet for enhetsdosering for individer som skal behandles; hver enhet inneholder en på forhånd bestemt mengde aktiv bestanddel beregnet for å gi den ønskede terapeutiske effekt i forbindelse med de krevde, farmasøytiske bærere. Spesifikasjonen for enhetsdoseformene dikteres av og er direkte avhengig av de unike karakteristika for den aktive forbindelse og den terapeutiske effekt som skal oppnås og

30 begrensningene som er inherente i kompenseringsteknikker som en aktiv forbindelse for behandlingen av individer.

Nukleinsyremolekyler kan innføres i vektorer og benyttes som genterapivektorer. Genterapivektorer kan avleveres til et individ, for eksempel ved intravenøs injeksjon,

35 lokal administrering (se for eksempel U.S. patent nr. 5,328,470) eller ved stereotaktisk injisering (se for eksempel Chen, *et al.*, 1994. *Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). Det

farmasøytiske preparat ved genterapivektoren kan inkludere genterapivektoren i en aksepterbar fortynner, eller kan omfatte en lavfrigjøringsmatriks hvori genavleveringsbæreren er innleiret. Alternativt og der den fullstendige genavleveringsvektor kan fremstilles intakt fra rekombinante celler, for eksempel
 5 retrovirale vektorer, kan det farmasøytiske preparat inkludere en eller flere celler som gir genavleveringssystemet.

Preparater med opprettholdt frigivning kan hvis ønskelig fremstilles. Egnede eksempler på preparater med opprettholdt frigivning inkluderer semipermeable matrikser av faste,
 10 hydrofobe polymerer inneholdende antistoffet og der matrisene foreligger i form av formgitte gjenstander, for eksempel filmer, eller mikrokapsler. Eksempler på matrikser med opprettholdt frigivning inkluderer polyestere, hydrogeler (for eksempel poly(2-hydroksyetyl-metakrylat), eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (U.S. patent nr. 3,773,919), kopolymerer av L-glutaminsyre og γ etyl-L-glutamat, ikke nedbrytbart
 15 etylen-vinylacetat, nedbrytbar melkesyre-glykolsyrekopolymerer slik som "LUPRON DEPOT" (injiserbare mikrosfærer bestående av melkesyre-glykolsyrekopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre. Mens polymerer som etylenvinylacetat og melkesyre-glykolsyre muliggjør frigivning av molekyler i over 100 dager frigir visse hydrogeler proteiner i løpet av kortere tidsperioder.

20

De farmasøytiske preparater kan innarbeides i en beholder, en pakke eller en dispenser sammen med instruksjoner for administrering.

Oppfinnelsen skal illustreres nærmere ved de følgende eksempler og
 25 referanseeksempler.

EKSEMPEL 1: GENERELLE METODER

De data som beskrevet her ble generert ved bruk av de følgende reagenser og metoder.
 30

Cellekultur

35 COS-7 m6-celler (Seed, 1987), CHO-K1 (ATCC CCL-61) og den SV40 Large T-antigenuttrykkende 293 human embryonisk nyrecellelinje (293T; vennlig tilveiebrakt av

B. See), ble dyrket i Dulbaccos modifiserte Eagle's medium (GibcoBrl, Life Technologies, Paisley, Skottland), supplert med 10% føtal bovint serum (GibcoBrl, Life Technologies), 25 µg/ml gentamycinsulfat (Sigma, St. Louis, MO) og 2 mM glutamin (GibcoBrl, Life Technologies). Cellene ble ført gjennom hver 2 – 4 dag. HH14
 5 hybridome(ATCC HB 9299; U.S. patent 4,857,639) ble dyrket i RPMI 1640 (GibcoBrl, Life Technologies), supplert med 10% føtalt bovint serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin og 2 mM glutamin.

Rensing av HH14 antistoffer

10

Supernatant ble samlet fra dyrkede HH14 celler. To liter supernatant ble affinitetsrenset på en geite-anti-muse-IgM (Sigma) kolonne ved bruk av en Bio-Rad LP kromatografi (Bio-Rad, Hercules, CA). De bundne partikler ble eluert med 0,1 M glysin-Cl, pH 2,5, og eluatet ble umiddelbart nøytralisert ved bruk av 1 M Tris-Cl, pH 7,5. Eluatet ble
 15 dialysert mot 1% fosfatbufret saltoppløsning (PBS) og lyofilisert. Lyofiliserte proteiner ble oppløst i destillert H₂O til en sluttkonsentrasjon på 3 µg/µl, målt ved BCA-analyse.

Konstruksjon av ekspresjonsvektorer

20 Humane blodgrupper *A*-genet ble polymerasekjedereaksjons-(PCR)-forsterket av cDNA fremstilt fra total RNA isolert fra MKN-45-cellelinjen ved bruk av 5'-cgc ggg aag ctt gcc gag acc aga cgc gga-3' (SEQ ID NO: 1) som fremoverprimer og 5'-cgc ggg cgg ccg ctc acg ggt tcc gga ccg c-3' (SEQ ID NO: 2) som reversprimer. Det forsterkede cDNA (*A*-genet) ble subklonet inn i polylinkeren av CDM8 (Seed, 1987) ved bruk av *Hind* III
 25 og *Not* I. Blodgruppe *H*-genet ble PCR-forsterket i to deler ved bruk av et humant tonsil stromabibliotek som templat. Et indre *Sse* I-sete ble skapt ved PCR ved bruk av indre overlappingsprimere som forandret nukleotid 775 (GenBank aksjesjonsnummer M35531) til en C og dannet et *Sse* I-sete av *Pst* I-sete. Det cDNA som koder karboksyterminalen av FUT1 ble forsterket ved bruk av 5'-ggg gac tac ctg cag gtt atg
 30 cct cag cggc-4' (SEQ ID NO: 3) som fremoverprimer og 5'-cgc ggg gcg gcc gct tca agg ctt agc caa tgt-3' (SEQ ID NO: 4) som reversprimer, spaltet av *Sse* I og *Not* I og sublonet inn i CDMa ekspresjonsvektoren fordøyet med *Pst* I og *Not* I. Det cDNA som kodet aminoterminal av FUT1 ble forsterket ved bruk av 5'-cgc ggg aag ctt acc atg tgg ctc cgg agc cat-3' (SEQ ID NO: 5) som fremoverprimer og 5'-cca gcg ctg agg cat aac
 35 ctg cag gta gtc-3' (SEQ ID NO: 6) som reversprimer, spaltet med *Hind* III og *Sse* I og subklonet inn i CDM8 som bar karboksyterminalen etter *Hind* III og *Sse* I spalting.

Se-genet ble tilsvarende PCR-forsterket fra cDNA reverstranskribert fra total RNA isolert fra perifere blodmononukleære celler donert av en blodgruppe A₂Le(a-b+)Se-individ ved bruk av 5'-cgc ggg aag ctt acc atg ctg grc gtt cag atg-3' (SEQ ID NO: 7) som fremoverprimer og 5'-cgc ggg cgg ccg ctt agt gct tga gta agg g-3' (SEQ ID NO: 8) som revers primer. *Se*-gen cDNA ble subklonet inn i CDM8 ved bruk av *Hind* III og *Not* I. Glykosyltransferase cDNA 'er ble sekvensiert og den enzymatiske aktivitet de kodet undersøkt ved strømningsstyrt cytometriske analyse av transienttransfekteerte celler ved hjelp av blodgruppe H- og A-spesifikke monoklonale antistoffer. PSGGL-1/mIgG_{2b} kimære ble konstruert som beskrevet ovenfor (Liu *et al.*, 1997).

Transfeksjoner og fremstilling av utskilt PSGL-1/mIgG_{2b} kimærer

Transfeksjonscocktailen ble fremstilt ved blanding av 39 µl 20% glukose, 39 µg plasmid DNA, 127 µl dH₂O og 15,2 µl 0,1 M polyetylenimin (25 kDa; Aldrich, Milwaukee, WI) i 5-ml polystyrenrør. I alle transfeksjonsblandinger ble det benyttet 13 µg PSGL-1/mIgG_{2b}-plasmid. Tretten mikrogram av plasmidet for de forskjellige glukosyltransferaser ble tilsatt og, hvis nødvendig, ble CDM8-plasmid tilsatt for å nå en total på 39 µg plasmid-DNA. Blandingene ble hensatt ved romtemperatur i 10 minutter før det ble satt 10 ml kulturmedium til cellene ved omtrent 70% konfluens. Etter 7 dager ble cellesupernatantene samlet, debris sentrifugert av (1400 x g, 15 mm) og NaN₃ tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,02% vekt/volum).

Rensing av utskilt PSGL-1/mIgG_{2b}, for SDS-PAGE og western blot analyser

PSGL-1/mIgG_{2b}-fusjonsproteiner ble rensset fra samlede supernatanter på 50 µl geite-anti-mIgG-agarosekuler (100:1 oppslemming; Sigma) ved å snus opp ned over natten ved 4°C. Kulene med fusjonsproteinet ble vasket tre ganger i PBS og benyttet for etterfølgende analyse. Karakteristisk ble prøven oppløst i 50 µl 2 x reduserende prøvebuffer og 10 : 1 prøve ble fylt i hver brønn.

PNGaseF-behandling av affinitetsrenset PSGL-1/mIgG_{2b}

Et PnGaseF kitt (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) ble benyttet for N-glycan deglykosylering. En lett modifikasjon av protokollen som ble levert av produsenten, ble

benyttet. I 1,5 ml Eppendorfrør ble 20 µl reaksjonsbuffer blandet med rensed PSGL-1/mIgG_{2b} på agarosekuler og kokt i 3 minutter. Blandingen ble sentrifugert ned og 10 µl supernatant overført til et nytt Eppendorfrør. Ti mikroliter PNGaseF eller, som negativ kontroll, 10 µl reaksjonsbuffer ble tilsatt. Rørene ble inkubert i 1,5 time ved 37 °C. Etter
 5 inkubering ble 20 µl 2 ganger reduserende prøvebuffer og 10 µl H₂O tilsatt og prøvene kokt i 3 minutter.

ELISA for bestemmelse av PSGL-1/mIgG_{2b}-konsentrasjonen i supernatanter

10 Nittiseks brønner ELISA-plater (Costar 3590, Corning, NY) ble belagt med 0,5 µg/brønn affinitetsreset geite-anti-mIgG spesifikke antistoffer (Sigma) i 50 µl av 50 mM karbonatbuffer pH 9,6 i to timer ved romtemperatur. Etter blokkering o/n ved 4°C med 300 µl 3% bovint serumalbumin (BSA) i PBS med 0,05% Tween (PBS-T) og etterfølgende vasking, ble 50 µl prøver supernatanter tilsatt og seriefortynnet i
 15 kulturmedium. Etter vasking ble platene inkubert i 2 timer med 50 µl geite-anti-mIgM-HRP (Sigma), fortynnet 1 : 10.000 i blokkerende buffer. For utviklingsoppløsningen ble en tablett 3,3', 5,5'-tetrametylbenzidin (Sigma) ble oppløst i 11 ml 0,05 M sitrat/fosfatbuffer med 3 µl 30% vekt/volum H₂O₂. Ett hundre mikroliter utviklingsoppløsning ble tilsatt. Reaksjonen ble stanset med 25 µl 2 M H₂SO₄. Platene
 20 ble avlest ved 450 og 540 nm i en automatisert mikropplateleser (Bio-Tek Instruments, Winooski, VR). Som en standard ble en fortynningsserie av rensede mIgG Fe fragmenter (Sigma) i kulturmedium, benyttet i triplikat.

SDS-PAGE og Western Blotting

25 SDS-PAGE ble kjørt ved metoden ifølge Laemmli (1970) med 5% "stacking" gel og en 8% gjenoppløsningsgel og separerte proteiner ble blottet elektroforetisk på "Haybond"-Cekstramembraner som beskrevet tidligere og (Liu *et al.*, 1997). Etter blokkering over natten i Tris-bufret saltoppløsning med 0,05% Tween-20 (TBS-T) med 3% BSA ble
 30 membranene vasket tre ganger med TBS-T. De ble så inkubert i 1 time ved romtemperatur med muse-anti-human blodgruppe A alle typer (mIgM, Dako, Carpinteria, CA) eller anti-human H type 1 og (mIgG₃, Signet; Dedham, M) type 2 (mIgM, Dako) eller H type 3 (mIgM, hybridoma HH14, ATCC HB9299). Alle antistoffer ble fortynnet 1:200 i 3% BSA i TBS-T bortsett fra H type 3 antistoff som ble
 35 fortynnet til en konsentrasjon på 1 µg/ml i 3% BSA i TBS-T. Membranene ble vasket tre ganger med TBS-T før inkubering i 1 time ved romtemperatur med sekundær

pepperrot peroksidase (HRP)-konjugerte antistoffer, geite-anti-mIgM (Cappel, Durham, NC) eller geite-anti-mIgG₃ (Serotec, Oxford, England) fortynnet 1:2000 i 3% BSA i TBS-T. Bundne, sekundære antistoffer ble visualisert ved kjemiluminescens ved bruk av et ECL kitt (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige) i henhold til

5 produsentens instruksjoner. For detektering av PSGL-1/mIgG_{2b} per se ble HRP-merket geite-anti-mIgG (Sigma) benyttet i en fortynning på 1:10.000 i 3% BSA i TBS-T som beskrevet men uten inkubering med et sekundært antistoff.

10 **Bestemmelse av den relative blodgruppe A-epitopdensitet på PSGL-1/mIgG_{2b}**

Western blotts ble kjørt som beskrevet ovenfor. Membranene ble visualisert i en fluor-S Max Multimager med CCD kamera som arbeidet ved -35°C (BioRad). Ved bruk av volumverktøyet i analyseviduet av Quantity One programmet (BioRad) ble volumet

15 (summen av intensiteten av pikslene innen volumgrense x pikselareale) for blodgruppe A-reaktivitet dividert med volumet for mIgG-reaktiviteten for PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i COS-, CHO- og 293T-celler. For å sammenlikne A-epitom/muse IgG forholdene mellom PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i forskjellige vertsceller ble forholdene normalisert til forholdet oppnådd fra den A-substituerte PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i COS-celler

20 transfektert med *H*- og *A*-genene.

Absorpsjon av serum

Seks hundre mikroliter oppslemming av geite-anti-mIgG agarosekuler (Sigma) ble

25 overført 1,5 ml Eppendorf mikrosentrifugerør. Kulene ble sentrifugert ned ved en hurtig sentrifugering ved 400 x g. Supernatanten ble så fjernet og kulene vasket en gang med 1 ml PBS, sentrifugert ned igjen og overført til 18 ml supernatant fra CHO-celler transfektert med cDNA 'et som kodet PSG-1/mgIG_{2b} *Se*- og *A*-genet. Supernatantene inneholdende agarosekuler ble inkubert snudd opp ned o/n ved 4°C. For samling ble

30 kulene sentrifugert ned ved 400 x g, i 15 minutter ved romtemperatur og overført til 1,5 ml Eppendorm mikrosentrifugerør. Vaskingen ble foretatt tre ganger med PBS. Disse kuler kalles A mucinkuler. Seks hundre mikroliter anti-mIgG agarosekuler ble også fremstilt på samme måte men disse ble benyttet for fortynning av A mucinkulene for å oppnå en forsynningsserie av A mucinkulene som absorberer. disse kuler kalles geite-

35 anti-mIgG kuler. Kulene ble alikvotert til 4 ml Ellermanrør i henhold til tabell 1. A-

PAA-MPG (Syntesome, Munich, Tyskland) og B-OAA-MPG (Syntesome) ble veid og alikvotert til Ellermanrør i henhold til tabell I og deretter vasket en gang med PBS.

Sammenslått serum fra fem pasienter typet til blodgruppe O ble oppnådd fra blodbanken ved Huddinge Universitetssykehus (etisk tillatelse D nr. 392/99), godkjent dato 08/15/2000). Celledetritus ble fjernet fra serum ved sentrifugering ved 14.000 omdreininger per minutt i 5 minutter i en Jouan A-14 mikrosentrifuge. Det klare serum ble overført til et annet rør og inkubert i et vannbad ved 56°C i 1 time for å inaktivere komplement. Dette serum ble lagret i alikvoter ved -20°C inntil bruk.

10

Tabell 1. Seriefortynninger av absorbenter benyttet for absorpsjon av anti-blodgruppe A antistoffer fra sammenslått serum fra blodgruppe O individer

Prøve	Mengde absorbent
1	100 µl A mucinkuler
2	80 µl A mucinkuler, 20 µl geite-anti-mIgG-kuler
3	60 µl A mucinkuler, 40 geite-anti-mIgG-kuler
4	40 µl A mucinkuler, 60 µl geite-anti-mIgG-kuler
5	20 µl A mucinkuler, 80 µl geite-anti-mIgG-kuler
6	100 µl geite-anti-mIgG-kuler
7	150 mg A~PAA~MPG ^a
8	120 mg A-PAA-MPG, 30 mg B-PAA-MPG ^b
9	90 mg A-PAA-MPG, 60 mg B-PAA-MPG
10	60 mg A-PAA-MPG, 90 mg B-PAA-MPG
11	30 mg A-PAA-MPG, 120 mg B-PAA-MPG
12	150 mg B-PAA-MPG
13	Kun serum

^aA-PAA-MPG, A trisakkarider forbundet via poly[N-(2-hydroksyetyl)akrylamid] til makroporøse glasskuler.

15

^bB-PAA-MPG B trisakkarider forbundet via poly[N-(2-hydroksyetyl)akrylamid] til makroporøse glasskuler.

Fem hundre mikroliter serum ble satt til hvert rør og blandet med kulene i 4 timer på et rullebord ved 4°C. Etter absorpsjon ble kulene sentrifugert ned og det absorberte serum

20

overført til nye Ellermanrør. Det absorberte serum ble lagret ved -20°C til ytterligere analyse.

For å bestemme mengden PSFL-1/mIgG_{2b} på A mucinkuler ble en geite-anti-mIgG Fc
 5 ELISA (se prosedyren tidligere) kjørt på supernatanten før og etter inkubering med agarosekuler.

Elisa for kvantifisering av anti-A-antistoffer

10 Nittiseksbrønners ELISA plater (Costar 3590 Corning) ble belagt i 2 timer ved romtemperatur ved 0,05 µl A-PAA-biotin (Syntesom) med 50 µl per brønn av 50 mM karbonatbuffer pH 9,6. Etter blokkering o/n ved 4°C med 300 µl 3% BSA i PBS-T og etterfølgende vasking ble 50 µl serum seriefortynnet i PBS tilsatt og platene inkubert ved romtemperatur i 2 timer. Etter vasking foregikk inkuberingen med 50 µl muse-anti-
 15 human IgA, G og M-HRP (Jackson, PA) fortynnet 1:10.000 i blokkeringsbuffer. Fremkalling og avlesning av platene ble gjennomført som beskrevet tidligere.

Bestemmelse av total proteinkonsentrasjonen i serum

20 Total proteinkonsentrasjon i serum ble bestemt før og etter absorpsjon av anti-A-antistoffer. Mikrotiterplateprotokollen for BCA-protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL) ble benyttet i henhold til produsentens instruksjoner og prøvene ble kjørt i duplikater eller triplikater.

25 Eksempel 2: Blodgruppe H- og A-determinanter på rekombinant PSGL-1/mIgG20 tildannet i forskjellige vertsceller

293T-celler. Immunoaffinitetsrenset PSGL-1/mIgG_{2b}, fremstilt av 293T-celler, transient transfektert med PSGL-1/mIgG_{2b} cDNA med og uten plasmidene som kodet *H*-, *Se*-
 30 eller *A*-genet, ble analysert ved natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) og western blot ved bruk av anti-mIgG, anti-blodgruppe A, H type 1, H type 2 og H type 3 spesifikke antistoffer for detektering (figur 1A-E). Fusjonsproteinet migrerte under reduserende betingelser som en dublett med en tilsynelatende molekyllvekt på rundt 100 og 140 til 160 kDa (A). PSGL-1/mIgG_{2b} farget dårlig med
 35 sølv (ikke vist) i overensstemmelse med tidligere observasjoner med henblikk på overførselen for sterkt glykosylert mucin-type-proteiner (Carraway og Hull, 1991;

Shimizu og Shaw, 1993). Som tidligere vist (Liu *et al.*, 1997) ble fusjonsprotein fremstilt som en homodimer (data ikke vist). Dobbeltbånd rundt 65 kDa og 35 kDa ble detektert med anti-MigG antistoffet. Disse bånd sees ikke i supernatanter av 293T-celler transfektert med tom vektor alene og er således sannsynligvis proteolytiske fragmenter avledet fra fusjonsproteinet (Carraway og Hull, 1991). 47-kDa og 20-kDa båndene som
 5 sees i cellefraksjoner er avledet fra de tunge og lette Ig-kjeder av geite-anti-muse-antistoffet som stammer fra agarosekuler ved koking i prøvebuffer.

Både FUT1 og FUT2 kunne med $\alpha 1,3$ GalNAcT understøtte biosyntesen av blodgruppe A-kjeder på OSGL-1/mIgG_{2b}. Kombinasjonen av FUT1 og $\alpha 1,3$ GalNAcT syntes å
 10 skape flere A-epitoper på PSGL-1/mIgG_{2b} enn kombinasjonen av FUT1 og $\alpha 1,3$ GalNAcT (jamfør disse spor i B). På den annen side understøttet FUT1 alene ekspresjonen av rikelige H type 2 strukturer (D) mens FUT2 ga opphav til få H type 2 epitoper på mucin/Ig (D). Det var ingen detekterbar H type 1 strukturer på PSGL-
 15 1/mIgG_{2b}. H epitopene dannet av FUT2 var basert så å si utelukkende på type 3, dvs. Fuca₂Gal β 3GalNAc-R fordi ingen H type 1 strukturer og få H type 2 strukturer ble dannet på PSGL-1/mIgG_{2b} av dette enzym (E). Interessant ga ko-transfeksjonen av både H- og Se-genetet med A-gen opphav til rikelige epitoper på PSGL-1/mIgG_{2b}, reaktive med anti-H type 3 antistoff (E). Blodgruppe A, H type 2 og 3 epitoper var hovedsakelig
 20 O-bundet fordi peptid N-glykosidase F (PNGaseF) behandling av PSGL-1/mIgG_{2b} ikke reduserte antistoffarging ved bruk av antistoffer spesifikke for disse epitoper (figur 2B-D). Effektiv N-glycandeglykosylering ble indikert ved et fullstendig mobilitetsskift av PSGL-1/mIgG_{2b} (figur 2A-D).

COS-celler. Western blot analyser PSGL-1/mIgG_{2b} foretatt i COS-celler er vist i figur 3A-E. Selv om de er svakere var mønstrene av PSGL-1/mIgG_{2b} farging ved bruk av anti-A og H-spesifikke antistoffer noe like det som ble funnet for PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i 293T-celler. Både FUT1 og FUT2 kunne sammen med $\alpha 1,3$ GalNAcT understøtte A epitopekspresjon der flere epitoper ble dannet av FUT2 og $\alpha 1,3$
 30 GalNAcT (B). Kun FUT1 kunne danne H type 2 strukturer (D) og verken FUT1 eller FUT2 understøttet ekspresjon av H type 1 strukturer i COS-celler (C). I motsetning til PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i 292T-celler ble meget lave nivåer av H type 3 epitoper sett på PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i COS-celler som ko-uttrykte FUT1 og $\alpha 1,3$ GalNAcT, eller FUT2 enzym alene (E).

Imidlertid ga den felles ekspresjonen av FUT2 og α 1,3 Ga1NAcT opphav til øket reaktivitet med H type 3 antistoff (E). Videre ble svake bånd sett med anti-A-antistoff når kun α 1,2 FT'er ble uttrykt, noe som antydte en svak endogen aktivitet for et α 1,3 Ga1NAcT i COS-celler som rapportert tidligere (Clarke og Watkins, 1999). PNGaseF
 5 behandling av PSGL-1/mIgG_{2b} viste ikke noen detekterbar reduksjon i anti-blodgruppe A, H type 2 eller 3 antistofffarging (data ikke vist), noe som antyder at disse epitoper hovedsakelig bæres på PSGL-1/mIgG_{2b} O-glykaner.

Kinesisk hamserovarie(CHO)-celler. Figurene 4A-E viser fargingen av PSGL-
 10 1/mIgG_{2b}fremstilt i CHO-celler, PSGL-1/mIgG_{2b} båret blodgruppe A-epitop fulgt av ko-fremstilling av FUT1 eller FUT2 cDNA'er med α 1,3 Ga1NAcT (B). Verken H type 1 (C) eller H type 2 (D) strukturer kunne detektere på PSGL-1/mIgG_{2b} kimære fremstilt i CHO-celler etter ko-transfeksjon med enten FUT1 eller FUT2, noe som antyder at H type 3 strukturer er de eneste forløpere som er tilgjengelige for α 1,3 Ga1NAcT. Farging
 15 med anti-H-type 3 antistoff ble sett både med FUT1 og FUT2 (B), noe som understøtter den teori at A-epitopene er basert kun på kjerne 1 strukturer i CHO-celler. Videre støtte for dette ble oppnådd etter pNGaseF behandling som ikke påvirket antistofffargingsintensiteten, noe som antyder en O-glykanavgrenset A-epitopekspresjon (data ikke vist). Antallet A-epitoper og H type 3 epitoper på PSGL-1/mIgG_{2b} i kimære
 20 var klart høyere med FUT2 sammenliknet med FUT1, noe som antyder at *Se*-genprodukt er overlegent *H*-genprodukt uttrykt ved α 1,2-fukosylering av kjerne 1 (Gal β 3Ga1NAc α -Ser/Thr) strukturer.

Eksempel 3: Relativ blodgruppe A-epitopdensitet på PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i 25 forskjellige vertsceller

For å semikvantifisere det relative antall av A-epitoper på PSGL-1/mIgG_{2b} kimære fremstilt i forskjellige vertsceller som uttrykker A-gen med en eller annen av α 1,2 FT'ene, ble det benyttet western blotting med anti-A-antistoffer og anti-mIgG-
 30 antistoffer fulgt av kjemiluminescens detektering i en "Fluor-S Max MultiImager". Forholdene mellom blodgruppe A- og mIgG-reaktivitene for hver PSGL-1/mIgG_{2b} er vist i figur 5 (et av tre representative eksperimenter vist). Som det kan ses var A-epitopdensiteten høyest på PSGL-1/mIgG_{2b} fremstilt i CHO-celler som uttrykker A-genet sammen med det *Se*-genkodete α 1,2 FT. Denne PSGL-1/mIgG_{2b} bar omtrent tre
 35 ganger flere A-epitoper enn den PSGL-1/mIgG_{2b} som var laget i 292T-celler transfektert med FUT2 og A-genet; PSGL-1/mIgG_{2b} med den nest høyeste A-

epitopdensitet (figur 5). I hver cellelinje ga FUT2 med høyere A-epitopdensitet sammen med A-genet enn FUT1 gjorde sammens med A-genet.

Eksempel 4: Absorpsjon av anti-A-antistoffer på PSGL-1/mIgG_{2b} som bærer blodgruppe A-epitoper

Effektiviteten for anti-A-antistoffabsorpsjon for rekombinant PSGL-1/mIgG_{2b} med eller uten blodgruppe A-epitoper ble sammenliknet med den for absorpsjon på A-trisakkarider forbundet via poly[N-(2-hydroksyetyl)akrylamid] til makroporøse glasskuler (A-PAA-MPG). Pre- og postabsorpsjon anti-A-antistoffnivåene ble bedømt i en enzymbundet immunosorbentanalyse (ELISA) der platen ble belagt med A-trisakkarider bundet til poly[N-(2-hydroksyetyl)akrylamid] også substituert med biotin (A-PAA-biotin). Resultatene vist i figur 6. Tyve p-mol rekombinante A-epitopsubstituerte PSGL-1/mIgG_{2b} var nødvendig for å absorbere 60% av anti-A-antistoffene som detektert i A-PAA-biotin ELISA mens 164.000 p-mol av A-determinanter som A-PAA-MPG var nødvendig for å absorbere samme mengde anti-A-antistoffer. PSGL-1/mIgG_{2b} dimeren hadde 106 potensielle O-forbundne glykosyleringssteder og åtte potensielle N-forbundne glykosyleringssteder (Wilkins *et al.*, 1996; Aeed *et al.*, 1998, 2001), hvorav de siste åtte kan bære forgrenede strukturer. Hvis man antar at hver PSGL-1/mIgG_{2b} bærer rundt 100 A-epitoper, noe som mest sannsynlig er et overestimat, er mucinfremstilt i CHO-celler med FUT2 og α 1,3GalNAcT rundt 80 ganger mer effektiv som en karbohydrat molarbasis enn A-PAAF-MPG.

Eksempel 5: Terapi eller prevensjon av antistoffmediert Graft-rejeksjon

Oragantransplantasjon på tvers av ABO-barrieren karakteriseres ved AMR-mediert av på forhånd dannede eller induserte antistoffer mot donororganblodgruppen (Porter, 1963; Sanchez Urdazpal *et al.*, 1993; Farges *et al.*, 1995; Tanabe *et al.*, 1998; Alkhunaizi *et al.*, 1999). Anti-ABO-antistoffer fjernes ved bruk av et PSGL-1/mIgG_{2b} fusjonsprotein som bærer A-determinanter som absorberer i EIA-oppsettet. Resultater viser at rundt 20 p-mol rekombinant PSGL-1/mIgG_{2b} (beregnet på en molekylvekt på 300 kDa), tilsvarende 2 n-mol av A-determinanter (basert på 100 A-determinanter permol PSGL-1/mIgG_{2b}) (Wilkins *et al.*, 1996; Aeed *et al.*, 1998, 2001) fremstilt i CHO-K1 med FUT2 og α 1,3 GalNAcT kunne absorbere 60% av de A-PAA-reaktive antistoffer. A-PAA-MPG tilsvarende rundt 164.000 p-mol A-trisakkarider (beregnet på

2 $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$) var nødvendig for å absorbere den samme mengde av anti-A-stoffer. Mengden ikke-spesifikk proteinabsorpsjon for begge forbindelser ble også bedømt og den ikke-spesifikke absorpsjon var så å si fire ganger høyere med PAA-MPG-baserte forbindelser. Den relativt høye absorpsjonseffektivitet for mucinbaserte absorbere kan
 5 avhenge av (1) multivalent karbohydratsubstituerings, (2) nær avstand mellom karbohydratepitopene, og (3) en strukturell bevegelighet for kjernesakkaridkjeden som bærer den immunodominante determinant. Videre kan endring av proteinryggraden, for eksempel ved å tildanne et syntetisk mucintypeprotein konstruert ved optimaliserte mucin tandemgjentakelser, forbedre absorbereren (Silverman *et al.*, 2001). Videre kan
 10 celler som er konstruert for å uttrykke forskjellige kombinasjoner av Ga1NAc:polypeptidtranser forbedre absorpsjonseffektiviteten ved optimalisere O-glykansubstitusjonsdensiteten.

FORKORTELSER

15 AMR, antistoffmediert reaksjon (avvisning); BSA, bovint serumalbumin; Kinesisk hamserovarie; COS,; ETA, ekstrakorporeal immunoabsorpsjon; ELISA, enzymforbundet immunosorbent analyse; FT, fukosyltransferase; Ga1NAcT, N-acetylgalaktosaminyltransferase; HRP, pepperrotperoksidase; mIgG, muse-IgG;
 20 mIgM, muse-IgM; MPG, makroporøse glasskuler; PAA, poly[N-(2-hydroksyetyl)akrylamid]; PBS, fosfatbufret saltoppløsning; PBS-T, PBS med 0,05% Tween; PCR, polymerasekjedereaksjon; PNGaseF, peptid:N-glykosidase F; PP, plasmaferese; PSGL-1, P-slektin glykoprotein ligand-1; SDS-PAGE, natriumdodecylsulfatpolyakrylamidgelelektroforese; TBS-T, Tris-bufret saltoppløsning
 25 med 0,05% Tween-20; Tx, transplantasjon.

REFERANSER

- Aeed, P.A., Geng, J.G., Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., and Elhammer, A.P. (1998) Characterization of the O-linked oligosaccharide structures on P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). *Glycoconj. J.*, 15,975.
- 30 Aeed, P.A., Geng, J.O., Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., and Elhammer, A.P. (2001) Partial characterization of the N-linked oligosaccharide structures on P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1). *Cell, Res.*, 11,28.

Alklumaizi, AM., de Mattos, A.M., Bariy, J.M., Berniett, W.M., and Noiman, D.J. (1999) Renal transplantation across the ABO barrier using A2 kidneys. *Transplantation*, **67**,1319.

Benjamin, R.J. and Antin, J.H. (1999) ABO-incompatible bone marrow
5 transplantation: the transfusion of incompatible plasma may exacerbate regimen-related toxicity. *Transfusion*, **39**, 1273.

Benjamin, R.J., McGurk, S., Ralston, M.S., Churchill, W.H., and Antin, J.H. (1999) ABO incompatibility as an adverse risk factor for survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion*, **39**,179.

10 Bensinger, W.I. (1981) Plasma exchange and immunoadsorption for removal of antibodies prior to ABO incompatible bone marrow transplant. *Artif Organs*, **5**,254.

Bensinger, W.I., Baker, D.A., Buckner, C.D., Clift, R.A., and Thomas, E.D. (1981a) Immunoadsorption for removal of A and B blood-group antibodies. *N. Engl. J. Med.*, **304**, 160.
15

Bensinger, W.I., Baker, D.A., Buckner, C.D., Clift, R.A., and Thomas, E.D. (1981b) In vitro and in vivo removal of anti-A erythrocyte antibody by adsorption to a synthetic immunoadsorbent. *Transfusion*, **21**, 335.

Bensinger, W.I., Buckner, C.D., Baker, D.A., Clift, R.A., and Thomas, E.D. (1982) Removal of specific antibody in vivo by whole blood immunoadsorption: preliminary results in dogs.). *J. Clin. Apheresis*, **1**,2.
20

Bensinger, W.I., Buckner, C.D., Clift, R.A., and Thomas, E.D. (1987) Plasma exchange and plasma modification for the removal of anti-red cell antibodies prior to ABO-incompatible
25 marrow transplant.). *J. Clin. Apheresis*, **3**, 174.

Betteridge, A. and Watkins, W.M. (1985) Variant forms of alphaL, 2fucosyltransferase in human submaxillary glands from blood group A₁BH "secretor" and "non-secretor" individuals. *Glycoconj. J.*, **2**,61.

Beyer, T.A., Sadler, I.E. and Hill, R.L. (1980) Purification to homogeneity of H blood group beta-galactoside alpha 1 leads to 2 fucosyltransferase from porcine submaxillary gland.). *J. Biol. Chem.*, **255**, 5364.

Carraway, K.L. and Hull, S.R. (1991) Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobwhg*), **1**, 131.

Clarke, J.L. and Watkins, W.M. (1999) Expression of human alpha-1-fucosyl-transferase gene homologs in monkey kidney COS cells and modification of potential fucosyltransferase acceptor substrates by an endogenous glycosidase. *Glycobiology*, **9**,191.

Clausen, H. and Hakomori, S. (1989) ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in earner isotypes and their distribution. *Vox. Sang.*, **56**,1.

Cooper, D.K., Ye, Y., Niekrasz, M., Kehoe, M., Martin, M., Neethling, F.A., Kosanke, S., DeBault, L.E., Worsley, G., Zuhdi, N., and others. (1993) Specific intravenous carbohydrate therapy. A new concept in inhibiting antibody-mediated rejection-experience with ABO-incompatible cardiac allografting in the baboon. *Transplantation*, **56**, 769.

Donald, A. S. (1981) A-active trisaccharides isolated from A1 and A2 blood-group-specific glycoproteins. *Ew. J Biochem.*, **120**, 243,

Eid, A., Zamir, G., Yaron, I., Gal tin, E., Safadi. R., Schaaps, 1., Berlatzky, V., Shouval, D., and iurim, 0. (1998) Liver transplantation across the ABO barrier: the role of plasmapheresis. *Transplant Proc.*, **30**, 701.

Ernst, L.K., Rajan, V.P., Larsen, RD., Ruff, M.M., and Lowe, J.B. (1989) Stable expression of blood group H determinants and GDP-L-fucose: betaD-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase in mouse cells after transfection with human DNA. *J. Biol. Chem.*, **264**, 3436.

Fargea,O., Kalil,A.N.,Samuel,D.,Saliba,F.,Anjlnaden,i.L., Debat,P., Bismuth,A., Castaing, D., and Bismuth, H. (1995) The use of ABO-incompatible grafts in liver transplantation: a life-saving procedure in highly selected patients. *Transplantation*, **59**,1124.,

Gale, R.P., Feig, S., Ho, W., Falk, P., Rippee, C., and Sparkes, R. (1977) ABO blood group system and bone marrow transplantation. *Blood*, **50**, 185.

Galili, U. and Matta, K.L. (1996) Inhibition of anti-Gal IgG binding to porcine endothelial cells by synthetic oligosaccharides. *Transplantation*, **62**, 256.

5 Gibbons, R.D., Meltzer, I.X., and Duan, N. (2000) Waiting for organ transplantation. Institute of Medicine Committee on Organ Transplantation. *Science*, **287**, 237.

Gugenheim, J., Samuel, D., Reynes, M., and Bismuth, H. (1990) Liver transplantation across A130 blood group barriers. *Lancet*, **336**, 519.

10 Hakomori, S. (1999) Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 247.

Holgersson, J., Breimer, M.E., and Samuelsson, B.E. (1992) Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphingolipids. *APM'Suppl.*, **27**, 18.

15 Ishikawa, A., Itoh, M., Ushlyama, T., Suzuki, K., and Fujita, K. (1998) Experience of ABO-incompatible living kidney transplantation after double filtration plasmapheresis. *Clin. Transplant.*, **12**, 80.

20 Kelly, R., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., and Lowe, J.B. (1995) Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha (1, 2)fucosyltransferase gene (FLJT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *Biol. Chem.*, **270**, 4640.

Kumazaki, T. and Yoshida, A. (1984) Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 4193.

25 Kyprianou, P., Betteridge, A., Donald, A.S., and Watkins, W.M. (1990) Purification of the blood group H gene associated alpha-2-L-fucosyltransferase from human plasma. *Glycoconj. J.*, **7**, 573.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 14. *Nature*, **227**, 680.

- Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P., and Lowe, J.B. (1990) Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L- fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**,6674.
- 5 Le Pendu, I., Cartron, J.P., Lemieux, R.U., and Oriol, R. (1985) The presence of at least two different H-blood-group-related beta-D-gal alpha-2-L-fuco-syltransferases in human serum and the genetics of blood group H substances. *Am. J. Hum. Genet.*, **37**,749.
- Liu, J., Qian, Y., and Holgersson, I. (1997) Removal of xenoreactive human anti-pig antibodies by absorption on recombinant mucin-containing glycoproteins carrying the Gal alpha1, 3Gal epitope. *Transplantation.*, **63**, 1673.
- 10 Liu, Y., Fujitani, N., Koda, V., Soejima, M., and Kimura, H. (1999) Presence of H type 3/4 chains of ABO histo-blood group system in serous cells of human submandibular gland and regulation of their expression by the secretor gene (FUT2) *J. Histochem. Cytochem.*, **47**,889,
- 15 Liu, V. H., Fujitani, N., Koda, V., and Kimura, H. (1998) Distribution of H type I and of H type 2 antigens of ABO blood group in different cells of human submandibular gland.). *J. Histochem. Cytochem.*, **46**,69.
- Lowe, I. B. (1999) Structures common to different types of glycans. In Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., eds., *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 211-252.
- 20 Porter, K.A. (1963) Morphological aspects of renal homograft rejection. *Br. Med. Bull.*, **21**, 171.
- Prieto, P.A., Larsen, R.D., Cho, M., Rivera, H.N., Shlatifard, A., Lowe, J.B., Cummings, R.D., and Smith, D.F. (1997) Expression of human H-type alpha1, 2-fucosyltransferase encoding for blood group H(0) antigen in Chinese hamster ovary cells. Evidence for preferential fucosylation and truncation of polylactosamine sequences.). *J. Biol. Chem.*, **272**,2089.
- 25 Prieto, P.A., Mukerji, P., Kelder, B., Emey, R., Gonzalez, D., Yun, J.S., Smith, D.F., Moremen, K.W., Nardelli, C., Pierce, J.H., and others. (1995) Remodeling of mouse milk
- 30

glycoconjugates by transgenic expression of a human glycosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **270**,29515.

Rajan, V.P., Larsen, RD., Ajmera, S., Ernst, L.K., and Lowe, J.B. (1989) A cloned human DNA restriction fragment determines expression of a GDP- L-fucose: beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase in transfected cells. Evidence for isolation and transfer of the human H blood group locus. *J. Biol. Chem.*, **264**,11158.

Rieben, R., Korchagina, E.Y., von AHmen, E., Hovinga, i.K., Lammle, B., iungi, T.W., Bovin, N.y., and Nydegger, U.E. (1995) In vitro evaluation of the efficacy and biocompatibility of new, synthetic ABO immunoabsorbents. *Transplantation*, **60**,425.

Rouquier, S., Lowe, J.B., Kelly, Ri.. Fertitta, AL., Lennon, G.G., and Giorgi. D. (1995) Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(I, 2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus.). *J. Biol. Chem.*, **270**,4632,

Sanchez-Urdazpal, L., Batts, K.P., Gores, G.L, Moore, S.B, Sterioft, S., Wiesner, R.H., and Krom, R.A. (1993) Increased bile duct complications in liver transplantation across the ABO barrier. *Ann Surg.*, **218**,152.

Sarnesto, A., Kohlin, l., Hindsgaul, O., Thurin, J., and Blaszczyk-Thurin, M. (1992) Purification of the secretor-type beta-galactoside alpha 1-2-fucosyltransferase from human serum.). *J. Biol. Chem.*, **267**, 2737.

Sarnesto, A., Kohlin,T., Thurin, i., and Blaszczyk-Thurin, M. (1990) Purification of H gene-encoded beta-galactoside alpha 1-2 fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.*, **265**,15067.

Seed, B. (1987) An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature*, **329**, 840.

Shirm'zu, V. and Shaw, S. (1993) Cell adhesion. Mucins in the mainstream. *Nature*, **366**,630.

Silverman, U.S., Parry, S., Sutton-Smith, M., Burdick, M.D., McDermott, K., Reid, C.J., Batra, S.K., Moms, H.R., Hollingsworth, M.A., Dell, A., and Harris. A. (2001) In vivo glycosylation of mucin tandem repeats. *Glycobiology*, **11**,459.

- Simon, P.M., Neethling, F.A., Taniguchi, S., Goode, P.L., Zopf, D., Hancock, W.W. and Cooper, D.K. (1998) Intravenous infusion of Gal α 1-3Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts. *Transplantation*, **65**, 346.
- 5 Takasaki, S., Yamashita, K., and Kobata, A. (1978) The sugar chain structures of ABO blood group active glycoproteins obtained from human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6086.
- Tamaki, T., Tanaka, M., Katori, M., Osanai, M., Yasuhara, M., Meguro, i, Kukita, K., Yonekawa, M., and Kawamura, A. (1998) Cryofiltration apheresis for major ABO-
10 incompatible kidney transplantation. *Ther. Apher.*, **2**, 308.
- Tanabe, K., Takahashi, K., Sonda, K., Tokumoto, I., Ishikawa, N., Kawai, T., Fuchinoue, S., Oshima, I., Yagisawa, I., Nakazawa, H., and others. (1998) Long-term results of ABO-incompatible living kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation*, **65**, 224.
- 15 Wilkins, P.P., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1996) Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18732.
- Yamamoto, F., Clausen, H., White, I., Marken, J., and Hakomori, S. (1990) Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, **345**, 229.
- Ye, V., Niekraz, M., Kehoe, M., Rolf, L.L. Jr., Martin, M., Baker, J., Kosanke, S.,
20 Romano, E., Zuhdi, N., and Cooper, D.K. (1994) Cardiac allotransplantation across the ABO-blood group barrier by the neutralization of preformed antibodies: the baboon as a model for the human. *Lab. An. Jim. Sci.*, **44**, 121.
- Yeh, J.C., Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Elies, L.G., Rabuka, D., Hindsgaul, O., Marth, I.D., Lowe, I.B., and Fukuda, M. (2001) Novel sulfated lymphocyte
25 homing receptors and their control by a core 1 extension beta I, 3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell*, **105**, 957.
- Zerfaoui, M., Fulcoda, M., Sbarra, V., Lombardo, D., and El-Battari, A. (2000) Alpha(1, 2)-fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VH-transfected cells. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 53.

P a t e n t k r a v

1.

Fusjonspolypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et
5 første polypeptid operativt forbundet til et andre polypeptid, der det første polypeptid:

(a) er et mucinpolypeptid; og

(b) hvori mucinpolypeptidet er glykosylert med en blodgruppe H- eller sekretor
 α 1,2 fukosyltransferase og en α 1,3 N-acetylgalaktosaminytransferase; og
det andre polypeptidet omfatter minst ett Fc område av et

10 immunoglobulinpolypeptid.

2.

Fusjonspolypeptid ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
det første polypeptid omfatter minst et område av en P-selektiv glykoproteinligand-1.

15

3.

Fusjonspolypeptid ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
det første polypeptid inkluderer en ekstracellulær del av en P-selektiv glykoprotein
ligand 1.

20

4.

Fusjonspolypeptid ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
fusjonspolypeptidet er en dimer.

25

5.

Absorber, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter
fusjonspolypeptidet ifølge krav 1.

6.

30 Fremgangsmåte for å fjerne et antistoff fra en biologisk prøve, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at den omfatter

(a) å bringe en biologisk prøve i kontakt med fusjonspolypeptidet ifølge krav 1
for å danne et fusjonspolypeptid-antistoff kompleks; og

(b) å fjerne komplekset fra den biologiske prøve for derved å fjerne antistoffet
35 fra den biologiske prøven.

7.

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er konstruert genetisk for å uttrykke fusjonspolypeptidet ifølge krav 1.

5 8.

Celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

- (a) en nukleinsyre som koder et mucinpolypeptid operativt forbundet til en nukleinsyre som koder minst et område av et immunoglobulinpolypeptid,
- (b) en nukleinsyre som koder et blodgruppe H- eller sekretor α 1,2 fukosyltransferase polypeptid; og
- 10 (c) en nukleinsyre som koder et α 1,3 N-acetylgalaktosaminyltransferase polypeptid.

9.

- 15 Celle ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellen er en COS-celle, en CHO-celle eller en 293T-celle.

1/5

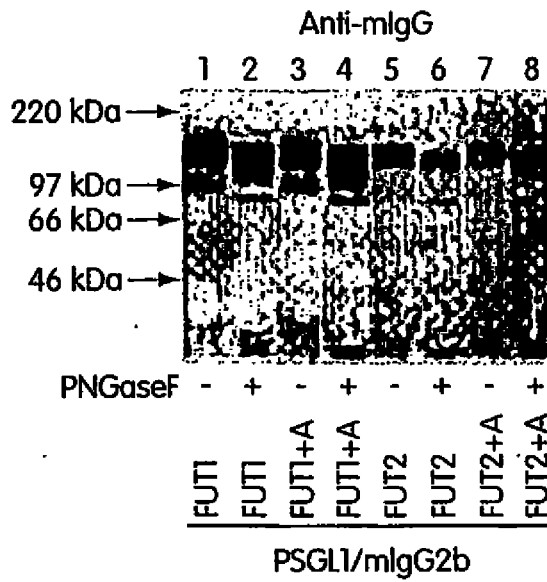


Fig. 1A

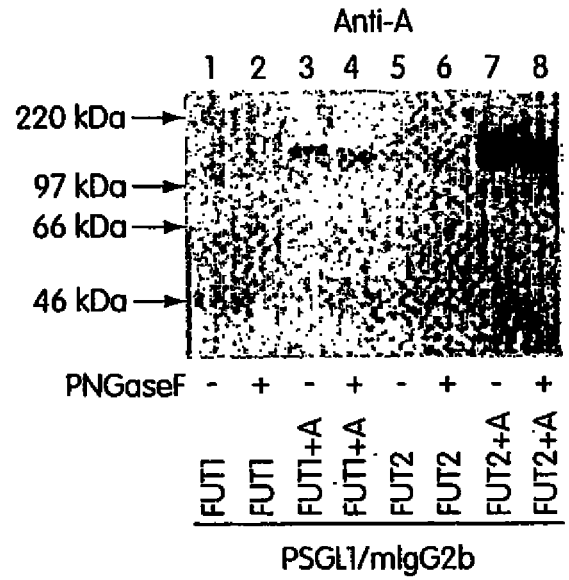


Fig. 1B

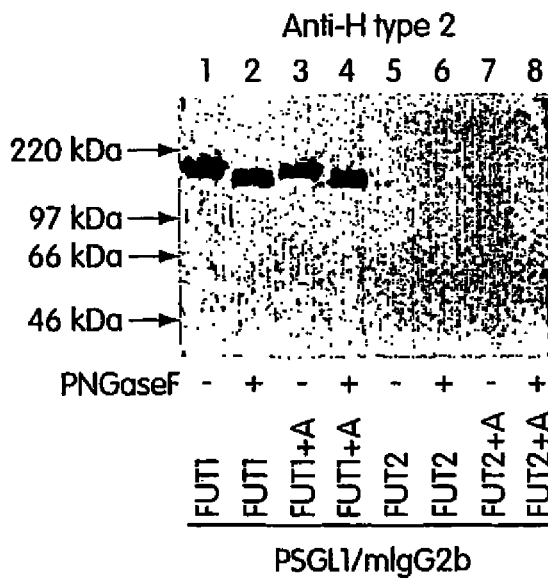


Fig. 1C

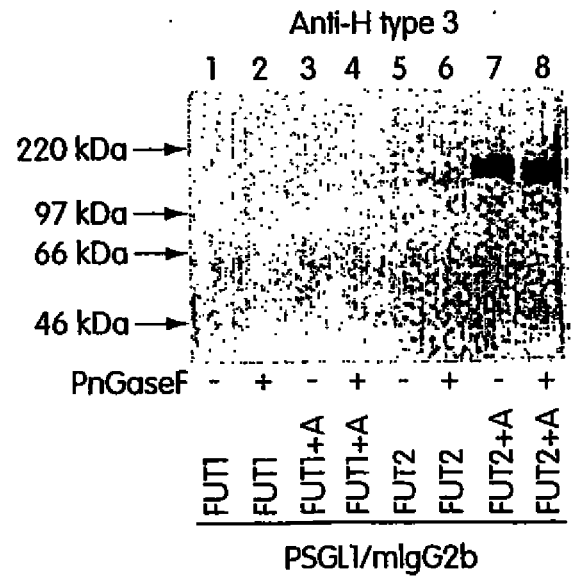


Fig. 1D

2/5

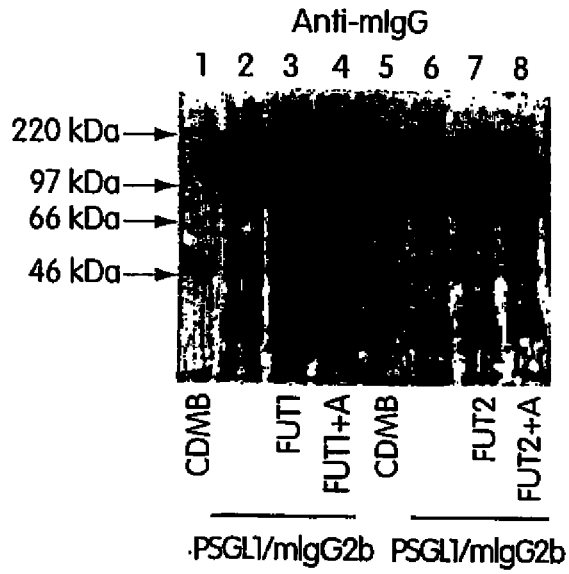


Fig. 2A

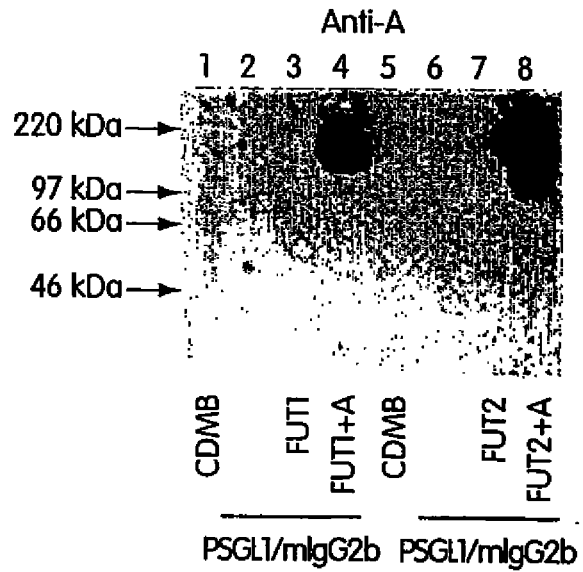


Fig. 2B

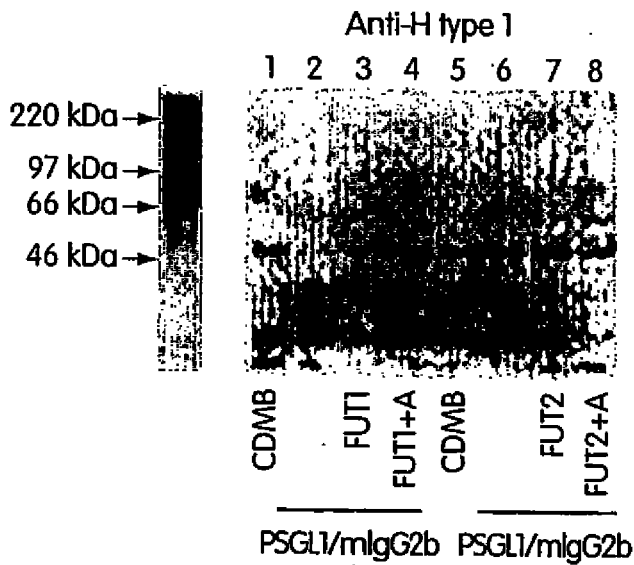


Fig. 2C

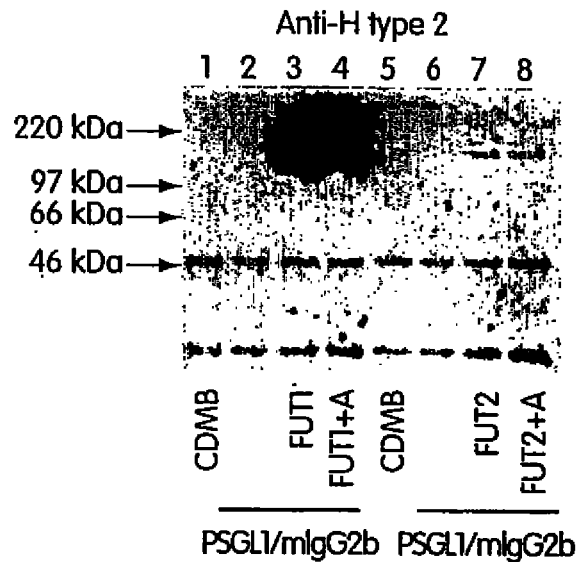


Fig. 2D



Fig. 2E

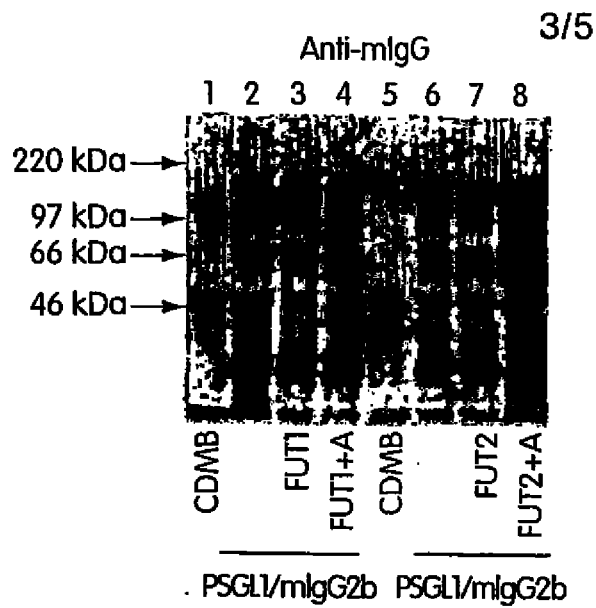


Fig. 3A

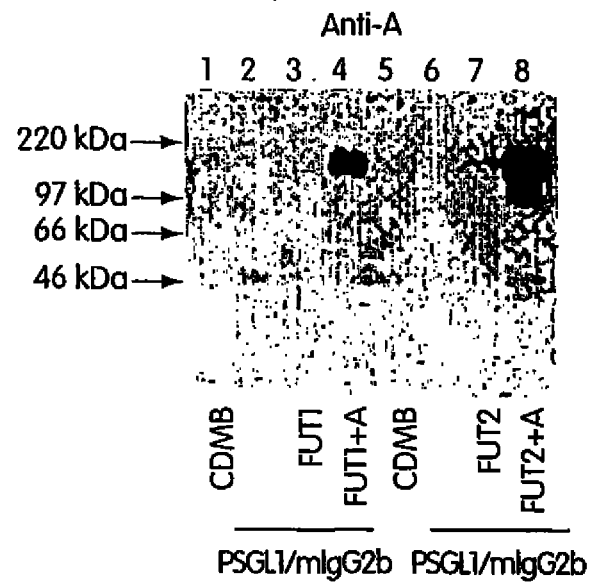


Fig. 3B

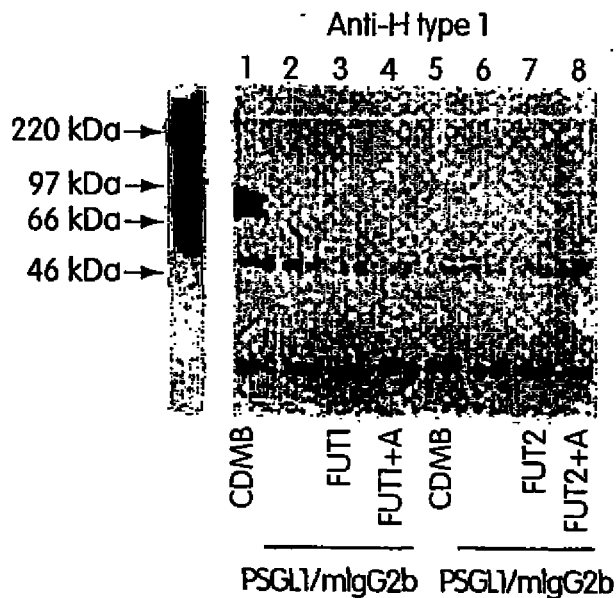


Fig. 3C

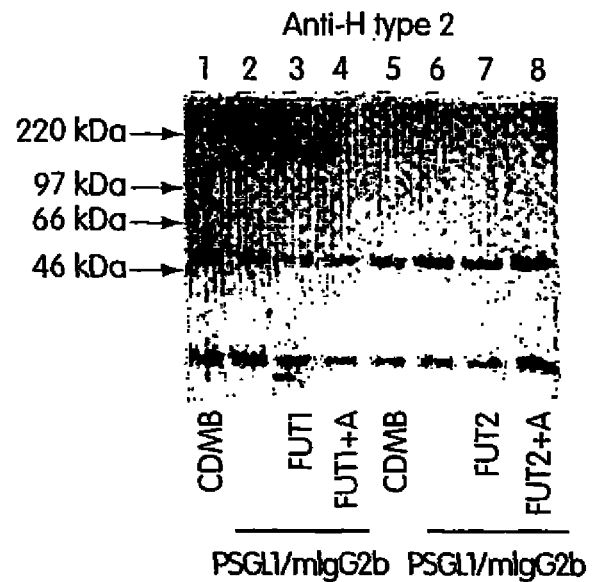


Fig. 3D

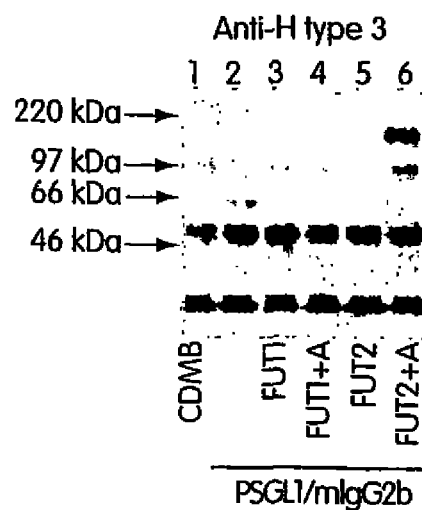


Fig. 3E

4/5

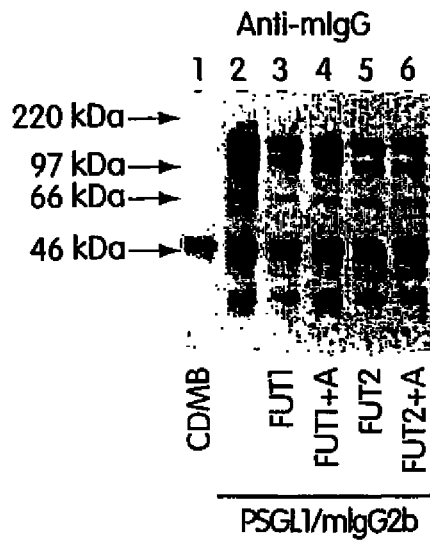


Fig. 4A

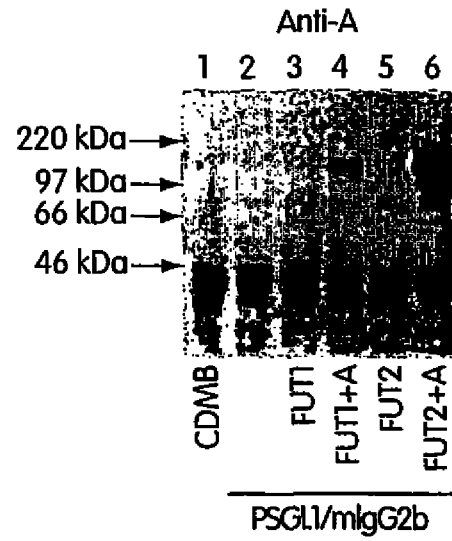


Fig. 4B

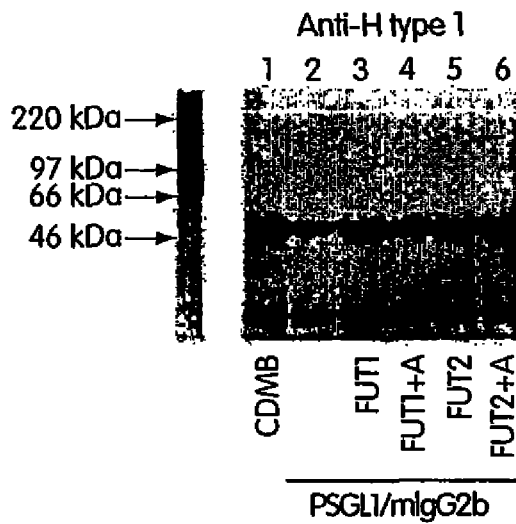


Fig. 4C

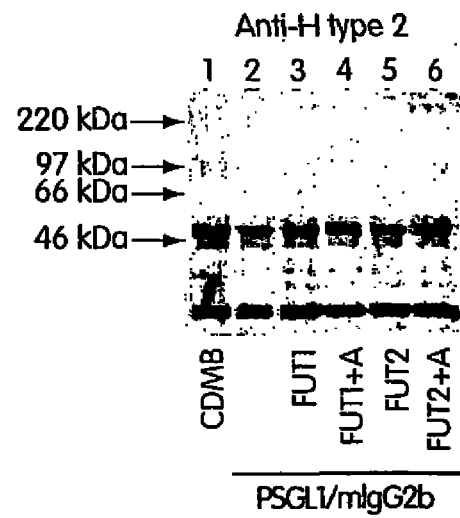


Fig. 4D

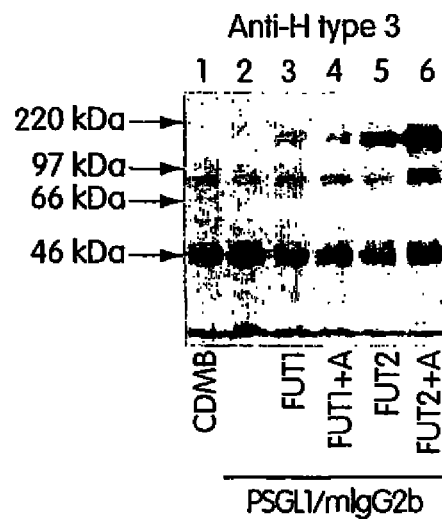


Fig. 4E

5/5

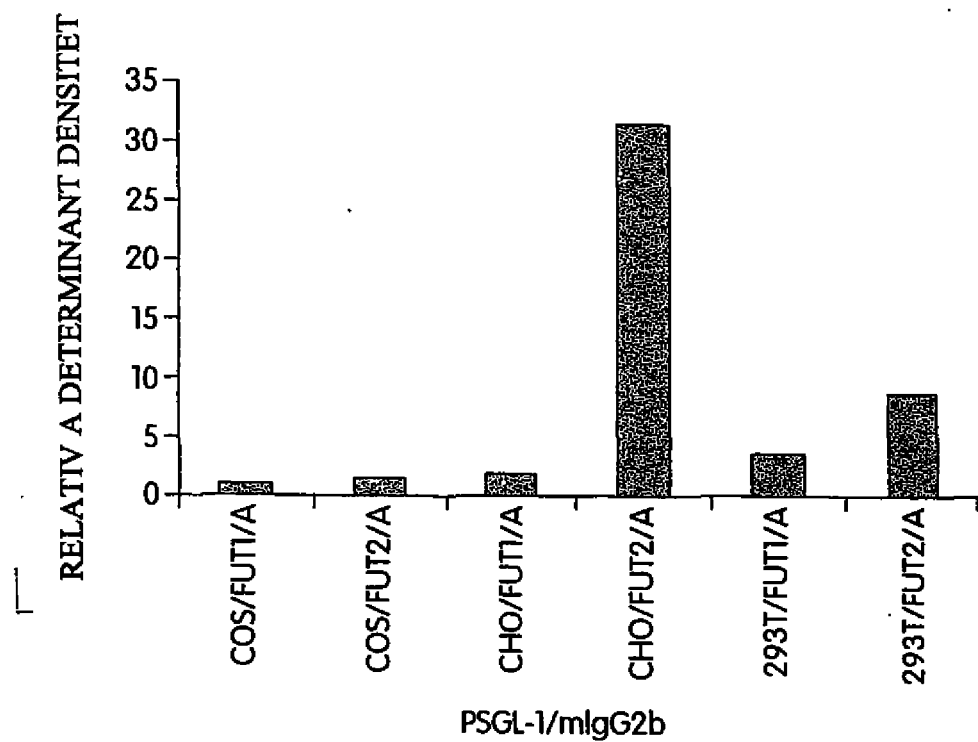


Fig. 5

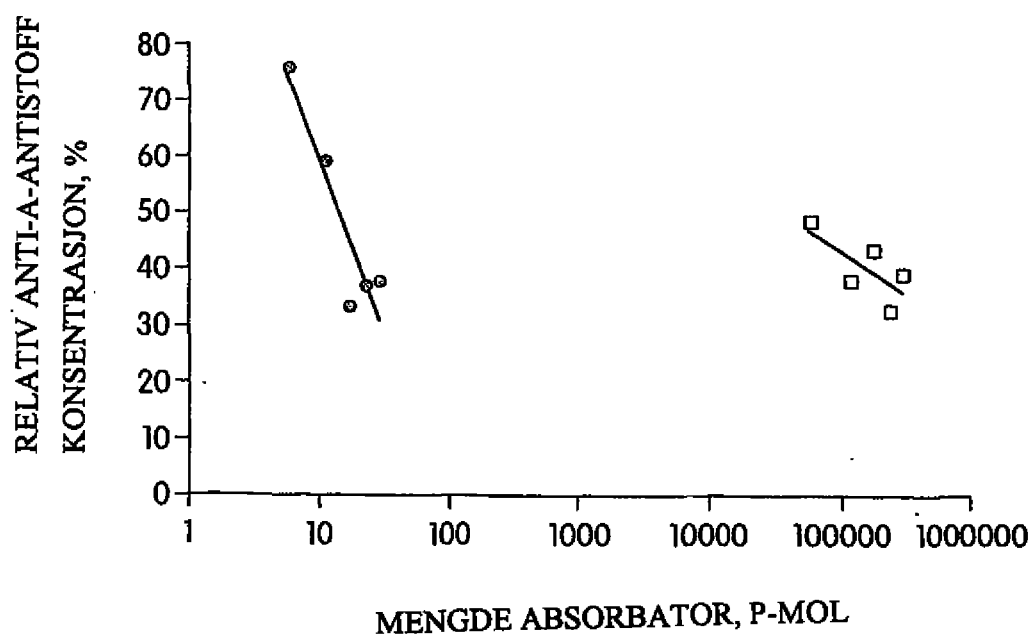


Fig. 6