



F10000942588



**SUOMI-FINLAND**  
(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLAGGNINGSSKRIFT** 94258

C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 10 08 1995

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

C 12N 5/18, C 07K 16/18, A 61K 39/395

(21) Patentihakemus - Patentansöknung	900630
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	08.02.90
(24) Alkupäivä - Löpdag	08.06.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	08.02.90
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.04.95
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/US89/02521
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
08.06.88 US 204168 P	14.06.88 US 206610 P

(71) Hakija - Sökande

1. Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, Tex. 77030, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Emery, Jared M., 2343 Underwood Boulevard, Houston, Tex. 77030, USA, (US)  
2. Lam, Dominic M.-K., 9 East Wedgewood Glen, The Woodlands, Tex. 77380, USA, (US)  
3. Kelleher, Peter J., 6 North Waxberry Road, The Woodlands, Tex. 77381, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Keijo Heinonen Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä linssin epiteelisoluihin olennaisesti spesifisesti sitoutuvan sytotoksisen koostumuksen valmistamiseksi ja menetelmä siinä käytettävän monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi**  
**Förfarande för framställning av en cytotoxisk sammansättning som kan bindas väsentligen specifikt till linsepitelceller och förfarande för framställning av en monoklonal antikropp använd härvid**

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: HB 9343 ATCC  
HB 9747 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 874852 (A 61K 39/395)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö käsittää sytotoksiset koostumukset ja menetelmät niiden käyttämiseksi linssin jäännösepiteelisolujen lisäkasvun estämiseen kotelonulkoisen poiston jälkeen. Sytotoksiset koostumukset sisältävät monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä linssin epiteelisoluille, ja jotka viedään silmän etukammioon, jossa ne sitoutuvat spesifisesti linssin epiteelisoluihin. Menetelmää voidaan käyttää kotelonulkoisen harmaakaihin poiston aikana tai sitä voidaan käyttää myöhemmin sekundäärisen harmaakaihin poistamiseksi, joka johtuu linssin jäännösepiteelisolujen lisäkasvusta.

Uppfinningen avser cytotoxiska sammansättningar och metoder att användas för att förhindra tillväxt av linsens restepitelceller efter en extrakapsulär extraktion. De cytotoxiska sammansättningarna består av monoklonala antikroppar specifika för linsens epitelceller, som införs i främre ögonkammaren, där de binder specifikt vid linsens epitelceller. Metoden kan användas vid extrakapsulär extraktion av grå starr eller senare för att avlägsna sekundär grå starr, som förorsakats av tillväxt av linsens restepitelceller.

MENETELMÄ LINSSIN EPITEELISOLUIHIN OLENNAISESTI SPESIFISESTI SITOUTUVAN SYTOTOKSISEN KOOSTUMUKSEN VALMISTAMISEKSI JA MENETELMÄ SIINÄ KÄYTETTÄVÄN MONOKLONAALISEN VASTA-AINEEN VALMISTAMISEKSI

Keksintö koskee menetelmää sytotoksisen koostumuksen valmistamiseksi, joka on käyttökelpoinen linssin jäännösepiteelisolujen lisäkasvun estämisessä, sekä menetelmää koostumuksessa käytettävän monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi.

Kotelonulkoisen harmaakaihin poisto on sopiva menetelmä harmaakaihien poistamiseksi. Tällä tekniikalla sattuu vähemmän leikkauksenjälkeisiä komplikaatioita, kuten rakkulainen täpläturvotus ja verkkokalvon pintakerrosten irtautuminen pigmenttikerroksesta. Se, että on olemassa parannettu kotelonulkoisen poistomenetelmä, kuten mykiön emulgointi, sekä tarve ehjistä taaemmas- ta linssikotelosta monien erilaisten silmänsisäisten linssien istuttamiseksi, ovat edelleen tukeneet kotelonulkoisen harmaakaihin poiston käyttöä mykiösamentumien poistamiseksi.

Kotelonulkoista linssinpoistoa seuraa merkittävä taaemman linssikotelon samentuminen, joka saattaa vaatia kirurgisia lisätoimenpiteitä, kuten taaemman kotelon avausta tai taaemman linssikotelon uudelleen kirkastamista paremman näön saamiseksi. Taaemman linssikapselin samentumisen syntyminen kotelonulkoisen harmaakaihin poiston jälkeen johtuu linssin jäännösepiteelisolujen lisäkasvusta taaemmassa linssikotelossa, jolloin muodostuu lyhentyneitä linssin "kuituja" ja "rakkomaisia" soluja ("Elschingin helmet").

Sekundäärisen harmaakaihin muodostumisen estämiseksi on käytetty useita erilaisia menetelmiä. Roy et al., Contact and Intraocular Lens Medical Journal (1979) 5:175-178 esitti vinkristiinin ja vinblastiinin käytön keinona estää linssin solujen lisäkasvua. Säteilytyshoitoa on myös kokeiltu, ja sen on raportoitu olevan lupaavaa. Metotreksaatin ja retinoidihapon tiputusta silmän etukammioon on myös kokeiltu estämään taaimmaisen linssikotelon samentumista. Näiltä hoitomenetelmiltä kuitenkin puuttuu spesifisyys; ne eivät tee eroa linssin epiteelisolujen ja muun

tyyppisten solujen välillä, joita on etukammiossa, ja tuloksena näistä hoidoista voivat muut (toivottavat) solut vaurioitua. Sen vuoksi on kiinnostavaa kehittää menetelmiä ja koostumuksia, jotka selektiivisesti tuhoaisivat linssin jäännösepiteelisoluja, jolloin sekundääristen harmaakaihien muodostuminen ja taaemman linssikotelon samentuminen estetään.

#### Asiaankuuluva kirjallisuus

Monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannosta on kuvauksia. Katso esimerkiksi Monoclonal Antibodies, eds. Roger H. Kennett, Thomas J. McKearn, Kathleen B. Bechtol, Plenum Press, New York, 1980; Nature (1975) 256:495-497; US-patentit nro 4,271,145; 4,196,265; 4,172,124; 4,195,125; 4,262,090; ja 4,294,927.

#### Keksinnön yhteenveto

Keksintö antaa käyttöön menetelmän sytotoksisen koostumuksen valmistamiseksi, joka sytotoksinen koostumus on käyttökelpoinen estämään taaemman linssikotelon samentumista kotelonulkoisen harmaakaihin poiston jälkeen, sekä menetelmän koostumuksessa käytettävän monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi.

Keksinnölle on tunnusomaista se mikä on esitetty patenttivaatimusten tunnusmerkkiosassa.

#### Keksinnön kuvaus

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettua koostumusta käytetään siten, että silmän etukammioon viedään alkuperäisen kaihinpoiston aikana tai sen jälkeen keksinnön mukaista sytotoksisista koostumusta, joka on spesifinen linssin epiteelisoluille, ja joka sitoutuu jäljellä oleviin linssin epiteelisoluihin. Sytotoksinen koostumus on siten ainakin oleellisesti spesifinen linssin epiteelisoluille, eikä sillä ole ristireaktiivisuutta muiden solujen kanssa, joita on etukammiossa, kuten sidekudosemosolut, melanosyytit, sarveiskalvon endoteelisolut, jne., mielellään myös muut epiteelisolut, esim. sarveiskalvon epiteelisolut. Edullisesti ennen sytotoksisen koostumuksen viemistä ja ennen kotelonulkoisen harmaakaihin poistoa viedään etukammioon

ei-sytotoksinen aine, jolloin tämä ei-sytotoksinen aine on ristireaktiivinen sytotoksisen koostumuksen kanssa tai sillä on oleellisesti sama sitoutumisspesifisyys, jolloin se sitoutuu mihin tahansa soluihin etukammiossa, jotka ovat kosketuksissa etukammioon, ja joissa on homologinen determinantti tai anti-geenisiiä kohtia.

Sytotoksinen koostumus käsittää monoklonaalisen vasta-aineen, joka pystyy sitoutumaan oleellisen spesifisesti linssin epiteelisoluihin, konjugoituna toksiseen aineeseen. Toksinen aine voi olla johdettu mikro-organismista tai kasvilähteestä. Erityisen kiinnostavia ovat luonnossa esiintyvien toksiinien toksiset alayksiköt, kuten risiini, abriini, kurkkumätätoksiini, jne. Katso esim. Oeltmann and Heath, J. Biol. Chem. (1979) 254:1022-1027; Yule and Neville Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77:5483-5486; Gilliland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:5319-5323; US-patentti nro 4,379,145; GB2034324 ja Masuho et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1979) 90:320-326; ja Blythman, Nature (1981) 290:145, jotka asiaankuuluvat julkaisut on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi.

Kuvaavia toksiini-A-ketjuja tai samalla tavoin tehokkaita osia ovat kurkkumätätoksiinin A-ketjut, entsyymaattisesti aktiiviset fragmentit Pseudomonas aeruginosan eksotoksiini-A:sta, risiinitoksiinin A-ketju, abriinin A-ketju, modekkiinin A-ketju ja proteiinit, joita löytyy eri kasveista, joilla on samanlainen aktiivisuus, kuten esim. kasvit Gelonium multiflorum, Phytolacca americana, Croton tiglium, Jatropha curcas, Momordic charantia, ja vehnänalkio. Erityisen kiinnostava on toksiini saporini kasvista Saponaria officinalis (Thorpe et al., J. Natl. Cancer Inst. (1985) 75:151) ja kasvitoksiini trikosantiini, sekä sukulaisyhdisteet. Myös mutanttilajeja näiden lajien toksiineista voidaan käyttää, kuten CRM45 (Boquet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976) 73:4449-4453).

Menetelmät monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi on hyvin tutkittu. Ne voidaan valmistaa millä tahansa alan ammattimiesten tuntemalla menetelmällä. Erilaisia linssin epiteelisoluja voidaan käyttää immunogeeninä, erityisesti ihmisen linssin epiteelisoluja, vaikka muitakin lajeja voidaan käyttää, esim.

kädellisiä. Koko solut ovat edullisia, mutta homogenaatteja, membraanifragmentteja tai vastaavia voidaan myös käyttää. Solujen lähteitä ovat solut, jotka kasvavat kudosisviljelmässä, tai kudokset, jotka on poistettu kaihileikkauksessa. Niinpä voidaan käyttää suoraan ihmisen linssin epiteelisoluja kudoksista, jotka on poistettu kaihileikkauksessa tai pian kuoleman jälkeen, edullisesti noin 30 minuutin kuluessa kuolemasta, tai solut voidaan säilyttää panemalla kirurgiset näytteet kudosisviljelmään käyttäen tutkittua tekniikkaa.

Tämän keksinnön mukaisesti nisäkäs, mielellään hiiri tai muu pieni nisäkäs, liikaimmunisoidaan immunogeenillä. Immunisaatiomenetelmät ovat hyvin tunnettuja ja niitä on laajasti kuvattu kirjallisuudessa. Immunogeeninen materiaali, yleensä noin  $10^5$  - noin  $10^6$  solua tai soluekvivalenttia, injektoidaan apuaineen kanssa tai ilman apuainetta nisäkkääseen, tai toistuvilla injektioilla suhteellisen lyhyinä ajanjaksoina. Eläimen liikaimmunisaation varmistamiseksi annetaan 2-6 myöhempää tehosteinjektiota. Sitten eläimet tapetaan, tavallisesti 1-5 päivää viimeisen injektion jälkeen. Perna poistetaan, ja pernasolut tehdään kuolemattomiksi, tavallisesti fuusioimalla sopivan luuydinkasvainsolulinjan kanssa.

Solufuusiomenetelmä ei ole kriittinen osa tätä keksintöä ja erilaisia menetelmiä voidaan käyttää. Yleensä fusogeeninä käytetään ei-ionista detergenttiä, esimerkiksi polyetyleeniglykolia (PEG). Pernasolut ja luuydinkasvainsolut yhdistetään ei-ionisen detergentin, mielellään PEG:n ja muiden lisäaineiden, esimerkiksi seerumittoman Dulbeccon modifioidun Eagle's-kasvualustan (SF-DMEM) läsnäollessa, noin 5 minuutin ajan. Ylimääräinen ei-ioninen detergentti poistetaan sitten nopeasti pesemällä solut.

Solut jaetaan sopivasti pieniin viljelykoloihin suhteelliseen pieneen tilavuuteen, joka on alueella noin  $1 \times 10^5$ /kolo - noin  $5 \times 10^5$ /kolo sopivaan kasvualustaan, yleensä selektiiviseen kasvualustaan, joka koostuu hypoksantiinia, aminopteriinistä ja tymidiiniä (HAT) sisältävästä väliaineesta.

Riittävän ajan kuluttua, tavallisesti yhden tai kahden viikon kuluttua, havaitaan hybridipesäkkeitä. Pesäkkeet seulotaan sit-

ten vasta-aineiden suhteen, jotka sitoutuvat spesifisesti lins-  
sin epiteelisoluihin. Jos tarvitaan komplementin kiinnittäviä  
vasta-aineita, pesäkkeet seulotaan lisäksi määrittämään, ovatko  
vasta-aineet kykeneviä kiinnittämään komplementtia. Kun haluttu-  
ja vasta-aineita tuottavat pesäkkeet on identifioitu, pesäkkeet  
voidaan saada säilymään sellaisina, että ne jatkuvasti toimivat  
haluttujen vasta-aineiden lähteenä.

Sellaisten hybridoomasolulinjojen saamiseksi, jotka erittävät  
monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat suuntautuneet yksit-  
täiseen antigeenideterminanttiin, joka liittyy linssin epitee-  
lisoluihin, hybridoomasolut voidaan kloonata käyttäen esimerkik-  
si rajoituslaimennusta. Vaihe, jolloin solut voidaan kloonata,  
ei ole kriittinen keksinnölle, ja voidaan tehdä ennen kiinnos-  
tuksen kohteena olevia vasta-aineita erittävien pesäkkeiden  
identifiointia tai myöhemmin. Vasta-aineita tuottavien solujen  
liikakasvun välttämiseksi vasta-ainetta tuottamattomien solujen  
kanssa pesäkkeet kloonataan edullisesti niin pian fuusion jäl-  
keen kuin se käytännössä on mahdollista.

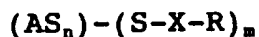
Vasta-aineiden tuottamiseksi suuressa mittakaavassa hybridoomat  
voidaan viedä nisäkkään vatsaonteloon ja kasvattaa askiittikas-  
vaimena. Vasta-aineet voidaan sitten eristää askiittinesteestä.  
Vaihtoehtoisia menetelmiä monoklonaalisten vasta-aineiden tuot-  
tamiseksi suuressa mittakaavassa ovat ihonalaisten kasvainten  
indusoiminen käyttäen edellä kuvattua menetelmää ja veren otta-  
minen eläimeltä. Hybridoomasolut voidaan myös kasvattaa suuressa  
mittakaavassa kudosviljelmässä. Silloin kun solut erittävät vas-  
ta-aineita kasvualustaan, voidaan vasta-aineita sisältävä tasa-  
painotettu kasvualusta kerätä vasta-aineiden eristämistä varten.  
Kun hybridoomasolut eivät eritä vasta-aineita, solut voidaan  
kerätä, hajottaa käyttäen tavallisia menetelmiä, ja vasta-aine  
puhdistaa solulyysaatista. Menetelmät monoklonaalisten vasta-ai-  
neiden puhdistamiseksi ovat alan ammattimiesten hyvin tuntemia.

Komplementti on standardikomplementti. Komplementilla tarkoite-  
taan ihmisen tai muun selkärangaisen normaaliseerumia, joka si-  
sältää noin 9 pääproteiinia, jotka reagoivat antigeeni-vasta-  
ainekompleksien kanssa aiheuttaen vahinkoa solumembraaneille,  
kuten hajoamisen. Komplementti toimitetaan tavallisesti seerumi-

na, esimerkiksi kanin seerumina. Tyypillinen komplementti ja sen valmistus, joka on tälle keksinnölle käyttökelpoinen, on kuvattu julkaisussa Monoclonal Antibodies (1980), Plenum Press New York, Eds. Kennett et al., s. 391-392, joka julkaisu on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi. Vaihtoehtoisesti on mahdollista käyttää potilaan komplementin aktiivisuutta, joka voidaan saada riittävässä konsentraationa vesipitoisesta nesteestä leikkauksen aikana.

Sytotoksisten aineiden valmistamiseksi, joissa on toksisen aineen konjugaatti ja osa, joka mahdollistaa sitoutumisen epiteelisoluihin, toksinen aine ja vasta-aine kytketään tavallisesti sidoksella, joka voidaan lohkaista sytoplasmisesti. Mukavia sidoksia ovat disulfididos, erityisesti silloin, kun toksisessa aineessa on sisäinen rikki, tai muut sidokset, kuten peptididosokset, ureasidokset, tioetterit, imiinit, amidit, imidit, amidiinit, jne. Funktionaalisia ryhmiä, joita voidaan käyttää, ovat karboksyylihapporyhmät, aminoryhmät, imiinit, aldehydit, isosyanaatit, merkaptaanit, olefiinit tai vastaavat. Lisäksi voidaan käyttää monimutkaisempia sidosryhmiä, jolloin ryhmä voi olla sitoutunut yhteen osaan konjugaatissa, jolloin syntyy mukava sidos toisen osan sisäiseen ryhmään. Esimerkiksi m-maleimido-yylibentsoehapon N-hydroksisukkiini-imidiesteriä voidaan käyttää toksiinin amidin valmistukseen, joka sitten voidaan kytkeä käytettävissä olevan rikkiatomin avulla monoklonaaliseen vasta-aineeseen tioetterin saamiseksi.

Sytotoksisilla aineilla voi esimerkiksi olla seuraava kaava:



jossa:

$AS_n$  on toksinen aine, jolla on yksi tai useampi rikkiryhmä aineen osana; n on luku välillä 1 - toksisessa aineessa läsnäolevien niiden rikkiryhmien lukumäärä, jotka ovat käytettävissä merkaptidiryhminä, yleensä korkeintaan noin 4; R on monoklonaalinen vasta-ainereseptori, tai sen johdannainen; ja m on 1 - korkeintaan n, ollen tavallisesti 1-2; ja X on sidosryhmä ja voi olla sidos tai ryhmä, jossa on noin 1-20, tavallisesti 1-12 atomia, jotka

eivät ole vetyjä, ja jotka sisältävät hiiltä, typpeä, happea ja rikkiä. Rikki on tavallisesti sitoutunut hiileen, erityisesti se on alifaattisesti tyydyttynyt. X voi olla alifaattinen, alisyklinen, aromaattinen, heterosyklinen tai joku niiden yhdistelmä, jossa yleensä on 0-6, tavallisemmin noin 0-4, edullisesti noin 1-4 heteroatomia, jolloin happi ja rikki ovat mukana okso- tai ei-oksokarbonyyliryhmänä tai niiden tioanalogeina, tai eetterinä (kuten tioeetteri), ja typpi on mukana amino- tai amidoryhmänä. Enimmäkseen heteroatomit ovat sitoutuneina yksinomaan hiileen.

Kuvaavia ryhmiä, jotka sitovat disulfidin, ovat aminoetyleenii-3-propanyylimetyleenikarbonyyli,  $\alpha$ -sukkiini-imidyyli, 3-propyleenitiokarbonyyli. Ryhmät, joita voidaan käyttää, ovat enimmäkseen tavanomaisia ryhmiä, jotka mahdollistavat disulfidisidoksen. Disulfidiyhdiste on sellainen, joka pystyy reagoimaan soluspesifisen ligandin kanssa, jolloin merkaptidiryhmä voidaan korvata disulfidista, jolloin syntyy uusi disulfidisidos toksisen aineen ja ligandin välille.

Enimmäkseen sidokset ovat alifaattisia ja niissä on noin 1-6 hiiliatomia, jolloin reseptoriin syntyy amidisidos, vaikka tämä on ensisijaisesti mukavuuskysymys, ei välttämätön kohdeyhdisteiden toimivuudelle.

Muitakin toksisia aineita voidaan käyttää, kuten vismutti sitoutuneena ei-diffusiivisesti monoklonaalisiin vasta-aineisiin tai reseptoreihin, joka on kuvattu julkaisussa Waldman, J. Amer.

Med. Assoc.

Vaihtoehtoisesti voidaan liposomit kytkeä monoklonaalisiin vasta-aineisiin tai reseptoreihin, jolloin liposomit sisältävät erilaisia sytotoksisia aineita, kuten metotreksaatti, 5-fluorourasiili, mikä tahansa edellä olevista toksiineista, tai vastaava. Katso esimerkiksi Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:4194-4198 ja Szoka et al., Biochem. et Biophys. Acta. (1980) 601:559-571 liposomien valmistamiseksi, jotka julkaisut on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi. Vasta-aineiden kytkemistä liposomiin on laajasti kuvattu kirjallisuudessa, katso esimerkiksi Heath et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:1377-1381 ja Leserman et al., Nature (1981)

293:226-228, jotka julkaisut on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi.

Muita sidososaan konjugoituja sytotoksisia aineita voidaan myös käyttää tämän keksinnön kohteena olevan menetelmän yhteydessä. Konjugaatti riittää antamaan sytotoksisen vaikutuksen ilman sivuaineiden käyttämistä.

Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettavaa koostumusta käytetään esimerkiksi seuraavasti, sytotoksinen koostumus vietään silmän etukammioon linssin poiston jälkeen. Se vietään edullisesti ei-sytotoksisen aineen viemisen jälkeen, joka pystyy spesifisesti sitoutumaan kohtiin, jotka ovat ristireaktiivisia sytotoksisen aineen kanssa. Edullisesti, ei-sytotoksinen aine, 10-100 µg 10-20 µl:ssa, injektoidaan kammionsisään reunuksen kautta. Useimmiten tämä aine on monoklonaalinen vasta-aine tai sen spesifinen sidosfragmentti. Yleensä liuos on fysiologisesti sopiva liuos, joka voi olla suolaliuos, fosfaattipuskuroitu suolaliuos tai vastaava. Muulla tavalla aine voidaan viedä esimerkiksi tiputtamalla ei-sytotoksinen aine sarveiskalvon leikkauksen jälkeen ja tiputtamalla noin 25-200, edullisesti 50-150, edullisemmin noin 100 µl ei-sytotoksista ainetta, joka pystyy spesifisesti sitoutumaan kohtaan, joka on ristireaktiivinen sytotoksisen koostumuksen kanssa. Vasta-aineet tai niiden fragmentit sitoutuvat kaikkiin kohtiin, jotka voivat olla ristireaktiivisia sytotoksisen koostumuksen kanssa ja sitoutuvat myös ei-spesifisesti "kuumiin täpliin", joita voi olla läsnä silmän etukammiossa. Tällä tavalla solut suojataan sytotoksiselta koostumukselta.

Ristireaktiivisen sidosaineen käyttö on erityisen tärkeätä silloin, kun sytotoksisella aineella on ristireaktiivisuutta, joko spesifistä tai ei-spesifistä, muiden solujen kanssa kuin linssin epiteelisolujen kanssa. Tiputtamalla ensin ristireaktiivista ei-sytotoksista sidososaa, voidaan valmistaa sytotoksiset aineet, jotka ristireagoivat eri tavoin solujen kanssa, erityisesti epiteelisolujen kanssa, muiden kuin linssin epiteelisolujen kanssa.

Kun vasta-aineen sitoutumisen on annettu tapahtua (10-15 min), tehdään sarveiskalvon leikkaus (katso esimerkiksi Extracapsular

Cataract Surgery, Emery & McIntyre, Mosby Company, St. Louis, 1983) ja etukammio huuhdellaan fysiologisesti sopivalla liuoksella, kuten tasapainotettu suolaliuos, sitoutumattoman ei-sytotoksisen aineen poistamiseksi. Kotelonulkoinen leikkaus ja linsin poisto suoritetaan standardimenetelmien mukaan (Emery & McIntyre, edellä). Kun sarveiskalvon avaus on suljettu, suoritetaan ainakin toinen injektio linssin kotelon alueelle sytotoksisen koostumuksen viemiseksi.

Kun materiaali toiseen injektioon käsittää konjugaatin, joka sisältää toksisen osan ja monoklonaalisen vasta-aineen, on injektio yleensä 10-20  $\mu$ l sisältäen sellaisen määrän sytotoksista ainetta, joka on riittävä olennaisesti täysin tai täysin tappaamaan kaikki linssin epiteelisolut, tavallisesti 1-10  $\mu$ g.

Yleensä sytotoksinen vaikutus ilmenee suhteellisen lyhyessä ajassa sytotoksisten aineiden tiputuksen jälkeen, tavallisesti noin 0,5 tunnissa, tai pian sen jälkeen, kun proteiinisynteesin inhibointia voidaan käyttää arvioitaessa sytotoksisen vaikutuksen syntymistä. Jos elinkykyisyys arvioidaan joidenkin muiden mekanismien mukaan, esim. vitaaliset kannat, jne. voi kulua aikaa tunneista päiviin ennenkuin sytotoksinen vaikutus (esim. solujen kuoleminen) havaitaan.

Edullisesti sytotoksinen koostumus sisältää komplementin kiinnittävän monoklonaalisen vasta-aineen ja komplementin, ja menetelmä käsittää tiputuksen, jossa tiputetaan noin 25-200, edullisesti noin 50-150, edullisemmin noin 100  $\mu$ l monoklonaalista vasta-ainetta, joka pystyy spesifisesti sitoutumaan linssin epiteelisoluihin. Yleensä monoklonaaliset vasta-aineet viedään fysiologisesti sopivassa liuoksessa, joka voi olla suolaliuos, fosfaattipuskuroitu suolaliuos, tai vastaava, ja konsentraatio on noin  $10^8$ - $10^{13}$ , tavallisemmin noin  $10^9$ - $10^{12}$  vasta-ainetta/ml. Vaihtoehtoisesti, jos toimenpide suoritetaan muulloin kuin ensimmäisen harmaakaihileikkauksen aikana, on tarpeen joko tehdä avaus suunnilleen sarveiskalvoon monoklonaalisen vasta-aineen tiputtamiseksi tai injektoida vasta-aine kammionsisään etukammioon.

Kun monoklonaalinen vasta-aine on viety ja sitä on inkuboitu riittävä aika vasta-aineiden sitoutumiseksi linssin jäännösepi-

teelisoluihin, tavallisesti noin 30 minuuttia, voidaan etukammio huuhtoa sitoutumattoman vasta-aineen poistamiseksi. Komplementti (esimerkiksi sopivana laimenuksena kanin seerumista fysiologisesti sopivassa väliaineessa, joka sisältää  $Mg^{2+}$  ja  $Ca^{2+}$ ) viedään sitten etukammioon määränä noin 25-200, tavallisemmin noin 50-150  $\mu$ l, jolloin ainetta on läsnä riittävä määrä olennaisen täydellisesti tai täydellisesti tappamaan kaikki linssin epiteelisolut. Yleensä sytolyyttinen vaikutus ilmenee suhteellisen lyhyessä ajassa komplementin lisäämisen jälkeen, tavallisesti noin 0,5 tunnissa, tai pian sen jälkeen, kun kohdesolujen hajoamista voidaan käyttää arvioitaessa sytolyyttisen vaikutuksen syntymistä.

Keksinnön mukaiselle menetelmällä valmistettu koostumus voidaan tarjota käytettäväksi reagenssisarjana yhteen tai useampaan toimenpiteeseen. Reagenssisarjat sisältävät tavallisesti sytotoksisen koostumuksen, joka voi olla läsnä tiivisteenä, joka edelleen voidaan laimentaa ennen käyttöä, tai ne voidaan toimittaa käyttökonsentraatiossa, jolloin ampullit voivat sisältää yhden tai useamman annoksen. Yksittäiset annokset voidaan mielellään toimittaa ruiskuissa, säilöttyinä steriloituihin säiliöihin, jotta lääkäri voi käyttää ruiskua välittömästi, ja jolloin ruiskuissa on haluttu määrä ja konsentraatio aineita. Vasta-aineen ja komplementin yhdistelmänä reagenssisarjassa voi olla useita ruiskuja, jotka sisältävät monoklonaalisia vasta-aineita ja komplementin sopivina suhteellisina määrinä. Kun ruiskut sisältävät koostumusta suoraan käytettäväksi, ei tavallisesti tarvita muita reagensseja käytettäväksi menetelmän yhteydessä.

Seuraavat esimerkit annetaan selvitystarkoituksissa, ei rajoittamaan.

#### Kokeellinen osa

Hiiren hybridomasolinja HBI-4197-X, joka erittää  $IgG_3$ -vastaainetta, joka on olennaisesti spesifinen linssin epiteelisolulle, talletettiin ATCC:hen kesäkuun 14. päivänä 1988, ja se sai tulonumeron HB 9747.

Esimerkki 1Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistusA. Immunisaatio

Ihmisen linssin epiteelisolut saatiin etukotelon pieninä osina kaihileikkauksen aikana. Ne kerättiin aseptisesti ja pantiin RPMI1640:een, joka sisälsi 10 % sikiövasikan seerumia (FBS). Elinkykyisiä soluja voitiin säilyttää ainakin kaksi viikkoa. Ihmisen linssin epiteelisolut emulgoitiin Freundin täydelliseen apuaineeseen. Hiiret (BALB/c) immunisoitiin linssin epiteelisoluilla;  $5 \times 10^5$  soluekvivalenttia 200  $\mu$ l:ssa annettiin eläintä kohti primäärisenä injektiona. Lisäinjektiot, jotka koostuivat ekvivalentista solumateriaalista, joka oli emulgoitu Freundin epätäydelliseen apuaineeseen, annettiin lihaksensisään 3 viikkoa myöhemmin. Nämä hiiret saivat kaksi lisäinjektiota joko ME180-soluja tai ihmisen vesikalvosoluja (WISH) ennen pernojen ottamista fuusiota varten.

B. Fuusio

Pernat poistettiin immunisoiduilta eläimiltä 3-5 päivää viimeisen injektion jälkeen ja preparoitiin yksittäissolususpensioksi. Lymfosyytit fuusioitiin sitten P3-X-63/Ag8.653-hiiren luuydinkasvainsolujen kanssa tavallisissa olosuhteissa. Fuusion jälkeen solut suspendoitiin uudelleen Iscoves-kasvualustaan, joka sisälsi hypoksantiinia, aminopteriiniä ja tymidiiniä (HAT-kasvualusta) ja pantiin koloihin luuydinkasvainsolujen lukumäärän mukaan, jolloin tiheydeksi saatiin noin  $10^4$  solua/kolo. Soluja ravittiin päivinä 5, 12 ja 15 poistamalla ja korvaamalla puolet kasvualustasta. Viljelmät identifioitiin positiivisiksi vasta-aineen eritykselle seulontakokeilla, siirrettiin 24-koloisille levyille, jotka sisälsivät 1 ml Iscoves-kasvualustaa (IMDM), joka sisälsi hypoksantiinia ja tymidiiniä (HT), ja kloonattiin kolme kertaa rajoitetulla laimennuksella.

Esimerkki 2Hybridooman 4197-X karakterisointiSitoutumisspesifisyys

Poistetut ihmisen silmät (Lions Eye Bank, Houston, TX) pakastettiin nestemäisessä työssä ja säilytettiin  $-70^{\circ}\text{C}$ :ssa. Tarvittaessa pakastetut kudokset preparoitiin kryostaatissa ja kiinnitettiin lasilevyille. Osat värjättiin hybridomaviljelmän supernatanteilla, jotka sisälsivät monoklonaalisia vasta-aineita, ja konjugoitiin sen jälkeen vuohen antihiirivasta-aineella piparjuuriperoksidaasiin sitoutuneen hiiren immunoglobuliinin toteamiseksi. Käytetty substraatti oli 3-amino-9-etyylikarbatsoli. Tätä tekniikkaa käyttäen hybridooman 4197-X supernatantit sitoutuivat linssin epiteelisoluihin. Muut solurakenteet silmän edessä eivät värjäytyneet, nimittäin sarveiskalvon endoteelisolut, iiriksen epiteelisolut, jne. Värjäytymisen intensiteettiin perustuen suhteellinen intensiteetti linssin epiteelisoluille oli 4+, edustaen tilannetta, jossa 100% linssin epiteelisolusta värjäytyi; alle 10% muista solutyypeistä etukammion sisällä värjäytyi osoittaen, että vasta-aineet ovat olennaisesti spesifisiä linssin epiteelisoluille.

#### Monoklonaalisen vasta-aineen luokkaspesifisyys

Hiiren hybridomavasta-aineiden luokka ja alaluokka määritettiin käyttäen Ouchterlony-analyysiä (katso Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd ed., Goding, Academic Press, New York, s. 105, 1986, joka julkaisu on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi). Käyttäen tätä tekniikkaa määritettiin, että hybridooma 4197-X tuottaa  $\text{IgG}_3$ -vasta-ainetta.

#### Esimerkki 3

##### Hybridooman 4197-X lisäkarakterisointi

##### Monoklonaalisen vasta-aineen soluun sitoutuminen

Supernatantti hybridoomasta 4197-X tutkittiin ELISA-kokeella sen kyvyn suhteen sitoutua sekä normaaleihin että kasvainsoluihin. Tarttuvia solulinjoja kasvatettiin niiden yhdistymiseksi 96-koloisilla levyillä ja kiinnitettiin sitten 0,05% glutaraldehydillä 10 minuuttia. Suspensioviljelmät vietiin poly-L-lysiinillä peitetyille levyille ja kiinnitettiin kuten edellä. Monoklonaalinen vasta-aine viljelykasvualustassa lisättiin koloihin ja inkuboitiin  $37^{\circ}\text{C}$ :ssä 1 tunti. Levyt pestiin kolme kertaa ja

sitoutunut hiiren IgG todettiin vuohen antihiiri-IgG:llä, joka oli konjugoitu piparjuuriperoksidaasiin. Monoklonaalisen vasta-aineen sitoutuminen erilaisiin solutyyppeihin on esitetty taulukossa 3. Vasta-aine pystyy sitoutumaan kanin linssin epiteelisoluihin, sekä eri kudoksista saatuihin epiteelisolulinjoihin. Ei-epiteelistä alkuperää oleviin soluihin tapahtuu vähän tai ei lainkaan sitoutumista. Lisäksi vasta-aineet 4197-X:stä sitoutuivat ihmisen linssin epiteelisoluihin immunosytokemiallisella värjäyksellä arvioituna. Irrelevantit vasta-aineet eivät värjää ihmisen linssin epiteelisoluja.

### Taulukko 3

#### Vasta-aineen 4197-X sitoutuminen eri solutyyppeihin

Solu- linja	kudos	solutyyppi	Absorbanssi
			450 nm:ssä*
			4197-X
ME180	ihmisen kaula	epiteeli	0,17
WISH	ihmisen vesikalvo	epiteeli	0,16
COLO 320	paksusuoli	rauhassyöpä	0,00
MRC5	ihmisen iho	sidekudosemosolu	0,06
Daudi	Burkittin lymfoidi	imukudoskasvain	0,07
Y79	verkkokalvon varhaissolukasvain		0,06
RPMI 7932	melanooma	melanooma	0,00
RLE	kanin linssi	epiteeli	0,00

\* Absorbanssi 450 nm:ssä: Kasvavat absorbanssiheijastumat lisäävät vasta-aineen sitoutumista soluihin.

### Esimerkki 4

#### Toksiini-A-ketju-vasta-ainekonjugaattien valmistus

##### A. Toksiini-A-ketjun valmistus

(i) Kurkkumätätoksiini: Fragmentti A (DTA) valmistetaan kurkkumätätoksiinista (Connaught Laboratories) kuvatulla tavalla (Chung and Collier, Biochem. Biophys. Acta (1977) 483:248-257) ja kuumennetaan 80°C:een 10 minuutiksi toksiinijäämien inaktivoimiseksi. Entsymaattinen aktiivisuus DTA:lle tutkitaan ADP-ribosyloimalla vehnänalkion pidennystekijä 2 <sup>14</sup>C-NAD substraat-

tina.

(ii) Risiini-A-toksiini: Risiinin A-ketjutoksiini puhdistetaan kasvin Ricinus cummunis var zanzibariensis siemenistä yhdistämällä affiniteetti- ja ioninvaihtokromatografiamenetelmät. HBI on saanut siemenet Hummert Seed Companyltä, St. Louis, Missouri. Siemenet punnitaan ja homogenoidaan 1,1,3-trikloorifluorietaanissa (Freon). Siemenkakku, josta rasva on poistettu, otetaan sitten talteen vakuumisuodatuksella ja uutetaan natriumseptaattipuskurilla pH:ssa 4,0. Epäpuhdas uute otetaan talteen vakuumisuodatuksella sarjasuodattimilla pienimmän ollessa 100 mikronin suodatin. Suodatettu uute ladataan Fast S Sepharose kationinvaihtokolonniin (Pharmacia), joka on tasapainotettu samaan puskuriin kuin uutossa käytetty. Kun koko uute on ladattu, kolonnia pestään, kunnes poisvirtaava neste on muuttunut emäksi. Risiini eluoidaan natriumfosfaattipuskurilla (20 mM, pH 7,5) ja kerätään talteen. Näissä olosuhteissa agglutiniini jää sitoutuneena kolonniin.

Risiinifraktio ladataan happokäsiteltyyn Sepharose 4B-kolonniin (Pharmacin) ja kolonnia pestään, kunnes poisvirtaava neste muuttuu emäksiseksi. Pelkistyspuskuri, joka on valmistettu lisäämällä 2-merkaptoetanolia 50 mM Tris-puskuriin, pH 8,2, viedään sitten kolonniin. Pelkistynyt risiinin A-ketju otetaan sitten talteen. Kontaminoivan B-ketjun ja kokonaisten risiinimolekyylien poistamiseksi puhdistettu A-ketju kuljetetaan pienen kolonnin kautta, joka on valmistettu Fast Q Sepharosesta. Olosuhteet asetetaan sellaiseksi, ettei risiini A sitoutu kolonniin.

Puhdistettu risiini A säilytetään 50 mM Trisissä, pH 8, 1M 2-ME, konsentroituna pitoisuuteen 4 mg/ml, ja sekoitettuna glyserolin kanssa. Lopuksi se suodatussteriloidaan 0,22 mikronin suodattimen läpi steriileihin ampulleihin säilytettäväksi 4°C:ssa.

#### B. Toksiini-SS-vasta-ainekonjugaattien synteesi

(i) (DTA)-SS-vasta-ainekonjugaattien synteesi: Vasta-aine (7,0 ml, 2 mg/ml) dialysoidaan Dulbeccon fosfaattipuskuroitua suolaliuosta vastaan (DPBS Gibco), pH 7,4, joka sisältää antibioottis-antimykoottista liuosta (Gibco, 5,0 ml/l). N-sukkiini-imi-

dyyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaattia (SPDP) (0,186 ml, 10 mM) absoluuttisessa etanolissa lisätään vasta-aineeseen voimakkaasti sekoittaen. Seoksen annetaan reagoida 30 min huoneenlämmössä ja dialysoidaan sitten kahta 1 litran erää vastaan samaa puskuria. Dialyysin jälkeen vasta-ainevalmisteesta analysoidaan 2-pyridyy-lisulfidipitoisuus kuvatulla tavalla (Stuchbury *et al.*, Biochem. J. (1975) 151:417-432). DTA (3,0 ml, 2,5 mg/ml) pelkistetään lisäämällä 0,3 ml 1,0 M ditiotreitolia, pH 7,0, 30 min huoneenlämmössä ja suolat poistetaan Sephadex G-25:llä (2,6 x 12 cm:n kolonni), joka on tasapainotettu edellä kuvatulla puskurilla. Piikkifraktiot kolonnista yhdistetään (11,0 ml, 0,53 mg/ml) ja sekoitetaan PDP-(vasta-aine)-vasta-aineen kanssa (7,0 ml, 2,1 mg/ml). Lopulliset DTA:n ja vasta-aineen konsentraatiot ovat  $1,5 \times 10^{-5}$  M ja  $5,5 \times 10^{-6}$  M, vastaavasti. Lopullinen DTA:n moolisuhde vasta-aineeseen reaktioseoksessa on noin 3. Epäpuhdas konjugaat-tipreparaatti (18,0 ml) konsentroidaan lopulliseen 0,9 ml:an tilavuuteen ultrasentrifugoimalla Amicon YM-10-membraanilla. Epäpuhdas (DTA)-SS-(vasta-aine) (9,0 ml) kromatografoidaan Sephacryl S-2000-kolonnilla (2,6 x 106 cm, virtausnopeus 22,1 ml/h), joka on tasapainotettu DPBS-puskurilla. Kukin fraktio (6,2 ml) analysoidaan ADP-ribosylaatioaktiivisuuden suhteen ja natriumdodekyylisulfaatti/polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS/PAGE). Fraktiot 30-40 yhdistetään, konsentroidaan Amicon YM-10-membraanilla, ja käytetään sytotoksisuuskoikkeissa suodatussteriloinnin jälkeen.

(ii) (RTA)-SS-(vasta-aine)vasta-ainekonjugaatin synteesi: (RTA)-SS-(vasta-aine) syntetisoitiin, kuten on kuvattu julkaisussa J. Biol. Chem. (1984) 133:137-146. Lyhyesti sanottuna vasta-aine (1-2 mg/ml) 0,1 M Na-bikarbonaatissa, pH 8,0, ja 5-10-kertainen ylimäärä N-sukkiini-imidyyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaattia (SPDP) lisättiin vasta-aineeseen voimakkaasti sekoittaen. Kun oli inkuboitu huoneenlämmössä 30 min, pyridyyliditiopropionaa-tilla (PDP) modifioitu vasta-aine erotettiin SDPD:stä geelisuodatuksella G-25 Sephadexillä. RTA pelkistettiin aluksi lisäämäl-lä ditiotreitolia lopulliseen konsentraatioon 50 mM, jonka jäl-keen inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä. RTA erotettiin sitten DTT:stä geelisuodatuksella G-25 Sephadexillä. RTA konsentroititiin sitten lopulliseen konsentraatioon 4 mg/ml. 5- tai 10-kertainen molaarinen ylimäärä RTA:ta lisättiin sitten PDP-vasta-aineliuok-

seen ja inkuboitiin 16 tuntia 4°C:ssa. RTA-vasta-ainekonjugaatti puhdistettiin kromatografisesti Sephacryl S-200:lla.

### C. Saporiini-vasta-ainekonjugaattien valmistus

#### (i) Saporiinin eristys

Saporiini uutettiin kasvin Saponaria officinalis siemenistä käyttäen 0,14 M NaCl:a, 5 mM NaPO<sub>4</sub>:a, pH 7,2, käyttäen määrää 8 ml/g, liottamalla karkeita siemeniä yön yli 4°C:ssa. Supernatantti poistettiin ja sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 28.000 x g 30 min. Epäpuhdas supernatantti dialysoitiin 5 mM NaPO<sub>4</sub>:a vastaan, pH 6,0, puhdistettiin sitten CM-ioninvaihtokolonnilla, josta saporiini oli eluoitu 0,0-0,3 M NaCl-gradientilla (lineaarinen). Fraktiot, joilla oli ribosomia inhiboivaa aktiivisuutta, yhdistettiin ja dialysoitiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS) vastaan käyttäen julkaisussa Stirpy *et al.*, Virchows Arch. (1987) 53:259-271 esitettyä menetelmää.

#### (ii) Konjugointi

Puhdistettua vasta-ainetta käsitellään, N-sukkiini-imidyyl-3-(2-pyridyyliiditi)propionaatilla (SPDP) 30 min huoneenlämmössä ja dialysoidaan sitten PBS:ää vastaan reagoimattomien SPDP-ryhmien poistamiseksi. Dialyysin jälkeen vasta-ainevalmisteesta analysoidaan 2-pyridyyli-sulfidipitoisuus, kuten esimerkissä 2.B edellä on kuvattu. Vasta-aineen suhde SPDP:hen on 10-15-kertainen ylimäärä SPDP:tä vasta-aineeseen verrattuna. Saporiini käsitellään 10-kertaisella ylimäärällä SPDP:tä PBS:ssä, pH 7,0, 30 minuuttia huoneenlämmössä, ja sitten suolat poistetaan Sephadex G-25:llä kuten esimerkissä 2.B on kuvattu. Piikkifraktiot kolonnista yhdistetään ja sekoitetaan PDP-vasta-aineen kanssa siten, että suhde on 5-kertainen molaarinen ylimäärä saporiinia vasta-aineeseen nähden. Konjugaatit puhdistetaan kuljettamalla Sephacryl-300-kolonnissa. Fraktiot, joiden molekyylipaino on välillä noin 160-210 K MW kerätään talteen ja niistä tutkitaan immunologinen spesifisyys ja sytotoksisuus.

#### Esimerkki 5

#### Vasta-aineen tuotanto suuressa mittakaavassa

Yksittäisen monoklonaalisen vasta-aineen suurimittainen tuotanto saatiin aikaan injektoimalla noin  $10^7$  hybridisolua sopiviin H-2-yhteensopiviin hiiriin. Askiittikasvaimet indusoitiin seuraavalla menetelmällä. Askiittien tuottamiseksi hiirille injektoitiin vatsaontelon sisään 0,5 ml pristaania (2,6,10,14-tetrametyyli-pentadekaani, Aldrich), ja annettiin olla 1-2 kuukautta. 3-4 päivää ennen lajienvälisen hybridooman siirtoa kullekin hiirelle injektoitiin 50  $\mu$  antilymfosyyttiseerumia. Kasvaimensiirron päivänä kukin hiiri sai koko ruumiiseensa säteilyä (600-800 rad), jonka jälkeen 6-8 tuntia myöhemmin ne saivat syngeneistä luuydintä,  $10^7$  solua hiiri. Hybridoomasoluja ( $10^6$ - $10^7$ ) Dulbeccon modifioidussa Eagle's-kasvualustassa injektoitiin sitten vatsaontelon sisään. Kun kasvaimet alkoivat ilmestyä, (10-30 päivää injektion jälkeen), hiiriltä otettiin verta ja vasta-aineiden läsnäolo ja pitoisuudet seerumissa tutkittiin jatkuvasti. Sopivat vasta-aineet kerättiin talteen, puhdistettiin ja säilytettiin.

#### Esimerkki 6

#### Immunotoksiinin vaikutukset ihmisen linssin epiteelisoluihin

Ihmisen linssin kotelot, jotka oli saatu luovuttajien silmistä, leikattiin puoliksi pitkin keskiakselia kohtisuoraan ekvaattoria vastaan ja pantiin välittömästi 16 mm:n kudosisilmäkolojen pohjalle, jotka oli peitetty tyyppiä I olevalla kollageenilla. Yksi ml pelkkää kasvualustaa (kontrolli), tai sellaista, joka sisälsi 4197-X-risiini A-ketjun immunokonjugaattia (4197-X-RA), lisättiin sitten koloihin (päivä 0). Joitakin näytteistä inkuboitiin päivänä 0 kokonaisen risiinitoksiinin kanssa (risiini AB) edellä esitetyn immunokonjugaatin sijasta. Koloja inkuboitiin 37°C:ssa seoksessa 95% ilmaa-5% CO<sub>2</sub>, kunnes todettiin yhtynyt solukasvu linssikudoksessa kontrollikolossa (9-19 päivää). Kun linssikudokset olivat olleet 7 päivää viljelyssä, niitä ravittiin 1 ml:lla tuotetta kasvualustaa (ilman immunotoksiinia). Jos solut saavuttivat päivän 14, viljelmää ravittiin jälleen, mutta 0,5 ml:lla kasvualustaa. <sup>3</sup>H-leusiinia (5  $\mu$ Ci) lisättiin koloihin 0,1 ml:ssa tuoretta kasvualustaa. Näytteitä inkuboitiin sitten 18 tuntia ja korjattiin käyttäen TCA-saostusta ja keräämistä lasisuodattimille <sup>3</sup>H-leusiinin määrittämiseksi, joka on liittynyt proteiiniin.

Taulukko 4Jatkuvan immunotoksiinille altistuksen vaikutukset proteiinisyn-  
teesiin ihmisen linssin epiteelisoluissa

Näyte	Käsittely	<sup>3</sup> H-leusiini	
		dpm*	Liittyminen Inhiboitumis-%
89-1171	kontrolli	612.1	
89-1171	risiini AB 20 µg/ml	38.1	93.8
89-1154	kontrolli	1106.6	
89-1154	4197X-RA 50 µg/ml	46.8	95.8
89-132	kontrolli	15046.9	
89-132	4197X-RA 5 µg/ml	27.5	99.7
89-1194	kontrolli	2371.8	
89-1194	4197X-RA 5 µg/ml	69.3	97.1
89-1220	kontrolli 0.05 µg/ml	11.6	99.8

\* annettu dpm esittää TCA:lla saostettavaa radioaktiivisuutta, joka on liittynyt linssikudokseen 18 tunnissa miinus <sup>3</sup>H-leusiinin ajan 0 taustasitoutuminen kudokaspaleisiin yksinään (37,7 dpm).

Käyttämällä keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettua sytotoksista koostumusta, erityisesti sen jälkeen, kun on käytetty ei-sytotoksista sitovaa osaa, voidaan linssin jäännösepiteelisolujen lisäkasvua estää, jolloin vältetään sekundääriharmakaihit. Keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettu koostumus tarjoaa käyttöön yksinkertaisen menetelmän estää sekundäärisiä harmaakaiheja samalla, kun vältetään vahingoittamasta muita kudoksia silmässä, ja se tarjoaa turvallisen vaihtoehdon erilaisille menetelmille, joita on käytetty aikaisemmin, mutta joilla on yleisiä sytotoksisia vaikutuksia.

Kaikki tässä esityksessä mainitut julkaisut ja patenttihakemukset osoittavat sen alan ammattimiesten tiedon määrää, johon tämä keksintö kuuluu. Kaikki julkaisut ja patenttihakemukset on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi samassa määrin kuin jos jokainen yksittäinen julkaisu tai patenttihakemus olisi spesifisesti ja yksittäisesti osoitettu olevan viitejulkaisu.

Keksinnön tultua nyt täysin kuvatuksi, on alan ammattimiehelle ilmeistä, että monia muutoksia ja muunnoksia voidaan siihen tehdä ilman, että poiketaan liitteessä olevien patenttivaatimusten hengestä tai piiristä.

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä sytotoksisen koostumuksen valmistamiseksi, joka sitoutuu olennaisesti spesifisesti linssin epiteelisoluihin, t u n n e t t u siitä, että konjugoidaan monoklonaalinen vasta-aine 4197X tai sen fragmentti, joka pystyy sitoutumaan olennaisesti spesifisesti linssin epiteelisoluihin, joka monoklonaalinen vasta-aine on valmistettu hybridomalla, jolla on talletusnumero ATCC nro 9747, ja sytotoksinen aine, sytoplasmisesti lohkaistavan sidoksen välityksellä, puskurin vesiliuoksessa suunnilleen neutraalissa pH:ssa, jonka jälkeen monoklonaalinen vasta-aine-toksiini-konjugaatti puhdistetaan kromatografisesti.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä sytotoksisen koostumuksen valmistamiseksi, joka sitoutuu olennaisesti spesifisesti linssin epiteelisoluihin, t u n n e t t u siitä, että N-sukkini-imidyyli-3-(2-pyridyyliditi)propionaatti liitetään monoklonaaliseen vasta-aineeseen 4197X tai sen fragmenttiin puskurin vesiliuoksessa suunnilleen neutraalissa pH:ssa, edullisesti pH:ssa noin 7,5, pelkistetään Toksiini, kuten risiinin A-toksiini, pelkistäväällä aineella, puhdistetaan pelkistynyt Toksiini ja annetaan pelkistyneen Toksiinin reagoida 2-pyridyyliditiopropionaatilla modifioidun monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, ja puhdistetaan monoklonaalinen vasta-aine-toksiini-konjugaatti kromatografisesti.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että Toksiini on risiinin A-toksiini ja pelkistysaine on ditiotreitoli.
4. Menetelmä monoklonaalisen vasta-aineen 4197X valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään hybridomaa, jolla on talletusnumero ATCC nro 9747 kasvaimissa kuten vesivatsakasvaimissa tai soluviljelmissä ja eristetään monoklonaalinen vasta-aine 4197X viljelyväliaineesta.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kun mainittu monoklonaalinen vasta-aine 4197X on eristetty viljelyväliaineesta, se dialysoidaan puskuritua suolaliuosta vastaan.

## PATENTKRAV

1. Förfarande för framställning av en cytotoxisk sammansättning som kan bindas väsentligen specifikt till linsepitelceller, k ä n n e t e c k n a t av, att man konjugerar en monoklonal antikropp 4197X eller dess fragment, som kan väsentligen specifikt bindas till linsepitelceller, vilken monoklonal antikropp har framställts med hjälp av en hybridoma som har depositionsnumret ATCC nr 9747, och ett cytotoxiskt ämne via en cytoplasmiskt avspjältpbar bindning, i en buffrad vattenlösning vid nära neutralt pH-värde, varefter det monoklonala antikropp-toxinkonjugatet utsätts för kromatografisk rengöring.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av en cytotoxisk sammansättning som kan bindas väsentligen specifikt till linsepitelceller, k ä n n e t e c k n a t av, att man kopplar N-suckinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat till den monoklonala antikroppen 4197X eller ett fragment av denna, i en buffrad vattenlösning vid nära neutralt pH-värde, fördelaktigt vid pH ca 7,5, varefter ett toxin, såsom A-kedjan i ricin, reduceras med hjälp av ett reduktionsämne, det reducerade toxinet rengöres och man låter det reducerade toxinet reagera med den 2-pyridylditiopropionatmodifierade monoklonala antikroppen, och utsätter det monoklonala antikropp-toxinkonjugatet för kromatografisk rengöring.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av, att toxinet utgörs av A-kedjan i ricin och att reduktionsämnet är ditiotreitol.

4. Förfarande för framställning av en monoklonal antikropp 4197X, k ä n n e t e c k n a t av, att man odlar en hybridoma med depositionsnumret ATCC nr 9747, i tumörer såsom bukvattnusot-tumörer eller i cellodlingar och isolerar den monoklonala antikroppen 4197X från odlingsmediet.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t av, att då den monoklonala antikroppen 4197X har isolerats från odlingsmediet, dialyseras denna mot en saltlösning.