(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 972754 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 972754

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 16/40
A61K 39/395
C12N 15/13
C12N 5/20
C12N 9/99

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **27.12.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **26.06.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.06.1997**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **27.12.1995 PCT/JP1995/002714**

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

29.12.1994 JP 6-340006

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd,** 3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, TOKYO 103, JAPANI, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Kawauchi, Yasushi,** Japan, JAPANI, (JP)
2 • **Takasaki, Jun,** Japan, JAPANI, (JP)
3 • **Yasunaga, Tomoe,** Japan, JAPANI, (JP)
4 • **Masuho, Yasuhiko,** Japan, JAPANI, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Uusi monoklonaalinen vasta-aine, jolla on tyypin II fosfolipaasia A2 i nhiboiva aktiivisuus, ja tämän osan sisältävä proteiini

Ny monoklonalisk antikropp, som har inhiberande aktivitet med typ II f osfolipas A2, och protein innehållande en del därav

Uusi monoklonaalinen vasta-aine, jolla on tyypin II fosfolipaasia A2 inhiboiva aktiivisuus, ja tämän osan sisältävä proteiini. - Ny monoklonalisk antikropp, som har inhiberande aktivitet med typ II fosfolipas A2, och protein innehållande en del därav.

Esillä olevan keksinnön kohteena ovat uudet monoklonaaliset vasta-aineet, joilla on tehokas tyypin II fosfolipaasia A2 inhiboiva aktiivisuus, ja proteiinit, jotka sisältävät näiden osia.

Esillä olevan keksinnön kohteena ovat tarkemmin sanoen uudet monoklonaaliset vasta-aineet, joilla on ylivoimainen spesifisyys ja affiniteetti tyypin II fosfolipaasin A2 suhteen ja joilla on erittäin voimakas tyypin II fosfolipaasia A2 inhiboiva aktiivisuus ja joita voidaan käyttää terapeuttisina aineina hoidettaessa tyypin II fosfolipaasiin A2 liittyviä tauteja, sekä niiden osan sisältävät proteiinit. Esillä olevan keksinnön kohteena ovat lisäksi näitä monoklonaalisia vasta-aineita tai proteiineja tuottavat solut, näitä monoklonaalisa vasta-aineita tai proteiineja koodaavat DNA:t ja näitä DNA-molekyylejä sisältävät rekombinanttivektorit. Esillä olevan keksinnön kohteena ovat myös näitä monoklonaalia vasta-aineita tai proteiineja sisältävät lääkeseokset ja tyypin II fosfolipaasin A2 inhibiittori.

Fosfolipaasin A2 tiedetään olevan entsyymin, joka katalysoi biomembraanin erään komponentin, 1,2-asyylifosfoglyseridin C2-asemassa sijaitsevan esterisidoksen hydrolyysin. Tämä entsyymi on jakautunut nisäkkäiden eri elimiin ja soluihin. Se ei säätele ainoastaan biomembraanin fosfolipidin muodostumista ja metaboliaa, vaan toimii myös arakidonihappokaskadin nopeutta rajoittavana entsyyminä. Tämän kaskadin metaboliatuotteiden, joihin kuuluvat mm. prostaglandiini, leukotrieeni, tromboksaa-

ni, PAF, tiedetään omaavan monia erilaisia fysiologisia aktiivisuuksia.

Fosfolipaasi A2 -tyyppejä tunnetaan useita kuten tyyppi I, tyyppi II, solunsisäinen tyyppi jne. (Atsumi I. et al., Nippon Rinsho, Extra edition 1994, 202-206). Näistä tyypin II fosfolipaasia A2 indusoituu tulehduskohdan eksudaattiin ja sitä vapautuu suuria määriä vereen tulehdusreaktion aikana. Useat raportit viittaavat siihen, että tämä entsyymi pahentaa useiden eri tulehdustautien oireita tai on osasyy oireisiin. Kikuchi-Yanoshita et al. on esimerkiksi raportoinut tämän entsyymin aktiivisuuden kohonneen iskeemistä kardiopatiaa potevilla rotilla sydäninfarktin eläinmallissa, kun elimen vaurioituminen on edennyt pitkälle (Kikuchi-Yanoshita R. et al., J. Biochemistry, 114, 33-38, 1993). Leong et al. on raportoinut tätä entsyymiä olevan suurempi määriä sydäninfarktipotilaiden veressä kuin normaaleilla henkilöillä (Leong L. L. et al., Clinical Experimental Pharmacology and Physiology, 19: 113-118, 1992).

Lauritzen et al. on raportoinut, että tällä entsyymillä on tärkeä osuus reperfuusioidun iskemiataudin oireiden huonomisessa potilailla, joilla on aivoinfarkti (Lauritzen I. et al., Brain Research, 651: 353-356, 1994). Bauer et al. on myös raportoinut, että tällä entsyymillä on tärkeä osuus oireiden huononemisessa potilailla, joilla on akuutti munuaisten toimintavajavuus (Bauer M., Klin. Wochenschr., 67: 196-202, 1989). Murakami et al. on esittänyt, että tämä entsyymi stimuloi histamiinin vapautumista syöttösoluista, joilla on keskeinen osa allergiataudeissa kuten astmassa, ja myös että tämän entsyymin inhibointi voi johtaa allegiatautien kuten astman hoitoon sopivien terapeuttisten aineiden kehittämiseen. (Murakami M. et al., Journal of Immunology, 151: 5675-5684, 1993).

Smith et al. ja Pruzanski et al. ovat raportoineet, että kroonisesta nivelreumasta kärsivien potilaiden veressä on tätä

entsyymiä suurempia määriä kuin normaaleilla henkilöillä, mikä viittaa siihen, että tämä entsyymi pahentaa tätä tautia (Smith G. M. et al., British Journal of Rheumatology, 31: 175-178, 1992; Pruzanski W. et al., J. Rheumatol., 15: 1351-1355, 1988). Pruzanski et al. on samoin raportoinut, että osteoartriittipotilaiden eksudaateissa on tätä entsyymiä enemmän kuin normaaleilla henkilöillä, mikä viittaa mahdollisuuteen, että tämä entsyymi on taudin tai sen pahenemisen syy (Pruzanski W. et al., Life Sciences, 48: 2457-2462, 1991). Vadas et al. ja Green et al. ovat raportoineet, että septisestä sokista kärsivän potilaan veressä on tätä entsyymiä enemmän kuin normaalilla henkilöllä, mikä viittaa siihen, että se on mahdollinen syy tähän tautiin tai sen huononemiseen (Vadas P. et al., Life Sciences, 50: 807-811, 1992; Green, J., Inflammation, 15: 355-367, 1991).

Nevalainen et al. on raportoinut, että potilaiden, joilla on erityisen vaikea haimatulehdus, veressä on suuriä määriä tätä entsyymiä, mikä viittaa mahdollisuuteen, että tämä entsyymi on taudin tai sen pahenemisen syy (Nevalainen T. J. et al., Gut, 34, 1133-1136, 1993). Anderson et al. ovat raportoineet, että tätä entsyymiä on suuria määriä psoriasispotilaiden iholla, mikä viittaa mahdollisuuteen, että tämä entsyymi on taudin tai sen pahenemisen syy (Anderson S. et al., Inflammation, 18: 1-12, 1994).

Koike et al. on esittänyt, että tämä entsyymi on eräs MOF-taudin (multiple organ failure) päätekijöistä (Koike K. et al. Surgery, 112: 173-180, 1992). Koeniger et al., Edelson et al. ja Romaschin et al. ovat raportoineet, että potilaiden, joilla on aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymä (ARDS), veressä on tätä entsyymiä suurempia määriä kuin normaaleilla henkilöillä, mikä viittaa mahdollisuuteen, että tämä entsyymi on syy tähän tautiin tai sen huononemiseen (Koeniger R. et al., Klin. Wochenschr., 67: 212-216, 1989; Edelson J. D., et al., Am. Rev.

Respir. Dis., 143: 1102-1109, 1991; Romaschin A. et al., Clin. Biochem., 25: 55-60, 1992).

Minami et al. on raportoinut, että potilaiden, joilla on Chronin tauti tai haavainen koliitti, veressä on suuriä määriä tätä entsyymiä, mikä viittaa mahdollisuuteen, että tämä entsyymi on näiden tautien tai niiden pahenemisen syy (Minaki T. et al., Gut, 33: 914-921, 1992).

Tämän entsyymin on lisäksi indikoitu olevan osallinen uveiitissa, vastasyntyneen hengitysvaikeusoireyhtymässä (RDS), bronkopulmonaarisess dysplasiassa (BRD) jne.

Seuraavien vasta-aineiden on raportoitu olevan anti- ihmisen tyypin II fosfolipaasi A2 -vasta-aineita.

Stoner et al. puhdisti ihmisistukasta ja -nivelnesteestä ihmisen tyypin II fosfolipaasi A2 -entsyymiä ja käyttämällä tätä puhdistettua entsyymiä antigeeninä sai tätä antigeeniä vastaan nostatettua monoklonaalista vasta-ainetta hiiressä (Stoner C. R. et al., Journal of Immunological Methods, 145: 127-136, 1991). He herkistivät tässä menetelmässä ensin BALB/cByJ -kannan hiiren Freundin täydellisen adjuvantin kanssa sekoitettulla puhdistetulla fosfolipaasi A2:lla (5 μg) ja 25 päivän kuluttua samalla entsyymillä (3 μg). Lisäksi he herkistivät hiiren samalla preparaatilla (5 μg) 3 päivää ennen pernasolujen fuusiointia (36 päivää ensimmäisen herkistämisen jälkeen). Sen jälkeen he immunisoivat hiiren 36 päivän aikana yhteensä 13 μg immunogeenillä jaettuna viiteen annokseen. Eristetyt pernasolut fuusioitiin hiiren PAI-0 -myeloomasolujen kanssa ja seulottiin HAT-alustassa. Alustan supernatantti tutkittiin ELISA:lla käyttämällä fosfolipaasia A2, jolloin saatiin monoklonaaliset vasta-aineet (PLA184, PLA185, PLA186 ja PLA187). Nämä vasta-aineet kykenivät varmasti inhiboimaan ihmisen fosfolipaasin A2. Näiden vasta-aineiden kyky inhiboida muiden eläinlajien fosfolipaasia A2 tutkittiin kuitenkin vain käyttämällä rotan tyypin II fosfo-

lipaasia A2. He raportoivat, että näillä vasta-aineilla ei ollut ristireaktiota rotan tyypin II fosfolipaasin A2 kanssa, tai sitä oli vain vähän, eikä niitä voitu sen vuoksi käyttää eläinkokeissa rotilla.

Myös Takayama et al. puhdisti ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2 reumatismipotilaiden nivelvoiteesta ja sai tätä puhdistettua entsyymiä antigeeninä käyttämällä monoklonaalista vasta-ainetta hiiressä (Takayama K. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 167: 1309-1315, 1990). He adsorboivat tässä immunisointimenetelmässä ihmisen tyypi II fosfolipaasia A2 (10 µg) nitroselluloosakalvolle, homogenoivat ja ruiskuttivat saadun homogenaatin BALB/c -kannan hiiren pernaan. Kahden viikon kuluttuva tehtiin samanlainen immunisointi. He immunisoivat siten eläimen yhteensä 20 µg immunisoivalla antigeenillä kahteen yhtäsuureen annokseen jaettuna 28 päivän aikana. Kolme päivää tämän jälkeen pernasolut fuusioitiin hiiren myeloomasoluilla (X63-Ag8.6.5.3). He tutkivat alustan supernatantilla ELISA:lla käyttämällä fosfolipaasia A2 ja saivat reaktiiviset monoklonaaliset vasta-aineet (HP-1, HP-2, HP-3 and HP-4). Näistä HP-1:lla osoittautui olevan korkein ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2 inhiboiva aktiivisuus. Kuitenkin myös HP-1:n inhiboiva vaikutus oli vain heikko. Jopa silloin kun sitä lisättiin 200 moolinen ylimäärä, se inhiboi noin 80 %.

McCord et al. puhdisti ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 ja sai monoklonaalista vasta-ainetta hiiressä käyttämällä antigeeninä tätä puhdistettua entsyymiä (McCord M. et al., The Journal of Investigative Dermatology, 102: 980-986, 1994). Eläinten immunisointia varten he immunisoivat CAF1-hiirikannan Freundin täydellisen adjuvantin kanssa sekoitetulla fosfolipaasilla A2. Määrät olivat vastaavasti 100, 50 and 25 µg joka neljäsviikko siten, että viimeinen immunisointi tehtiin 3 päivää ennen pernasolujen fuusiointia. Immunisointiin käytetyn immunogeenin kokonaismäärä oli siten noin 200 µg jaettuna neljään osaan 56 päivän aikana. Pernasolut fuusioitiin hiiren

myeloomasoluilla SP2/0-AG14 ja positiiviset solut seulottiin HAT-alustassa. Alustan supernanantista tutkittiin inhiboiva aktiivisuus käyttämällä fosfolipaasia A2, jolloin saatiin monoklonaalista vasta-ainetta (3F10). He tutkivat tämän vasta-aineen (1 μg) inhiboivan aktiivisuuden ihmisen fosfolipaasin A2 suhteen, mutta spesifoimatta käytetyn entsyymin määrää, joten sen inhibointitehoa on vaikea arvioida.

Lisäksi Johnson L. K. (Tokkai H4-506447) on kuvannut ihmisen rekombinanttifosfolipaasin A2 puhdistamisen ja polyklonaalisen vasta-aineen valmistamisen kaniinissa käyttämällä puhdistettua entsyymiä antigeeninä. Tämä vasta-aine ei ole monoklonaalinen, ja lisäksi hän käytti antigeeneinä kahta peptidilajia, jotka ovat ihmisen fosfolipaasin A2 sekvenssin osia, "GTKFLSYKFSNSGSRITC":a (aminohapot 67-85 N-päästä) ja "NKTTYNKKYQYYSNKHSRGSTPRC":a (aminohapot 109-132 N-päästä). Hän määritti tämän vasta-aineen inhibointikyvyn spesifioimatta käytettyjä vasta-aine- ja ihmisen fosfolipaasi A2 -määriä. Vasta-aineen inhibointikyvyn arviointi on siten vaikeaa.

Patenttijulkaisussa Tokkai H7-109300 on lisäksi esitetty vasta-aine, joka stimuloi ihmisen fosfolipaasin A2 sitoutumista sulfatoituun polysakkaridiin, vahvistamatta että mainittu vasta-aine inhiboi ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2.

Lisäksi ei ole saatavissa mitään tietoa siitä, että nämä edellä kuvatut tunnetut vasta-aineet inhiboivat apinan, hiiren, kaniinin, kissan, koiran ja rotan tyypin II fosfolipaasi A2 -entsyymiä, tai niiden kyvyistä vapauttaa soluun sitoutunutta ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2.

Kun hiiri immunisoidaan ihmisentsyymillä muodostuu helposti vasta-ainetta, joka tunnistaa ihmisen ja hiiren entsyymeistä eroavan aminohapposekvenssi. Kun hiiri sen jälkeen immunisoidaan ihmisen tyypin II fosfolipaasilla A2, teorian perusteella uskotaan siten, että lähes kokonaisuudessaan ihmisen tyypin II

fosfolipaasiin A2 sitoutuva hiirivasta-aine ei ole sitoutunut hiiren tyypin II fosfolipaasiin A2. Lisäksi tyypin II fosfolipaasin A2 entsyymiaktiivisuuskeskus ja sen lähialueet yleensä konservoituneita eri eläinlajeissa, ja ihmisen ja hiiren välinen homologia on jokseenkin korkea. Kun hiiri immunisoidaan ihmisen tyypin II fosfolipaasilla A2, immunologisesta toleranssista johtuen on vaikea saada vasta-aineineita, jotka tunnistavat entsyymin aktiivisuuskeskuksen ja sen lähialueen, jolloin päädytään nykyiseen tilanteeseen, jossa ei ole mahdollista saada vasta-aineita, joilla on voimakas ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2 inhiboiva aktiivisuus.

Vielä ei ole tunnettu mitään vasta-ainetta, joka sen lisäksi, että se inhiboi voimakkaasti ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2, inhiboisi myös hiiren tyypin II fosfolipaasia A2 ja/tai apinan tyypin II fosfolipaasia A2. Ennen kuin ihmisillä tehdään kliinisiä kokeita uusilla lääkeaineilla, niiden farmaseuttiset vaikutukset on selvitettävä eläinkokeissa. Sen vuoksi tarvitaan monoklonaalista vasta-ainetta, joka on farmaseuttisesti vaikuttava erityisesti pienillä eläimillä kuten hiirillä ja apinoilla tehdyissä eläinkokeissa, so. monoklonaalinen vasta-aine, joka ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 lisäksi inhiboi tätä näistä muista eläimistä saatua entsyymiä.

Lisäksi tiedetään, että fosfolipaasin A2 on sitouduttava soluihin, kun entsyymi vaikuttaa hydrolyyttisesti membraanin fosfolipidiin (Suga H. et al., Eur. J. Biochem., 218: 807-813, 1993; Murakami M. et al., J. Biol. Chem., 268: 839-844, 1993). Jos sen lisäksi, että vasta-aineet kykenevät inhiboimaan vapaata fosfolipaasia A2 veressä tai eksudaateissa, ne kykenevät myös vapauttamaan tämän niihin soluihin, joiden membraanin fosfolipidit tullaan hydrolysoimaan, sitoutuneen entsyymin niin niillä uskotaan olevan uuden vaikutusmekanismin kautta tehokkaita fosfolipaasi A2 -entsyymin vaikutuksia inhiboivia vaikutuksia. Kun vasta-aine sitoutuu solun pintaan liittyneeseen fosfolipaasiin A2, komplementti- ja/tai efektorisolut voivat lisäksi käydä

tämän solun kimppuun ja mahdollisesti vaikuttaa siihen epäedullisesti. Vielä ei myöskään ole saatu vasta-aineita, jotka vapauttavat soluun sitoutunutta tyypin II fosfolipaasia A2.

Farmasiassa tarvitaan siten suuresti tyypin II fosfolipaasi A2 -entsyymin vastaisia vasta-aineita, jotka inhiboivat ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 lisäksi myös tätä muista eläinlajeista saatua entsyymiä ja joilla on lisäksi kyky vapauttaa soluun sitoutunutta tyypin II fosfolipaasi A2 -entsyymiä.

Esillä olevan keksinnön keksijät ovat yrittäneet ratkaista näitä edellä kuvattuja ongelmia ja ovat saaneet seuraavaa tietoa keksintöä varten.

Immunisoimme hiiren 2 - 3 viikon aikana kahdeksan kertaa antamalla 20 μg hiirtä kohden ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 sekoitettuna Freund'in täydelliseen adjutanttiin. Me erosimme siten muisa tutkijoista siinä suhteessa, että yritimme välttää immunologisen toleranssin lisäämällä immunisointitaajuutta ja jatkamalla immunisointiaikaa. Lisäksi yritimme parantaa menetelmää, jolla määritimme fosfolipaasin A2 inhibiittion vasta-aineiden seulomista varten.

Käytimme *Escherichia colista* saatua fosfolipidiä erittäin herkkänä substraattina fosfolipaasi A2:n aktiivisuuden määrityksessä (Jacobson P. B. et al., Biochem. Pharm., 39: 1557, 1990) ja paransimme myös menetelmää, jolla *E. colin* fosfolipidit preparoitiin substraatiksi. Käytimme nimittäin *Escherichia coli* SN17 -kantaa, jolta fosfolipaasi A2 puuttui (pldA, pla-2, thr-1, leuB6, thi) (Doi O. et al., J. Biochem., 80: 1247-1258, 1976), ja veimme siihen tritiumilla leimattua öljyhappoa sen fosfolipidien preparoimiseksi.

Tätä mikro-organismia käyttämällä kykenimme tehokkaasti valmistamaan tritiumilla leimattua *E. colin* fosfolipidiä, jolla on korkea spesifinen radioaktiivisuus, altistamatta fosfolipidiä

E. colin fosfolipaasi A2 -entsyymin hajottavalle vaikutukselle. Lisäksi käyttämällä määritysjärjestelmää, jossa entsyymin reaktioaika on pidempi ja jonka herkkyys on suurempi kuin tavanomaisella menetelmällä (J. Biol. Chem., 261: 4239-4246. 1986), kykenimme tehokkaasti ja täsmällisesti seulomaan halutut vasta-ainetta tuottavat hybridomat. Tällä tavoin kykenimme tutkimaan niiden inhiboiviva vaikutuksia eri eläimistä saatujen fosfolipaasien A2 aktiivisuuteen.

Voidaksemme tutkia näin saatujen vasta-aineiden uutta funktiota käytimme määritysjärjestelmää myös testaamaan näiden vasta-aineiden kyky vapauttaa soluun sitoutunutta fosfolipaasia A2.

Tutkimusten tuloksena olemme onnistuneet samaan monoklonaalista vastaa-ainetta, jolle seuraavat ominaisuudet ovat tunnusomaisia.

Tämän keksinnön keksijöiden saama monoklonaalinen vasta-aine reagoi ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 kanssa ja on sen suhteen erittäin inhiboiva. Tämä vasta-aine ristireagoi myös apinan ja hiiren verihiutaleesta saadun tyypin II fosfolipaasin A2 kanssa. Esillä olevan keksinnön mukaista vasta-ainetta käyttämällä voidaan sen vuoksi tehdä eläinkokeita apinalla ja hiirellä ennen kuin uudet lääkeaineet testataan kliinisesti ihmisellä. Sen lisäksi, että esillä olevan keksinnön mukainen monoklonaalinen vasta-aine kykenee inhiboimaan veressä tai eksudaatissa olevan vapaan entsyymin, se myös kykenee vapauttamaan soluun sitoutunutta tyypin II fosfolipaasia A2. Tyypin II fosfolipaasi A2 sitoutuu soluun solun pinnalla olevan hepariinisulfaatin jne. kanssa, ja sen tiedetään sitoutuvan hepatosyyttiin, endoteelisoluun jne., joissa solun pinnalla on hepariinisulfaattia. Esillä olevan keksinnön monoklonaaliselle vasta-aineelle on tunnusomaista se, että se kykenee inhiboimaan vapaan tyypin II fosfolipaasin A2 veressä tai eksudaatissa ja sen lisäksi myös vapauttamaan solumembraanista soluun sitoutuneen entsyymin.

Esillä olevaan keksintöön sisältyy lisäksi proteiini, joka muodostuu monoklonaalisen vasta-aineen, jolla on edellä kuvatut ominaisuudet, osasta ja jolla on tämän monoklonaalisen vasta-aineen kanssa vastaava kyky sitoutua antigeenia. Esillä oleva keksintö sisältää myös tämän proteiinin pelkistetyt alkyloidut johdannaiset ja muunnosproteiinit, jotka on muodostettu additiomalla, deletoimalla, substituoimalla tai mutatoimalla yksi tai useampi aminohapporyhmä eläimiä immunisoimalla saadun vasta-aineen aminohapposekvensissä, mikäli ne säilyttävät mainittua monoklonaalista vasta-ainetta vastaavan kyvyn sitoa antigeenia.

Esillä olevan keksinnön keksijät eristivät lisäksi cDNA-molekyylejä, jotka koodaavat "hybridomasta 1.4" ja "hybridomasta 10.1", jotka tuottavat esillä olevan keksinnön mukaista vasta-ainetta, saadun vasta-aineen H- ja L-ketjujen koodaavia alueita, ja määrittivät koko emässekvenssin. Tämä mahdollistaa vasta-aineen valmistamisen suuressa mitassa käyttämällä geenimuokkaustekniikkaa ja sen lisäksi myös esillä olevan keksinnön mukaisen vasta-aineen helpon muuntamisen käyttämällä vasta-ainemuokkaustekniikkaa. ["Hybridoma 1.4":llä määritellyt emässekvenssit on esitetty sekvensseissä SEQ ID NO: 1 (L-ketju) ja SEQ ID NO: 3 (H-ketju). Myös näitä emässekvenssejä vastaavat oletetut aminohapposekvenssit on annettu sekvensseissä SEQ ID NO: 2 (L-ketju) ja SEQ ID NO: 4 (H-ketju). "Hybridoma 10.1":lla määritellyt emässekvenssit on esitetty sekvensseissä SEQ ID NO: 5 (L-ketju) ja SEQ ID NO: 7 (H-ketju). Myös näitä emässekvenssejä vastaavat oletetut aminohapposekvenssit on annettu sekvensseissä SEQ ID NO:6 (L-ketju) ja SEQ ID NO: 8 (H-ketju).] Esillä oleva keksintö muodostuu siten seuraavista:

1) Monoklonaalinen vasta-aine, joka kykenee inhiboimaan ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 sekä apinasta ja/tai hiirestä saadun tyypin II fosfolipaasin A2 aktiivisuuden, tai proteiini, joka sisältää tästä osan, jolla on tämä inhiboiva aktiivisuus,

2) Monoklonaalinen vasta-aine, joka kykenee vapauttamaan solumembraaniin sitoutuneen tyypin II fosfolipaasin A2, tai proteiini, joka sisältää tästä osan, jolla on tämä aktiivisuus,

3) Kohdan 2) mukainen monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joissa fosfolipaasi A2 on saatu ihmisestä,

4) Monoklonaalinen vasta-aine, joka sen lisäksi, että se kykenee inhiboimaan ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 sekä apinasta ja/tai hiirestä saadun tyypin II fosfolipaasin A2 aktiivisuuden, kykenee myös vapauttamaan solumembraaniin sitoutuneen tyypin II fosfolipaasin A2, tai proteiini, joka sisältää tästä osan, jolla on tämä aktiivisuus,

5) Millä tahansa hybridomista 12H5 (FERM BP-5300), 1.4 (FERM BP-5297) ja 10.1 (FERM BP-5297) tuotettu monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, tai monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, joilla on tyypin II fosfolipaasin A2 vastainen aktiivisuus, joka vastaa tämän monoklonaalisen vasta-aineen tai proteiinin aktiivisuutta,

6) Kohdan 1) tai 2) mukainen monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, joka monoklonaalinen vasta-aine tai proteiinini sisältää proteiinin, jolla on jonkin sekvenssin SEQ ID NO:2, 4, 6 tai 8 mukainen aminohapposekvenssi tai tällainen sekvenssi, jossa yksi tai useampi sekvenssin sisältämä aminohapporyhmä on modifioitu substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla,

7) Kohdan 1) tai 2) mukainen monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, joka monoklonaalinen vasta-aine tai proteiinini sisältää proteiinin, jolla on jonkin sekvenssin SEQ ID NO:9 - 20 mukainen aminohapposekvenssi tai tällainen sekvenssi, jossa yksi tai useampi sekvenssin sisältä

mä aminohapporyhmä on modifioitu substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla,

8) Solu, joka tuottaa jonkin kohdan 1) - 7) mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia,

9) Kohdan 8) mukainen solu, jossa tämä solu on hybridoma,

10) Kohdan 8) mukainen solu, jossa tämä solu on rekombinanttiDNA:lla transformoitu solu,

11) Menetelmä valmistaa jonkin kohdan 1) - 7) mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia, jossa menetelmässä viljellään kohdan 8) mukaista solua ja otetaan monoklonaaliset vasta-aineet tai proteiinit talteen kasvualustan supernanantista,

12) DNA, joka koodaa jonkin kohdan 1) - 7) mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia,

13) Kohdan 12) mukainen DNA, joka sisältää sisältää jonkin sekvenssin SEQ ID NO:1, 3, 5 tai 7 emässekvenssin tai tällaisen sekvenssin, jossa yksi tai useampi tämän sekvenssin sisältämä aminohapporyhmä on modifioitu substituoimalla, deletoimalla, tai insertoimalla,

14) Rekombinanttivektori, joka sisältää kohdan 12) tai 13) mukaisen DNA:n,

15) Lääkeseos, joka sisältää jonkin kohdan 1) - 7) monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia ja farmakologisesti hyväksyttävää kantajaa,

16) Tyypin II fosfolipaasin inhibiittori, joka sisältää jonkin kohdan 1) - 7) mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen tai proteiinin.

Esillä olevan keksinnön mukainen "proteiini" ei ole aminohappo-ryhmiensä lukumäärän suhteen rajoitettu, vaan siihen sisältyy aminohappomäärältään pienempi nk. "peptidi". Nimitykseen "monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia tuottava solu" sisältyvät samoin kaiken tyyppiset solut kuten bakteeri-, hiiva- ja nisäkässolut, mikäli ne kykenevät tuottamaan esillä olevan keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia.

Esillä olevan keksinnön mukainen monoklonaalisen vasta-aine valmistetaan viljelemällä hiirihybridomaa kasvualustassa tai hiiren peritoneaalinesteessä. Samoin sen osia, joita ovat esim. F(ab')2, Fab, Fab' jne., voidaan saada pilkkomalla muodostettu vasta-aine proteolyyttisellä entsyymillä valittuna joukosta, johon kuuluvat trypsiini, papaiini ja pepsiini, minkä jälkeen puhdistetaan sopivalla tavalla.

Esillä olevan keksinnön mukaiset hybridomat kuten 12H5, 1.4 ja 10.1 voidaan saada fuusioimalla BALB/c -kannan hiiren, joka on herkistetty normaaleilta ihmisiltä saadulla tyypin II fosfolipaasilla A2 suurennetuilla frekvensseillä ja pidennettyillä immunisointiajoilla, hiiren myeloomasolujen P3x63Ag8/U1(P3U1) kanssa standardimenetelmällä, esimerkiksi Kohler'in ja Milstein'in kuvaamalla solufuusiomenetelmällä (kts. Esimerkki jäljempänä).

Keksijöiden aikaansaamat ja esillä olevaan keksintöön sisältyvät hybridomat on tallennettu seuraavasti.

Hybridoman 12H5 tallennus:

a) Tallennuslaitoksen nimi ja osoite

Nimi: National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry
Osoite: Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken 305, Japani

b) Tallennuspäivä (tallennuksen alkuperäinen päivä)
22.11.1994

c) Tallennusnumero
Seimeiken-Jo-Ki No. 5300 (FERM BP-5300)

Hybridoman 1.4 tallennus:

a) Tallennuslaitoksen nimi ja osoite

Nimi: National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry
Osoite: Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken 305, Japani

b) Tallennuspäivä (tallennuksen alkuperäinen päivä)
22.11.1994

c) Tallennusnumero
Seimeiken-Jo-Ki No. 5297 (FERM BP-5297)

Hybridoman 10.1 tallennus:

a) Tallennuslaitoksen nimi ja osoite

Nimi: National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry
Osoite: Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken 305, Japani

b) Tallennuspäivä (tallennuksen alkuperäinen päivä)
22.11.1994

c) Tallennusno
Seimeiken-Jo-Ki No. 5298 (FERM BP-5298)

Näiden hybridomien kasvatusalustana käytetään Dulbeccon modifioitua Eaglen minimialustaa (jäljempänä käytetään lyhennystä DMEM), jota on täydennetty vasikan sikiöseerumilla, L-glutamiinilla, glukoosilla, natriumpyruvaatilla, 2-merkaptoetanolilla ja antibiootilla (esimerkiksi penisilliini G, streptomysiini, gentamysiini, jne) jne.

Hybridomia viljellään tavallisesti 2 - 4 päivää alustassa 37°C:ssa 5 % CO_2 - 95 % ilma-seoksen alla tai noin 10 - 20 päivää BALB/c-kannan hiiren, joka on esitelty 2,6,10,14-tetrametyylipentadekaanilla (esimerkiksi pristan, Aldrich), vatsaontelossa, jolloin saadaan puhdistamiseen riittävä määrä vasta-ainetta.

Esillä olevan keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia, joka sisältää tästä osan, voidaan lisäksi saada insertoimalla esillä olevan keksinnön mukaista vasta-ainetta tai sen osaa koodaava geeni kokonaisuudessaan tai osittain ekspressointivektoriin ja siirtämällä *E. coli*-, hiiva- tai nisäkässoluihin, jotka tuottavat niitä.

Näin tuotettu monoklonaalinen vasta-aine voidaan puhdistaa fraktiomalla viljelyalustan supernatantti tai peritoneaalinen neste proteiinien eristämiseen ja puhdistamiseen tarkoitetuilla standardimenetelmillä. Näihin kuuluvat esimerkiksi sentrifugointi, dialyysi, saostaminen ammoniumsulfaatilla, pylväskromatografiakäsittelyt DEAE-selluloosalla, hydroksyyliapatiitilla ja proteiini-A agaroosilla.

Näin puhdistetusta vasta-aineesta voidaan saada sen aktiivisia paloja, esimerkiksi F(ab')2-, Fab-, Fab'-, Fv-palat, pilkkomalla vasta-aine proteolyyttisillä entsyymeillä kuten pepsiinillä, papaiinilla jne., minkä jälkeen pilkkomistuote eristetään ja

puhdistetaan standardimenetelmillä. Lisäksi voidaan saada vasta-aineen pelkistettyjä alkyloituja johdannaisia, joissa vain ei-kovalenttinen sidos kytkee H- ja L-ketjuja, alkyloimalla pelkistävästi H-ketjun H-ketjuun ja/tai H-ketjun L-ketjuun sillastavat disulfidisidokset käyttämällä ditiotreitolia ja jodiasetamidia, jne. (Useful Immunological Experimental Method, s 39, Kodansha Scientific Book).

Efektoriaktiivisuuden lisäksi on mahdollista modifioida esillä olevan keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen tai sen osan F-osan aminohapposekvenssiä (Duncan A. R. et al., Nature, 332: 738, 1988; Tao M. et. al., J. Exp. Med., 178: 661-667, 1993; Lund J., J. Immunology, 147: 2657, 1991). Lisäksi on mahdollista korvata Fc-fragmentti muulla proteiinilla. Edelleen on mahdollista fuusioida Fc-fragmentti muun proteiinin kanssa ja indusoida uusi funktio.

Kun esillä olevan keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia, joka sisältää tästä osan, käytetään ihmisten hoitoon, on suositeltavaa käyttää sellaista vasta-ainetta tai proteiinia, joka sisältää tästä osan, joka sisältää suurempia määriä ihmisesstä peräisin olevia osia. Tällaisista monoklonaalisista vasta-aineista esimerkkejä ovat 1) nk. "kimeerinen vasta-aine", jossa vain muuttuva alue muodostuu eläimestä kuten hiirestä saadusta aminohapposekvenssistä ja vakioalue muodostuu ihmisestä saadusta aminohapposekvenssistä, ja 2) nk. "humanisoitu vasta-aine", jossa vain komplementtisyyden määrittävä alue (jäljempänä CDR tai hypermuuttuva alue) muodostuu eläimestä kuten hiirestä saadusta aminohapposekvenssistä, ja muut alueet muodostuvat ihmisestä saadusta aminohapposekvenssistä. Myös tämäntyyppiset vasta-aineet sisältyvät esillä olevaan keksintöön. Alan keskimääräinen ammattimies kykenee helposti valmistamaan tämän "kimeerisen vasta-aineen" tai "humanisoidun vasta-aineen" eristämällä muuttuvaa aluetta tai CDR-aluetta vastaavan geenin esillä olevan keksinnnön mukaisesti hybridomista, yhdistämällä sen uudelleen ihmisen vasta-ainegee-

nin kanssa ja transduktoimalla saatu geeni ekspressoitaviin isäntäsoluihin (kts. Int. J. Cancer, 44, 424-433 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8095-8099 (1990)). Kun geenin emässekvenssi on määritetty, on myös mahdollista käyttää geeniä, joka sisältää vastaavan syntetisoidun sekvenssin, tai geeniä, joka on saatu hybridomasta tai ihmisvasta-ainetta tuottavista soluista, jotka on yhdistetty tämän syntetisoidun geenin kanssa. Muutuvaa aluetta tai CDR-aluetta vastaavina geeneinä voidaan mielellään käyttää myös jossakin sekvenssissä SEQ ID NO:1, 3, 5 tai 7 esitettyä emässekvenssejä tai DNA-molekyylejä, jotka sisältävät CDR-alueittensa emässekvenssin, tai DNA-molekyylejä, jotka sisältävät emässekvenssejä, jotka koodaavat jossakin sekvensseissä SEQ ID NO:2, 4, 6 tai 8 esitettyä aminohapposekvenssiä tai sen CDR-alueen sekvenssiä, DNA-geenejä, jotka sisältävät emässekvenssejä, jotka on valmistettu modifioimalla tämän DNA:n yhtä tai useampaa emästä substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla.

Geenin mutatointi substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla voidaan tehdä tunnetuilla menetelmillä (Gillamn et al., Gene, 8, 81-97 (1979); Roberts et al., Nature, 328, 731-734 (1987)). Näin saatujen muuntuneiden emässekvenssien seulomiseen sellaisen sekvenssin suhteen, joka koodaa aminihapposekvenssiä, jolla on haluttuja ominaisuuksia, voidaan käyttää sellaisia menetelmiä kuin faagimenetelmä (Ann. Rev. Immunol., 12, 433-455 (1994)). Erityisesti "humanisoidun vasta-aineen" voivat alan ammattimiehet helposti valmistaa tunnetulla menetelmällä (Nature, 321, 522-525 (1986); Science, 239, 1534-1536 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10029-10033 (1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873 (1991)). Näiden kirjallisuuviitteiden mukaan on lisäksi suotavaa käyttää "humanisoidun vasta-aineen" valmistamiseen jonkin muun eläimen kuin ihmisen vasta-aineen kanssa erittäin homologista ihmisvasta-ainetta, josta mainittu siirrettävä CDR-alue saadaan, ihmisvasta-aineena, joka tullaan korvaamaan vain CDR-alueessa osalla, joka on peräisin tästä muusta eläimestä kuin ihmisestä (so. vasta-

aine muodostaa "humanisoidun vasta-aineen" perusrungon, nk. "ihmisreseptorivasta-aineen"). Kuten Esimerkissä 7 on esitetty, ihmisvasta-aineita, jotka ovat erittäin homologisia tämän hakemuksen keksijöiden saaman ja keksintöön sisältyvän hiirivasta-aineen kanssa, olivat esimerkiksi Pag-1 -vasta-aine (Hughes-Johns N. C. et al., Biochem. J., 268, 135-140 (1990)), WEA-vasta-aine (Goni F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4837-4841 (1983)); ITH5-2 -vasta-aine (Chin L. T., et al., Immunol. Letter, 44, 25-30 (1995)); ITC48 -vasta-aine (Ohlin M., et al., Mol. Immunol., 31, 983-991 (1994)). "Humanisoidun vasta-aineen" valmistamisessa käytetään mieluummin näitä vasta-aineita kuin "ihmisreseptorivasta-ainetta".

Alan ammatimiehet voivat helposti valmistaa "kimeerisen vasta-aineen" käyttämällä tunnettuja menetelmiä (Nature, 314, 268-270 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3439-3443 (1987); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 214-218 (1987); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)).

Hyvänä pidettyjä esillä olevan keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita tai proteiineja ovat esimerkiksi monoklonaaliset vasta-aineet 12H5 tai 1.4, jotka on valmistsettu herkistämällä eläimet ihmisen tyypin II fosfolipaasilla A2 edellä kuvatulla tavalla, tai näiden fragmentit kuten F(ab')2, Fab, Fab', jne. Keksintöön sisältyvät myös monoklonaaliset vasta-aineet, jotka sisältävät näiden monoklonaalisten vasta-aineiden muuttuvat tai hypermuuttuvat alueet tai näiden fragmentteja tai muita ihmisestä saatuja alueita.

Esillä olevan keksinnön mukaiset lääkseseokset ovat tehokkaita erityisesti annettaessa parenteraalisesti, so. subkutaanisti, intramuskulaarisesti tai intravenöösisti. Parenteraaliseen antamiseen tarkoitettu seos muodostuu tavallisesti liuoksesta, joka sisältää monoklonaalista vasta-ainetta tai sen fragmentin sisältävää proteiinia liuotettuna antamiskelpoiseen kantajaan, mieluummin vesipitoiseen kantajaan. Erilaisia vesipitoisia

käytettyjä kantajia voivat olla vesi, vesipitoinen puskuri, 0,4 % suoliuos, 0,3 % glysiiniliuos, 5 % glukoosiliuos, ihmisalbumiinin liuos, jne. Nämä liuokset tulisi steriloida, eikä niiden yleensä tulisi sisältää partikkeleita muodostavia aineita. Nämä seokset voidaan steriloida tavanomaisilla ja yleisesti tunnetuilla sterilointimenetelmillä. Nämä seokset voivat sisältää farmaseuttisesti hyväksyttäviä täydennysaineita, jotka saavat ne lähemmäksi fysiologisia olosuhteita, kuten puskurointiaineita ja isotonisia aineita, mukaan lukien esimerkiksi natriumasetaattia, natriumkloridia, kaliumkloridia, kalsiumkloridia, natriumlaktaattia, natriumsitraattia, jne. Alan ammattimiehet voivat valmistaa parenteraalisesti antamiskelpoisia seoksia käyttämällä vakiintuneita tai yleisesti tunnettuja menetelmiä, joita on esimerkiksi kuvattu kirjassa: "Remington's Pharmaceutical Science, 15.painos, Mack Publishing Company, Easton, PA (1980)".

Esillä olevan keksinnön monoklonaalisia vasta-aineita, proteiineja ja lääkeseoksia voidaan säilyttää pakastettuina tai lyofilisoituina ja käytettäessä liuottaa sopivaan liuottimeen. Alan ammattimehet voivat suorittaa seosten lyofilisoinnin, sulattamisen ja liuottamisen tunnetuilla menetelmillä.

Kuvio 1 ELISA-analyysin tulokset 12H5:lle, 10.1:lle ja 1.4:lle, kun käytettiin ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2.

Kuvio 2 ELISA-analyysin tulokset 12H5:lle, 10.1:lle ja 1.4:lle, kun käytettiin rotan verihiutaleesta saatua fosfolipaasia A2.

Kuvio 3 12H5:n, 10.1:n ja 1.4:n inhibiitiovaikutukset ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasi A2 -aktiivisuuteen.

Kuvio 4 12H5:n, 10.1:n ja 1.4:n inhibiitiovaikutukset rotan tyypin II fosfolipaasi A2 -aktiivisuuteen.

Kuvio 5 12H5:n inhibiitiovaikutus eri eläinten verihiutaleista saatuihin fosfolipaaseihin.

Kuvio 6 10.1:n inhibiitiovaikutus eri eläinten verihiutaleista saatuihin fosfolipaaseihin.

Kuvio 7 1.4:n inhibiitiovaikutus eri eläinten verihiutaleista saatuihin fosfolipaaseihin.

Kuvio 8 12H5:n, 10.1:n ja 1.4:n aktiivisuudet vapauttaa BRL-3A -soluihin sitoutunutta fosfolipaasia A2.

Kuvio 9 Ankkuroitu PCR -menetelmä vasta-aineen 1.4 H- ja L-ketjujen muuttuvien alueiden cDNA:n kloonaamiseen.

Kuvio 10 Vasta-aineen 1.4 L-ketjun muuttuvan alueen cDNA-sekvenssi ja luettu aminohapposekvenssi. Oletetut CDR-sekvenssiä vastaavat sekvenssit on alleviivattu.

Kuvio 11 Vasta-aineen 1.4 H-ketjun muuttuvan alueen cDNA-sekvenssi ja luettu aminohapposekvenssi. Oletetut CDR-sekvenssiä vastaavat sekvenssit on alleviivattu.

Kuvio 12 cDNA:n kloonaaminen vasta-aineen H- ja L-ketjujen muuttuvaan alueeseen PCR-menetelmällä.

Kuvio 13 Vasta-aineen 10.1 L-ketjun muuttuvan alueen cDNA-sekvenssi ja luettu aminohapposekvenssi. Oletetut CDR-sekvenssiä vastaavat sekvenssit on alleviivattu.

Kuvio 14 Vasta-aineen 10.1 H-ketjun muuttuvan alueen cDNA-sekvenssi ja luettu aminohapposekvenssi. Oletetut CDR-sekvenssiä vastaavat sekvenssit on alleviivattu

Jäljempänä on annettu esimerkkejä esillä olevasta keksinnöstä rajoittamatta millään tavoin esillä olevaa keksintöä.

Esimerkki 1

Hybridomien 12.5, 1.4 ja 10.1 valmistaminen

a) Ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasin A2 valmistaminen

Esillä olevan keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita voidaan saada immunisoimalla eläimet ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasilla A2, joka valmistettiin täysin patenttijulkaisussa Tokkai H5-192167 kuvatulla menetelmällä.

b) Herkistettyjen pernasolujen valmistaminen

Esimerkissä 1a) puhdistettua, ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 (20 µg/eläin) liuotettiin fysiologiseen suolaliuokseen (0,1 ml), emulgoitiin sekoittamalla yhtä suuren tilavuuden kanssa Freund'in täydellistä adjuvanttia ja injisoitiin peritoneaalisesti BALB/c-kannan hiireen (immunisoinnin aloitushetkellä ikä 6 viikkoa) (ensimmäinen immunisointi). Sen jälkeen annettiin 2 - 3 viikon välein 7 kertaa tehostusruiskeena emulsiota, joka sisälsi saman määrän fosfolipaasia A2 sekoitettuna yhtä suureen tilavuuteen Freund'in täydellistä adjuvanttia. 24 päivää seitsemännen immunisoinnin jälkeen annettiin peritoneaalisesti (viimeinen immunisointi) fosfolipaasia A2 (20 µg/eläin) liuotettuna fysiologiseen suolaliuokseen (0,2 ml). 3 päivää viimeisen immunisoinnin jälkeen yhdeltä hiireltä otettiin pernasoluja ja suspendoitiin DMEM-mediumiin.

c) Hybridomien 12H5:n, 1.4:n ja 10.1:n valmistaminen

Edellä valmistetut pernasolut (1 x 10^8 solua) fuusioitiin hiiren myelooman P3 x 63Ag8·U1 (P3U1) kanssa (2 x 10^7 solua) Kohler'in ja Milstein'in menetelmällä (kts. Nature, 256, 495 (1975)). Pernasolut ja P3U1-solut pestiin DMEM:lla useita kertoja, laitettiin yhdessä 50 ml muoviseen sentrifuugiputkeen ja

sekoitettiin hyvin. Sen jälkeen kun alusta oli poistettu sentrifugoimalla, lisättiin 1 min aikana hitaasti ja samalla sekoittaen DMEM:ia (1 ml), joka sisälsi 50% (w/v) polyetyleeniglykolia (Sigma, keskimääräinen molekyylipaino 3350) ja joka oli esilämmitetty 37°C:een).

Sen jälkeen fuusio lopetettiin tiputtamalla tähän seokseen 37°C:een esilämmitettyä DMEM-mediumia (10 ml). Supernatantti poistettiin näin saadusta reaktioseoksesta sentrifugoimalla ja jäännökseen lisättiin HAT-mediumia [DMEM-medium, joka sisälsi 10 % vasikan sikiöseerumia täydennettynä hypoksantiinilla (1×10^{-4} M), aminopteriinilla (4×10^{-7} M) ja tymidiinillä ($1{,}6 \times 10^{-5}$ M)] niin, että pernasolujen konsentraatio oli 6×10^5/ml. Tämä solususpensio jaettiin 96-kaivoisen muovilevyn kaivoihin 200 μl kaivoa kohti ($1{,}2 \times 10^5$ pernasolua). Puolet mediumin tilavuudesta poistettiin 11 päivän kuluttua imulla ja jäännökseen lisättiin edellä kuvattua HAT-mediumia. 7 - 10 päivää solufuusion jälkeen havaittiin hybridomien lisääntyneen noin puolessa kaivoista. Vasta-aineen aktiivisuus supernatantissa määritettiin jäljempänä kohdassa d) kuvatulla menetelmällä. Positiiviset kloonit siirrettiin 48-kaivoiselle muovilevylle ja sen jälkeen 24-kaivoiselle levylle, jossa niitä viljeltiin samassa mediumissa, joka ei kuitenkaan sisältänyt aminopteriinia. Vasta-aineen aktiivisuuden toistettavuus vahvistettiin käyttämällä 24-kaivoisen muovilevyn viljelysupernatanttia kohdassa d) kuvatulla menetelmällä ja samanaikaisesti vasta-aineen entsyymiä inhiboiva aktiivisuus määritettiin kohdassa e) kuvatulla menetelmällä.

Niiden kolmen kloonin, joissa oli entsyymiä inhiboivaa aktiivisuutta, monoklonaalisuus varmistettiin kloonaamalla eteenpäin rajalaimennusmenetelmällä. Näin saatujen kloonien muodostamille monoklonaalisille vasta-aineille annettiin vastaavasti nimiksi 12H5, 1.4 ja 10.1.

d) Vasta-aineen aktiivisuuden määrittäminen ELISALLA

Puhdistettu ihmisen tyypin II rekombinantti fosfolipaasi A2 liuotettiin 20 mM Tris-puskuroituun suolaliuokseen (TBS, pH 7,4) 0,05 µg/ml konsentraatiossa. Entsyymiliuosta laitettiin sama määrä (kulloinkin 100 µl) 96-kaivoisen tasapohjaisen mikrotiitterilevyn kuhunkin kaivoon ja inkuboitiin yön yli 4°C:ssa kostetussa kammiossa. Sen jälkeen kun liuos oli heitetty pois, jokaiseen kaivoon lisättiin TBS-liuosta (kuhunkin 200 µl), joka sisälsi 1 % BSA-liuosta, ja annettiin seistä 37°C:ssa yksi tunti absorboitumattoman jakeen sitomiseksi kuhunkin kaivoon. Tämän jälkeen jokainen kaivo pestiin useita kertoja TBS-liuoksella, joka sisälsi 0,05 % Tween 20:a (TBS-Tween). Hybridomaviljelmän viljelyalusta tai vatsaonteloesteen supernatantti tai puhdistettu vasta-ainepreparaatti laimennettiin TBS-Tween-liuoksella, joka sisälsi 0,02 % BSA-liuosta (BSA-TBS-Tween), ja jokaiseen kaivoon lisättiin liuosta yhtä suuri määrä (jokaiseen 10 µl), minkä jälkeen inkuboitiin huoneenlämpötilassa kaksi tuntia.

Kaivot pestiin edellä kuvatulla tavalla TBS-Tween-liuoksella, minkä jälkeen jokaiseen kaivoon lisättiin (kuhunkin 100 µl) piparjuuriperoksidaasi-konjugoitua anti-hiiri-vasta-ainetta (Zymed), joka oli laimennettu 2000 kertaa BSA-TBS-Tween-liuoksella, ja inkuboitiin huoneenlämpötilassa kaksi tuntia. Reaktion jälkeen kaivot pestiin edellä kuvatulla tavalla TBS-Tween-liuoksella ja entsyymisubstraattina jokaiseen kaivoon lisättiin (jokaiseen 100 µl) 0,1 M asetaatti-natriumsitraattipuskuria (pH 5,8), joka sisälsi 0,006 % vetyperoksidia ja 3,3',5,5'-tetrametyylibentsidiiniä (0,1 mg/ml). Annettiin seistä huoneenlämpötilassa 30 minuuttia, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä 3 M rikkihappoa (25 µl kuhunkin kaivoon), ja reaktioseoksen optinen tiheys mitattiin aallonpituudella 400 nm.

e) Fosfolipaasia A2 inhiboivan aktiivisuuden määrittäminen

Vasta-aineen fosfolipaasia A2 inhiboiva aktiivisuus määritettiin muuntamalla jäljempänä esitetyllä tavalla hieman menetelmää, joka on kuvattu artikkelissa: Journal of Biological Chemistry (Pepinsky R. B. et al., J. Biol. Chem. 261(9), 4239-4246 (1986)).

Ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 puhdistettua preparaattia (0,5 ng) ja hybridoman kasvatusalustan supernatanttia tai puhdistettua vasta-ainepreparaattia inkuboitiin huoneenlämpötilassa 2 tuntia 125 mM Tris-puskurissa (pH 8,0) (100 µl), joka sisälsi 150 mM natriumkloridia, 12,5 mM kalsiumkloridia ja naudan seerumialbumia (250 µg/ml). Sen jälkeen reaktioseokseen lisättiin (25 µl, 50 000 - 100 000 cpm) *Escherichia coli* SN17-kannan autoklaavikäsiteltyä preparaattia, johon oli liitetty tritiumilla leimattua öljyhappoa, ja saatua seosta inkuboitiin 30 minuuttia 37°C:ssa. Reaktioseos siirrettiin jäiden päälle ja reaktio pysäytettiin lisäämällä 4 N suolahappoa (25 µl). Reaktion pysäyttämisen jälkeen seokseen lisättiin 25 µl naudan seerumialbumiinia (40 mg/ml) ja sekoitettiin. Saadun seoksen annettiin seistä jäillä 30 minuuttia.

Sentrifugoitiin 2 minuuttia 15 000 rpm, minkä jälkeen supernatantin radioaktiivisuus mitattiin. Näin saadusta radioaktiivisuudesta vähennettiin negatiivisen kontrollin radioaktiivisuus (näytteen, joka ei sisältänyt fosfolipaasia A2 eikä vasta-ainetta, radioaktiivisuus). Fosfolipaasin A2 aktiivisuus ilmoitettiin saadun tuloksen avulla. Inhibiittiosuhde vasta-ainetta vastaan ilmoitettiin seuraavan laskelman avulla, joka perustui positiivisen kontrollin fosfolipaasi A2 aktiivisuuteen (näytteen, joka sisälsi tätä entsyymiä, mutta ei vasta-ainetta, fosfolipaasi A2 aktiivisuus).

Inhibiitiosuhde fosfolipaasia A2 vastaan =
{1 - (viljelyalustan supernatantin tai vasta-aineen kanssa inkuboidun fosfoliipaasi A2:n aktiivisuus/positiivisen kontrollin fosfolipaasi A2:n aktiivisuus)} x 100

Fosfolipaasi A2 aktiivisuuden substraattina käytetty, *E. colin* autoklaavikäsitelty preparaatti, johon oli viety tritiumilla leimattua öljyhappoa, valmistettiin patenttijulkaisussa Tokkai H5-192167, s. 8 kuvatulla menetelmällä.

Esimerkki 2

Monoklonaalisen vasta-aineen muodostaminen ja preparointi

a) Monoklonaalisen vasta-aineen muodostaminen

BALB/c-kannan hiiren (5 - 6 viikkoa syntymän jälkeen) vatsaonteloon injisoitiin 2,6,10,14-tetrametyylipentadekaania (pristan, Sigma) (0,5 ml) ja 14 - 21 päivää myöhemmin injisoitiin peritoneaalisesti hybridomia (5 x 10^6) suspendoituna fysiologiseen suolaliuokseen (0,5 ml). 10 - 20 päivää myöhemmin muodostunut peritoneaalinen neste kerättiin tapetusta hiirestä, jonka vatsaontelo oli avattu. Yhdestä hiirestä saatiin 5 - 10 ml monoklonaalista vasta-ainetta sisältävää peritoneaalinestettä.

b) Monoklonaalisen vasta-aineen valmistaminen

Liukenemattomat ainekset poistettiin peritoneaalinesteestä sentrifugoimalla, minkä jälkeen lisättiin yhtä suuri tilavuus kyllästettyä ammoniumsulfaattiliuosta ja seosta sekoitettiin yksi tunti jäillä. Muodostunut saostuma otettiin talteen sentrifugoimalla, liuotettiin pieneen tilavuuteen 0,1 M fosfaattipuskuria (pH 7,4), joka sisälsi 0,9 % NaCl, ja dialysoitiin yön yli 4°C:ssa samaa puskuria vasten (100 tilavuutta), jolloin saatiin puhdistamaton gammaglobuliinijae. IgG puhdistettiin tästä jakeesta käyttämällä MAPS-II-kittiä (hiiren monoklonaalisen vasta-aineen puhdistamiseen, BioRad Laboratories).

Gammaglobuliinijakeeseen lisättiin yhtä suuri tilavuus sidontapuskuria ja sekoitettiin. Saatu seos vietiin "Protein A - Sepharose CL4B (Pharmacia)":lla täytettyyn pylvääseen, joka oli

täysin tasapainoitettu samalla sidontapuskurilla (kielipedin tilavuus 20 ml) ja pylväs pestiin 3 tilavuudella tätä sidontapuskuria. IgG:n eluointiin käytettiin noin 3 pylvästilavuutta kitistä saatua eluointipuskuria. Näin eluoitu IgG dialysoitiin esimerkiksi 20 mM Tris-puskuroitua suolaliuosta (pH 7,4) vasten, jolloin saatiin vasta-ainepreparaatti. Tavallisesti saatiin 5 - 10 mg IgG peritoneaalinesteen 1 ml kohden.

Esimerkki 3

Vasta-aineiden alaluokan määrittäminen

Hybridomien viljelyalustan supernatantin sisältämien vasta-aineiden IgG-alaluokka määritettiin käyttämällä hiiren monoklonaalisen vasta-aineen tyypityskittiä (Amersham). Tällä ELISA-pohjaisella menetelmällä saatiin 12H5:n, 1.4:n ja 10.1:n aliluokiksi vastaavasti IgG2a, IgG2a ja IgG1.

Esimerkki 4

Vasta-aineiden ristiinreagointi

a) Rotan tyypin II fisfolipaasin A2 puhdistaminen

Rotan runsashiutaleiseen plasmaan (PRP) lisättiin 1/5 tilavuutta ACD-liuosta (2 % (w/v) glukoosiliuos, joka sisälsi 65 mM sitruunahappoa ja 85 mM natriumsitraattia), ja seosta sentrifugoitiin 2500 x g 10 min. Näin saostuneisiin vesihiutaleisiin lisättiin ACD:n ja F10-alustan seosta (1:5) (F10, Gibco) niin, että suspensio sisälsi 2 x 10^9 verihiutaletta/ml. Saatua suspensoita sentrifugoitiin 2500 x g 10 min. Tämän jälkeen näin saostetut verihiutaleet suspendoitiin uudelleen F10-mediumiin 2 x 10^9 solua/ml tiheyteen ja sen jälkeen saatuun suspensioon lisättiin peräkkäin 1 M kalsiumkloridia ja trombiinia (2500 yks./ml) niin, että loppukonsentraatioksi tuli vastaavasti 2 mM ja 2,5 yksikköä.

Saatua seosta inkuboitiin 5 minuuttia 37°C:ssa, sentrifugoitiin 3000 x g 15 min. ja saatu supernatantti (trombiinilla stimuloitujen rotan verihiutaleiden supernatantti) prosessoitiin edellä. Fosfolipaasi A2 puhdistettiin modifioimalla hieman patenttijulkaisussa Tokkai H5-192167, s. 12 kuvattua menetelmää. Trombiinilla stimuloitujen rotan verihiutaleiden supernatantti johdettiin pylvään (Econocolumn, pylvään koko 20 ml; BioRad), joka oli täytetty sulfatoidulla cellulofine-materiaalilla (Seikagaku-Kogyo) ja joka oli tasapainoitettu 0,1 M asetaattipuskurilla (pH 6,0). Pylväs pestiin hyvin 200 ml:lla pesupuskuria (0,1 M asetaattipuskuri, joka sisälsi 0,5 M NaCl (pH 6,0)), minkä jälkeen se eluoitiin 30 ml eluointipuskurilla (0,1 M asetaattipuskuri, joka sisälsi 1,5 M NaCl (pH 6,0)), jolloin saatiin sulfatoituun cellulofine-materiaaliin sitoutunut jae, joka edelleen puhdistettiin fraktiomalla HPLC:llä.

HPLC tehtiin LC-4A HPLC-systeemissä (Shimazu Seisaku-sho) käyttäen CAPCELL PAK C18-kolonnia (4,6 mm ID x 25 cm, Shiseido), koko ajan 1 ml/min virtausnopeudella. Sulfatoituun cellulofine-materiaaliin sitoutunut jae johdettiin pylvään läpi, joka sen jälkeen pestiin johtamalla sen läpi 60 minuuttia 0,1 % trifluorietikkahappoa. Tämän jälkeen fosfolipaasi A2 eluoitiin asetonitriilin lineaarisella gradientilla 0 - 50 %, kun mukana oli 0,1 % trifluorietikkahappoa. Talteenotettu fosfolipaasi A2 eluoitui huippuna, jossa asetonitriiliä oli noin 30 %.

SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesissa näin talteenotetussa jakeessa näkyi hopealla värjättäessä yksi ainoa proteiinivyöhyke, joka vahvisti tämän jakeen olevan rotan tyypin II fosfolipaasia A2

b) <u>Ihmisen, apinan, koiran, kaniinin, kissan ja hiiren verihiutaleista saadun, tyypin II fosfolipaasin A2 valmistaminen</u>

Eri eläinlajien verihiutaleista saadun tyypin II fosfolipaasi A2 puhdistettiin ihmisen verihiutaleiden sonikaattiseoksen

valmistamiseen tarkoitetulla menetelmällä, joka on kuvattu julkaisussa: Journal Biological Chemistry (J. Boil. Chem., 264 (10), 5768-5775 (1989)).

Ihmisestä, rhesus-apinasta, koirasta, kaniinista, hiirestä ja kissasta valmistettuun runsashiutaleiseen plasmaan (PRP) lisättiin EDTA:a 2mM loppukonsentraatiooon ja solut otettiin talteen sentrifugoimalla 2500 x g 10 min. Solut suspendoitiin 30 mM Tris-HCl-puskuriin, joka sisälsi 120 mM NaCl ja 2 mM EDTA (pH 7,4) ja sentrifugoitiin uudelleen 2500 x g 10 min. Tämä menettely toistettiin 2 kertaa, minkä jälkeen näin saadut solut suspendoitiin uudelleen 2 x 10^9 solua/ml tiheyteen 30 mM Tris-HCl-puskuriin, joka siälsi 120 mM NaCl ja 2 mM EDTA (pH 7,4), ja pakastettiin enstemäiseen typpeen.

Pakastettu solususpensio sulatettiin, sekoitettiin yhtä suuren tilavuuden kanssa 0,36 N rikkihappoa ja seos ultraäänikäsiteltiin BIOMC 7040 ULTRA SONIC PROCESSOR-laitteella (Seiko; teho 80, 15 s, 6 kertaa). Näin saadun solusonikaatin annettiin seistä jäillä 60 minuuttia ja supernatantit otettiin taltteen sentrifugoimalla tämän jälkeen 4°C:ssa 10 000 x g 30 min. Sakka suspendoitiin uudelleen 0,18 N rikkihappoon, jonka tilavuudesta 1/3 oli supernatanttia, annettiin seistä jäillä 60 minuuttia ja sen jälkeen supernatantti otettiin talteen sentrifugoimalla 4°C:ssa 10 000 x g 30 min. Molemmat supernatantit yhdistettiin ja dialysoitiin yön yli 50 mM asetaattipuskuria vasten, joka sisälsi 200 mM NaCl (pH 4,5). Supernatantti otettiin talteen sentrifugoimalla dialysoitua sonikaattia 4°C:ssa 15 000 x g 40 min, ja supernatantti käytettiin verihiutaleesta saatuna fosfolipaasina A2.

c) <u>ELISA-reaktiivisuus</u>

Esimerkissä 2b) saaduille, eri monoklonaalisten vasta-aineiden puhdistetuille preparaateille tehtiin seuraavat kokeet.

IgG-preparaatti säädettiin BSA-TBS-Tween-liuoksella 10 µg/ml konsentraatioon ja sarjalaimennettiin 3 kertaa. Näille sarjalaimennetuille preparaateille tehtiin ELISA-määritykset esimerkin 1d) mukaisesti, millä tutkittiin ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasin A2 ja rotan tyypin II fosfolipaasin A2 ristiin reagointia. ELISA-määritys rotan tyypin II fosfolipaasille A2 tehtiin korvaamalla ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasi A2 esimerkissä 1d) rotan tyypin II fosfolipaasilla A2.

Tulokset on esitetty kuvissa 1 ja 2, joissa vasta-aineen konsentraatio on esitetty abscissana ja absorptio 450 nm ordinaattana. Rotan fosfolipaasin A2 ja 12H5:n ja 1.4:n välillä havaittiin ristiin reagointia, mutta ei 10.1:n kanssa.

d) Inhiboiva aktiivisuus eri eläimistä saatua fosfolipaasia A2 vastaan

Esimerkissä 2b) saaduille, eri monoklonaalisten vasta-aineiden puhdistetuille preparaateille tehtiin seuraavat kokeet.

1) Inhiboiva aktiivisuus ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 vastaan

Vasta-aineiden inhiboiva aktiivisuus fosfolipaasia A2 vastaan määritettiin käyttämällä varsinaisessa esimerkissä 1a) kuvattua ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 ja esimerkin 1e) menetelmää. Kunkin vasta-aineen inhibiittiosuhteet ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasin A2 suhteen on esitetty kuviossa 3, jossa abscissana on esitetty fosfolipaasin A2 kanssa esi-inkuboitujen vasta-ainenäytteiden konsentraatiot. 12H5 ja 1.4 inhiboivat lähes täydellisesti fosfolipaasi A2 aktiivisuuden 10 µg/ml konsentraatiossa. Toisaalta 10.1:n inhibiittiosuhde nousi 80 %:iin 3 µg/ml konsentraatiossa.

2) Inhiboiva aktiivisuus rotan tyypin II fosfolipaasia A2 vastaan

Inhiboiva aktiivisuus rotan tyypin II fosfolipaasia A2 vastaan määritettiin korvaamalla ihmisen tyypin II rekombinattifosfolipaasi A2 esimerkissä 1e) varsinaisen esimerkin 4a) rotan tyypin II fosfolipaasin A2 puhdistetulla preparaatilla (0,5 ng). Kunkin vasta-aineen inhibiittiosuhteet rotan tyypin II fosfolipaasiin A2 on esitetty kuviossa 4, jossa fosfolipaasi A2 -näytteen kanssa esi-inkuboitujen vasta-aineiden konsentraatiot on esitetty abscissana. 12H5 ja 1.4 inhiboivat myös rotan tyypin II fosfolipaasia A2. 12H5:n tapauksessa vasta-aineen konsentraatio, joka tarvittiin inhiboimaan fosfolipaasin A2 aktiivisuus 50 %:sesti, oli 5 μg/ml.

3) Inhiboiva aktiivisuus ihmisen, apinan, koiran, kaniinin, kisssan ja hiiren verihiutaleista saatua tyypin II fosfolipaasia A2 vastaan

Inhiboiva aktiivisuus fosfolipaasia A2 vastaan määritettiin korvaamalla ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasi A2 varsinaisessa esimerkissä 1e) kunkin verihiutalesonikaatin määrätyllä määrällä (20 - 40 μl). Kunkin vasta-aineen inhibiittiosuhteet fosfolipaasia A2 vastaan on esitetty kuvissa 5 - 7, joissa verihiutalesonikaatin kanssa esi-inkuboitujen vasta-aineiden konsentraatiot on esitetty abscissana. 12H5, 1.4 ja 10.1 inhiboivat ihmisen verihiutaleista saadun fosfolipaasin A2 samalla tavoin kuin ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasin A2, mikä osoittaa, että esillä olevan keksinnön mukainen, ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasin A2 vastainen vasta-aine kykeni inhiboimaan luonnonmukaista ihmisen tyypin II fosfolipaasia A2. Toisaalta esillä olevan keksinnön mukaiset vasta-aineet inhiboivat fosfolipaasia A2, joka oli saatu rhesus-apinan ja hiiren verihiutaleista, inhiboivat osittain koiran verihiutaleista saatua entsyymiä, mutta eivät kaniinin ja kissan verihiutaleista saatua entsyymiä.

Esimerkki 5

Vasta-aineiden kyky vapauttaa soluun sitoutunutta tyypin II fosfolipaasia A2

Hepatosyyttejä (BRL-3A, Dainippon Pharmaceutical-yhtiöstä) viljeltiin 96-kaivoisella tasapohjaisella levyllä (Falcon Co.) käyttämällä F12K/10 % FCS:a (F12K, Dainihon Pharmaceutical Co.). Sen jälkeen kun konfluenssiin kasvaneiden solujen viljelyalusta oli poistettu, kaivoissa oleviin soluihin lisättiin F12K/10 % FCS:a (50 µl), joka sisälsi ^{125}I-leimattua ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 (4 ng), ja fosfolipaasi A2 sidottiin soluihin inkuboimalla 37°C:ssa. Tunnin kuluttua kaivoihin lisättiin F12K/10 % FCS-liuosta, joka sisälsi puhdistettua vasta-ainepreparaattia, tai vain F12K/10% FCS-liuosta (kuhunkin kaivoon 50 µl) ja inkuboitiin 2 tuntia. Inkuboinnin jälkeen viljelyalusta otettiin talteen sen radioaktiivisuuden mittaamista varten. Samaan aikaan mitattiin erikseen reaktiosysteemiin lisätyn ^{125}I-leimatun fosfolipaasin A2 (4 ng) radioaktiivisuus.

Vasta-aineen kyky vapauttaa soluista fosfolipaasia A2 ilmoitettiin vasta-aineen eri konsentraatioiden kanssa inkuboidun alustan radioaktiivisuuden prosenttina siitä radioaktiivisuudesta, joka saadaan vähentämällä lisätyn fosfolipaasin A2 radioaktiivisuudesta alustan, johon F12F/10 % FCS oli lisätty, solujen fosfolipaasiin A2 sitoutumisen ja inkuboinnin jälkeen, radioaktiivisuus.

Ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasi A2 leimattiin ^{125}I:lla seuraavalla menetelmällä. 100 mM Tris-HCl-puskuriin (pH 7,4) (100 µl), joka sisälsi ihmisen tyypin II rekombinanttifosfolipaasia A2 (30 µg) ja joka oli laitettu lasiseen, IODOGEN:lla (10 µl, Pierce) pinnoitettuun koeputkeen, lisättiin 6 µl Na^{125}I:a (100 mCi/ml, ICN) ja seoksen annettiin seistä huoneenlämpötilassa 20 minuuttia. Reaktio pysäytettiin poista-

malla reaktioseos koeputkesta ja reagoimaton $Na^{125}I$ poistettiin geelisuodattamalla.

Fosfolipaasin A2 sitoneita soluja inkuboitiin eri konsentraatioiden kanssa puhdistettua vasta-ainepreparaattia ja inkubointimediumin radioaktiivisuus mitattiin. Kunkin vasta-aineen kyky vapauttaa soluun sitoutunutta fosfolipaasia A2 on esitetty kuviossa 8, jossa mediumiin lisätyn vasta-aineen konsentraatio on esitetty abscissana. Hiiren vasta-aine (kontrolli) ei vapauttanut lainkaan fosfolipaasia A2 solusta, kun taas 12H5, 10.1 ja 1.4 vapauttivat entsyymin solusta konsentraatiosta riippuvalla tavalla.

Esimerkki 6

cDNA:n kloonaus vasta-aineen H- ja L-ketjujen muuttuvaan alueeseen

Lähetti-RNA cDNA:n kloonausta varten valmistettiin noin 10^7 hybridoma-solua käyttämällä QuickPrep Micro mRNA Purification -kittiä (Pharmacia). Solut suspendoitiin siten Extraction-puskuriin, josta mRNA eristettiin Oligo(dT)-Cellulosen avulla.

Vasta-aineen 1.4 H- ja L-ketjujen muuttuvaa aluetta vastaava cDNA valmistettiin käyttämällä 5' RACE System -kittiä (Gibco) kuviossa 9 esitetyn tavan mukaisesti. Yksisäikeinen cDNA syntetisoitiin käyttämällä alukkeita, jotka hybridisoituvat vakioalueen geenin (C) kanssa, käänteistranskriptaasia (SUPER SCRIPT II Reverse Transcriptase) ja lähetti-RNA:ta (1 μg) mallina.Käytetyt alukkeet olivat [GSP1L (5'-GGCACCTCCAGATGTTAACTGC-3')/SEQ ID NO: 21] L-ketjua varten ja [GSP1H (5'-GGAA(AG)TA(AGC)CCCTTGACCAGGC-3')/SEQ ID NO: 22] H-ketjua varten. GSP1H:n sekvenssissä suluissa olevat sekvenssit ovat degeneroituvia emäksiä. Sen jälkeen kun mallina ollut mRNA oli pilkottu RNase H:lla, yksisäikeinen cDNA puhdistettiin käyttämällä "GLASS MAX Spin Cartridge" -patruunaa. Poly(dC)-häntä

kytkettiin yksisäikeisen cDNA:n 3'-päähän käyttämällä dCTP:ta ja terminaalista deoksinukleotidia. H- ja L-ketjujen muuttuvan alueen geenit (V) monistettiin käyttämällä ankkurialuketta, joka hybridisoituu poly(dC)-hännän kanssa, (5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'/SEQ ID NO: 23), ja aluketta, joka hybridisoituu vakioalueen geenin (C) kanssa, [GSP2L (5'-TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3')/SEQ ID NO: 24] L-ketjun tapauksessa tai [GSP2H (5'-TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTTGGC-3')/SEQ ID NO: 25] H-ketjun tapauksessa LA Taq:ia käytettäessä (Takara Shuzo) kanssa. GSP2H:n sekvenssissä suluissa olevat sekvenssit ovat degeneroituvia emäksiä. 1.2% agaroosigeelielektroforeesissa näillä PCR-tuotteilla näkyivät H- ja L-ketjujen noin 550-570 emäsparia vastaavat ainoat vyöhykkeet.

Kuviossa 12 esitetyllä tavalla valmistettiin myös vasta-aineen 10.1 H- ja L-ketjujen muuttuvia alueita vastaavat cDNA:t käyttämällä Marathon cDNA Amplification -kittiä (Clontec). Yksisäikeinen cDNA syntetisoitiin käyttämällä Marathon cDNA -synteesialuketta, käänteistranskriptaasia ja lähetti-RNA:ta (1 μg) mallina. Tämä reaktioliuos saatettiin edelleen reagoimaan RNase H:n, DNA-polymeraasi I:n ja DNA-ligaasin kanssa kaksisäikeisen cDNA:n syntetisoimiseksi. Tämän jälkeen kaksisäikeisen cDNA:n pää tasattiin saattamalla reaktioliuos reagoimaan T4 DNA -polymeraasin kanssa. Marathon cDNA -adapteri kytkettiin kaksisäikeiseen cDNA:han käyttämällä T4 DNA -ligaasia. H- ja L-ketjujen muuttuvien alueiden geenit (V) monistettiin käyttämällä adapterialuketta 1, joka hybridisoituu adapterin kanssa ja alukkeen GSP2L (L-ketjun tapauksessa) tai GSP2H (H-ketjun tapauksessa) kanssa LATaq:ia käytettäessä (Takara Shuzo). 1.2% agaroosigeelielektroforeesissa näillä PCR-tuotteilla näkyivät H- ja L-ketjujen noin 550-570 emäsparia vastaavat ainoat vyöhykkeet.

PCR-menetelmällä monistetut fragmentit integroitiin sekvensointia varten pCR™II -vektoriin käyttämällä TA Cloning -kittiä

(Invitrogen). *Escherichia coli* JM109-kannan (Takara-shuzo) kompetentit solut transformoitiin fragmentti-insertoidulla pCR™II -plasmidilla. Käyttämällä maljalle muodostuneita pesäkkeitä ja [5'-aluke UD (5'-ACCGAGCTCGGATCCACTAG-3')/SEQ ID NO: 26]:ia, joka hybridisoituu pCR™II:n kanssa, ja [3'-aluke DU (5'-ATGCATGCTCGAGCGGCCGCC-3')/SEQ ID NO: 27]:ia tehtiin pesäkkeen PCR Taq-polymeraasilla (Takara-shuzo). Analysoimalla monistetut DNA-fragmentit 1.2% agaroosigeelielektroforeesilla valittiin pesäkkeistä, jotka sisälsivät noin 600 -620 emäsparin monistettuja fragmentteja, kolme kloonia vasta-aineen 1.4 L-ketjua varten ja neljä kloonia H-ketjua varten ja kaksi kloonia vasta-aineen 10.1 L-ketjua varten ja neljä kloonia H-ketjua varten. Jokaisen kloonin *E. coli* viljeltiin ja plasmidi-DNA valmistettiin käyttämällä QIAwell-8 Plasmid Purification -kittiä (Qiagen).

Sekvensointireaktio tehtiin DNA Sequencing -kitillä (Parkin-Elmer) käyttämällä kustakin kloonista valmistettua plasmid-DNA:ta, aluketta UD, aluketta DU, GSP2L:a L-ketjulle tai GSP2H:a H-ketjulle. Analysointi tehtiin 373DNA Sequencer -laitteella (ABI). Vasta-aineen 1.4 kolme L-kejulle spesifistä ja neljä H-ketjulle spesifistä kloonia ja kaksi L-ketjulle spesifistä ja neljä H-ketjulle spesifistä kloonia sisälsivät vastaavasti saman sekvenssin. Kuvio 10 (SEQ ID NO:1 ja 2),joka koskee vasta-aineen 1.4 L-ketjua, ja Kuva 11 (SEQ ID NO:3 ja 4), joka koskee saman vasta-aineen H-ketjua, esittävät vastaavasti cDNA-sekvenssiä muuttuvalla alueella ja sen oletettua aminohapposekvenssiä. Kuva 13 (SEQ ID NO:5 ja 6), joka koskee vasta-aineen 10.1 L-ketjua, ja Kuva 14 (SEQ ID NO:7 ja 8), joka koskee saman vasta-aineen H-ketjua, esittävät vastaavasti cDNA-sekvenssiä muuttuvalla alueella ja sen oletettua aminohapposekvenssiä. Kummassakin kuvassa on alleviivattu CDR-sekvenssiä vastaava, oletettu sekvenssi. (Vasta-aineen 1.4 L-ketjun, vasta-aineen 1.4 H-ketjun, vasta-aineen 10.1 L-ketjun ja vasta-aineen 10.1 H-ketjun oletetut CDR-sekvenssit on esitetty vastaavasti sek-

venssiluettelon kohdissa SEQ ID NO:9 - 11, SEQ ID NO:12 - 14, SEQ ID NO:15 - 17 ja SEQ ID NO:18 - 20)

Esimerkki 7

H- ja L-ketjujen muuttuvien alueiden aminohapposekvenssien homologia vasta-aineiden 1.4 ja 10.1 ja ihmisvasta-aineen välillä

Ihmisvasta-aine, jolla on suuri homologia Esimerkissä 6 saatujen vasta-aineiden 1.4 ja 10.1 H- ja L-ketjujen muuttuvien alueiden aminohapposekvenssien kanssa, tutkittiin GenBank-, EMBL-, SWISS-PROT-, PIR- ja PRF-tietokannoissa. Homologiatutkimuksessa käytetty ohjelma oli BLASTP 1.4.8MP (Altschul S. F. et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)). Vasta-aineen 1.4 havaittiin olevan voimakkaasti homologisen esim. Pag-1 -vasta-aineen (Hughes-Jones N. C. et al., Biochem. J., 268, 135-140 (1990)) ja WEA-vasta-aineen (Goni F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4837-4841 (1983)) kanssa. Lisäksi havaittiin, että vasta-aineella 10.1 oli korkea homologia esim. ITH5-2 -vasta-aineen (Chin L. T. et al., Immunol. Letter, 44, 25-30 (1995)) ja ITC48-vasta-aineen (Ohlin M., et al., Mol. Immunol., 31, 983-991 (1994)) kanssa.

Teollinen käytettävyys

Esillä olevan keksinnön mukainen monoklonaalinen vasta-aine ja sen osan sisältävä proteiini reagoivat ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 kanssa ja niillä on hyvin voimakas tätä entsyymiä inhiboiva vaikutus. Koska tämä vasta-aine ja tämä proteiini ristireagoivat apinan ja/tai hiiren verihiutaleesta saadun tyypin II fosfolipaasin A2 kanssa ja niitä voidaan antaa näille koe-eläimille, niitä voidaan edullisesti käyttää apinoilla ja/tai hiirillä tehtävissä eläinkokeissa ennen farmakologia kokeita ihmisillä. Koska keksinnön mukainen monoklonaalinen vasta-aine ja sen osan sisältävä proteiini kykenevät vapautta-

maan soluun sitoutunutta tyypin II fosfolipaasia A2, ne lisäksi erityisesti inhiboivat tyypin II fosfolipaasia A2 eivätkä oletettavasti indusoi komplementti- ja/tai efektorisolun hyökkäyksen aiheuttamia sivuvaikutuksia.

Keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai sen osan sisältävää proteiinia voidaan antaa terapeuttisena aineena moniin erilaisiin tauteihin, joita pidetään ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 aiheuttamina tai sen pahentamina (mukaanlukien sydäninfarkti, aivoinfarkti, akuutti munuaisten toimintavajavuus, allergiatauti kuten astma, krooninen reumatismi, osteoartriitti, septinen sokki, haimatulehdus, psoriasis, MOF (multiple organ failure), aikuisen hengitysvaikeusoireyhtymä (ARDS), Crohnin tauti ja haavainen koliitti, uveiitti, vastasyntyneen hengitysvaikeusoireyhtymä (RDS), bronkopulmonaarinen dysplasia (BPD) jne).

SEKVENSSILUETTELO

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:1

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 393
TYYPPI: nukleiinihappo
SÄIKEISYYS: kaksois-
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: cDNA - mRNA

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

TUNNUSMERKIT:
NIMI/AVAIN: CDS
SIJAINTI: 1 .. 393
TUNNISTAMISMENETELMÄ: E

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:1:

```
ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA      48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
  1               5                  10                  15
GGT TCC ACA GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCC TTG GCT      96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
             20                  25                  30
GTG TCT TTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT     144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
         35                  40                  45
GTT GAT AGT TAT GGC ATT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA     192
Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
     50                  55                  60
GGA CAG CCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT     240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65                  70                  75                  80
GGG ATC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAA TTC ACC     288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr
                 85                  90                  95
CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT CAC TGT     336
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr His Cys
```

```
            100                 105                 110
CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG     384
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125
GAA ATA AAA                                                     393
Glu Ile Lys
    130
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:2

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

PITUUS: 131

TYYPPI: aminohappo

TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:

SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:2:

```
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
  1               5                  10                  15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
             20                  25                  30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
         35                  40                  45
Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
     50                  55                  60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65                  70                  75                  80
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr
                 85                  90                  95
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr His Cys
            100                 105                 110
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
        115                 120                 125
Glu Ile Lys
     130
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:3

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 408
TYYPPI: nukleiinihappo
SÄIKEISYYS: kaksois-
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: cDNA - mRNA

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

TUNNUSMERKIT:
NIMI/AVAIN: CDS
SIJAINTI: 1 .. 408
TUNNISTAMISMENETELMÄ: E

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:3:

```
ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TGG CTG TTC ACA GCC TTT CCT GGT TTC      48
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Phe
  1               5                  10                  15
CTG TCT GAT GTG CAG CTT CAG GAA TCG GGA CCT GGC CTG GTG AAA CCT      96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
             20                  25                  30
TCT CAA TCT CTG TCC CTC ACC TGC ATG GTC ACT GGC TAC TCA ATC ACC     144
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
         35                  40                  45
AGT GAT TAT GCC TGG AAC TGG ATC CGG CAG TTT CCG GGA AAC AAA CTG     192
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
     50                  55                  60
GAG CGG ATG GGA TAC ATA AGG TAC AGT GGT TAC ACT AGC TAC AAC CCA     240
Glu Arg Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 65                  70                  75                  80
TCT CTC AAA AGT CGA ATC TTT ATC ACG CGA GAC ACA TCC CAG AAC CAG     288
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Phe Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln
                 85                  90                  95
TTC TTC CTA CAT TTG ACT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT     336
Phe Phe Leu His Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
```

```
            100                 105                 110
TAC TGT ACA AGA GAC TTG GAC GCC TGG TAC TTC GAT GTT TGG GGC GCA     384
Tyr Cys Thr Arg Asp Leu Asp Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
        115                 120                 125
GGG ACA ACG GTC ACC GTC TCC TCA                                     408
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
     130                 135
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:4

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

PITUUS: 136

TYYPPI: aminohappo

TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:

SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:4:

```
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Phe
  1               5                  10                  15
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
             20                  25                  30
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
         35                  40                  45
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
     50                  55                  60
Glu Arg Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 65                  70                  75                  80
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Phe Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln
                 85                  90                  95
Phe Phe Leu His Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
            100                 105                 110
Tyr Cys Thr Arg Asp Leu Asp Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
        115                 120                 125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:5

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 381
TYYPPI: nukleiinihappo
SÄIKEISYYS: kaksois-
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: cDNA - mRNA

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

TUNNUSMERKIT:
NIMI/AVAIN: CDS
SIJAINTI: 1 .. 381
TUNNISTAMISMENETELMÄ: E

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:5:

```
ATG GAA TCA CAG ACT CTG GTC TTC ATA TCC ATA CTG CTC TGG TTA TAT      48
Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
  1               5                  10                  15
GGA GCT GAT GGG AAC ATT GTA ATG ACC CAA TCT CCC AAA TCC ATG TCC      96
Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
             20                  25                  30
ATG TCA GTA GGA GAG AGG GTC ACC TTG ACC TGC AAG GCC AGT GAG AAT     144
Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
         35                  40                  45
GTG GTT ACT TAT GTT TCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT     192
Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
     50                  55                  60
AAA CTG CTG ATA TAC GGG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT     240
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65                  70                  75                  80
CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC     288
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                 85                  90                  95
AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG GGT TAC     336
Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr
```

```
                100                 105                 110
AGC TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA          381
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:6

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

PITUUS: 127

TYYPPI: aminohappo

TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:

SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:6:

```
Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
  1               5                  10                  15
Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
             20                  25                  30
Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
         35                  40                  45
Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
     50                  55                  60
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65                  70                  75                  80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                 85                  90                  95
Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr
            100                 105                 110
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:7

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

PITUUS: 414

TYYPPI: nukleiinihappo
SÄIKEISYYS: kaksois-
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: cDNA - mRNA

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

TUNNUSMERKIT:
NIMI/AVAIN: CDS
SIJAINTI: 1 .. 414
TUNNISTAMISMENETELMÄ: E

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:7:

```
ATG GCT GTC CTG GCA TTA CTT TTT TGC CTG GTA ACA TTC CCA AGC TGT      48
Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
  1               5                  10                  15
ATC CTT TCC CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG GCG      96
Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
             20                  25                  30
CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGT ACC GTC TCA GGG TTC TCA TTA     144
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
         35                  40                  45
ACC GAC TTT GGT GTA AAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG     192
Thr Asp Phe Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
     50                  55                  60
GAG TGG CTG GGA ATG ATA TGG ACT GAT GGA ATC ACA GAC TAT AAT TCA     240
Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Thr Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser
 65                  70                  75                  80
GTT CTC AAA TCC AGA CTG AGC ATC AGC AAG GAC ACC TCC AAG AGC CAA     288
Val Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln
                 85                  90                  95
GTT TTC TTG AAA ATG AAC AAT CTG CAA ACT GAT GAC ACA GCC AGG TAC     336
Val Phe Leu Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr
            100                 105                 110
TAC TGT GCC AGA GAT GCA TAC TAC GGC TTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG     384
Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
        115                 120                 125
GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA                             414
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:8

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

PITUUS: 138

TYYPPI: aminohappo

TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:

SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:8:

```
Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
  1               5                  10                  15
Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
             20                  25                  30
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
         35                  40                  45
Thr Asp Phe Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
     50                  55                  60
Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Thr Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser
 65                  70                  75                  80
Val Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln
                 85                  90                  95
Val Phe Leu Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr
            100                 105                 110
Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
        115                 120                 125
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
    130                 135
```

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:9

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:

PITUUS: 15

TYYPPI: aminohappo

TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:9:

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His
1 5 10 15

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:10

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 7
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:10:

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:11

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 9
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:11:

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:12

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 6
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:12:

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:13

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 16
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:13:

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:14

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 9
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 1.4

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:14:

Asp Leu Asp Ala Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:15

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 11
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:15:

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:16

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 7
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:16:

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:17

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 9
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:17:

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:18

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 5
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:18:

Asp Phe Gly Val Asn
1 5

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:19

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 16
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:19:

Met Ile Trp Thr Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:20

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 11
TYYPPI: aminohappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

ALKUPERÄINEN LÄHDE:
SOLULINJA: 10.1

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:20:

Asp Ala Tyr Tyr Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:21

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 22
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:21:

GGCACCTCCA GATGTTAACT GC 22

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:22

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 20
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:22:

GAARTAVCCC TTGACCAGGC 20

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:23

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 48
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

TUNNUSMERKIT:
SIJAINTI: 36,37,41,42,46,47
MUUT TIEDOT: N on inosiini (I).

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:23:

CUACUACUAC UAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGNNGGG NNGGGNNG 48

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:24

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 46
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:24:

TATAGAGCTC AAGCTTGGAT GGTGGGAAGA TGGATACAGT TGGTGC 46

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:25

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 50
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:25:

TATAGAGCTC AAGCTTCCAG TGGATAGACH GATGGGGSTG TYGTTTTGGC 50

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:26

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 20
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:26:

ACCGAGCTCG GATCCACTAG 20

TIEDOT SEKVENSSILLE: SEQ ID NO:27

SEKVENSSIN OMINAISUUDET:
PITUUS: 21
TYYPPI: nukleiinihappo
TOPOLOGIA: lineaarinen

MOLEKYYLITYYPPI: muu nukleiinihappo (synteettinen)

SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO:27:

ATGCATGCTC GAGCGGCCGC C 21

Patenttivaatimukset

1. Monoklonaalinen vasta-aine, joka kykenee inhiboimaan ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 sekä apinasta ja/tai hiirestä saadun tyypin II fosfolipaasin A2 aktiivisuuden, tai proteiinin, joka sisältää tästä osan, jolla on tämä inhiboiva aktiivisuus.

2. Monoklonaalinen vasta-aine, joka kykenee vapauttamaan solumembraaniin sitoutuneen tyypin II fosfolipaasin A2, tai proteiini, joka sisältää tästä osan, jolla on tämä aktiivisuus.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, t u n n e t t u siitä, että fosfolipaasi A2 on saatu ihmisestä.

4. Monoklonaalinen vasta-aine, joka sen lisäksi, että se kykenee inhiboimaan ihmisen tyypin II fosfolipaasin A2 sekä apinasta ja/tai hiirestä saadun tyypin II fosfolipaasin A2 aktiivisuuden, kykenee myös vapauttamaan solumembraaniin sitoutuneen tyypin II fosfolipaasin A2, tai proteiini, joka sisältää tästä osan, jolla on tämä aktiivisuus.

5. Millä tahansa hybridomista 12H5 (FERM BP-5300), 1.4 (FERM BP-5297 ja 10.1 (FERM BP-5298) tuotettu monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, tai monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, joilla on tyypin II fosfolipaasin A2 vastainen aktiivisuus, joka vastaa tämän monoklonaalisen vasta-aineen tai proteiinin aktiivisuutta.

6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini sisältää proteiinin, jolla on jonkin sekvenssin SEQ ID NO: 2, 4, 6 tai 8 mukainen aminohapposekvenssi tai tällainen sekvenssi, jossa

yksi tai useampi sekvenssin sisältämä aminohapporyhmä on modifioitu substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini, joka sisältää tästä osan, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine tai proteiini sisältää proteiinin, jolla on jonkin sekvenssin SEQ ID NO: 9 - 20 mukainen aminohapposekvenssi tai tällainen sekvenssi, jossa yksi tai useampi sekvenssin sisältämä aminohapporyhmä on modifioitu substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla.

8. Solu, joka tuottaa jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on hybridoma.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että solu on rekombinantti-DNA:lla transformoitu solu.

11. Menetelmä valmistaa jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä viljellään patenttivaatimuksen 8 mukaista solua ja otetaan monoklonaaliset vasta-aineet tai proteiinit talteen kasvualustan supernatantista.

12. DNA, joka koodaa jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen DNA, t u n n e t t u siitä, että DNA sisältää jonkin sekvenssin SEQ ID NO: 1, 3, 5 tai emässekvenssin tai tällaisen sekvenssin, jossa yksi tai useampi tämän sekvenssin sisältämä aminohapporyhmä on modifioitu substituoimalla, deletoimalla tai insertoimalla.

14. Rekombinanttivektori, joka sisältää patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukaisen DNA:n.

15. Lääkeseos, joka sisältää jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta tai proteiinia ja farmakologisesti hyväksyttävää kantajaa.

16. Tyyppin II fosfolipaasin A2 inhibiittori, joka sisältää jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen tai proteiinin.

Figure 1

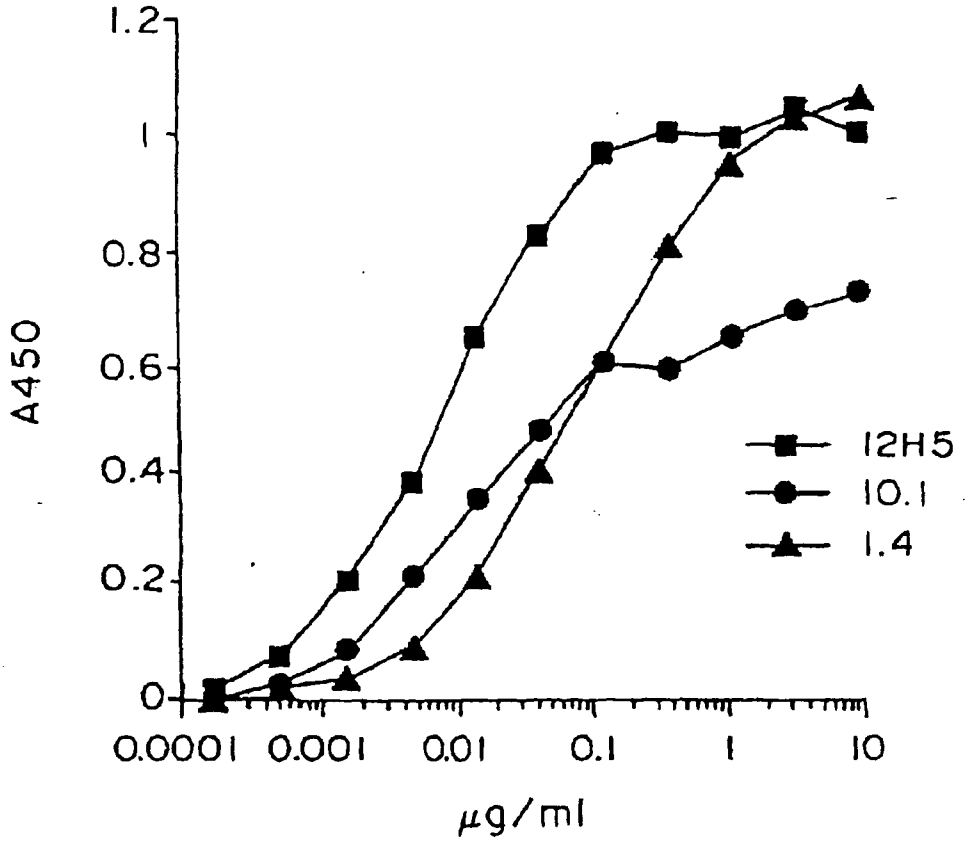

Figure 2

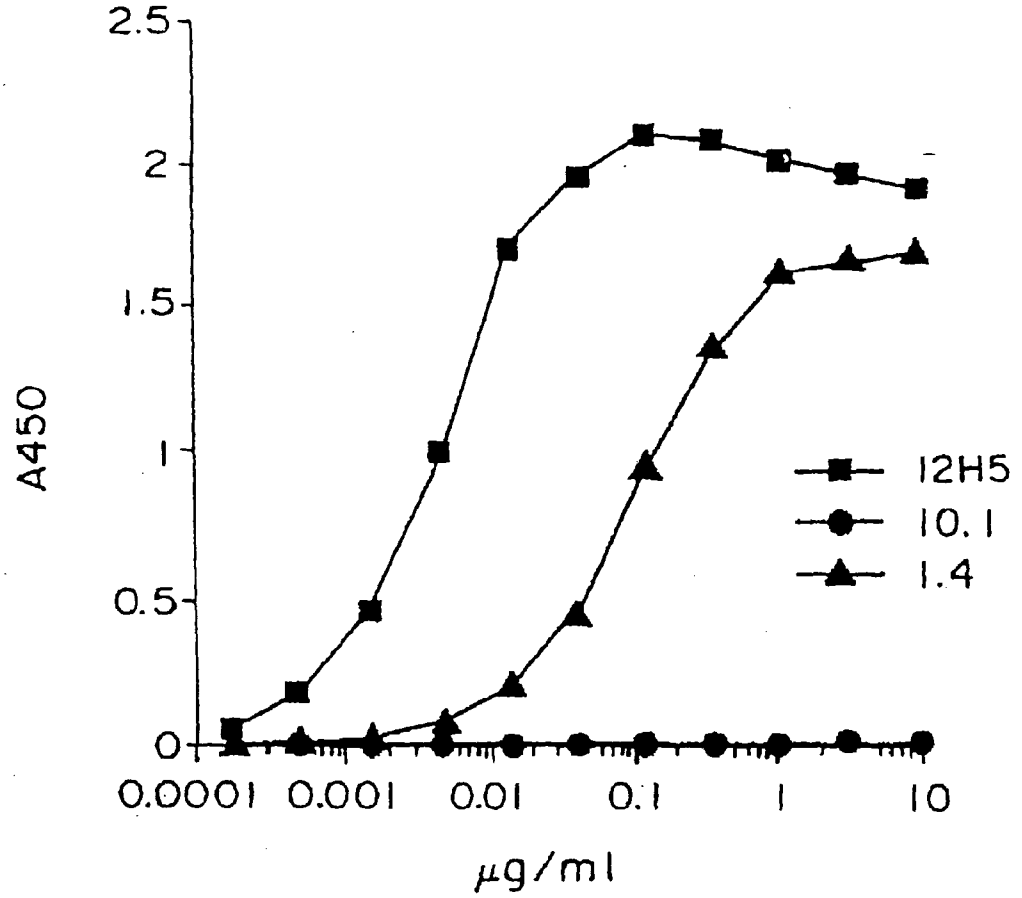

Figure 3

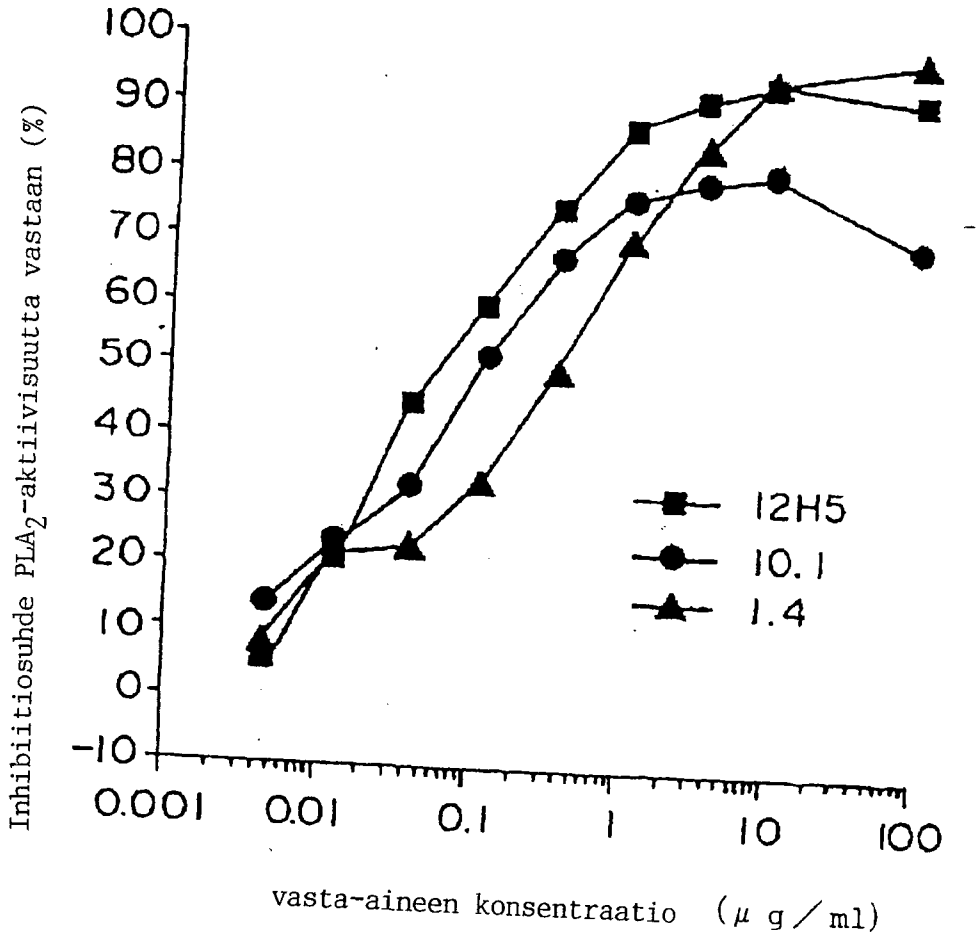
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
12H5
10.1
1.4
Inhibitiosuhde PLA_2-aktiivisuutta vastaan (%)
vasta-aineen konsentraatio (μ g / ml)

Figure 4

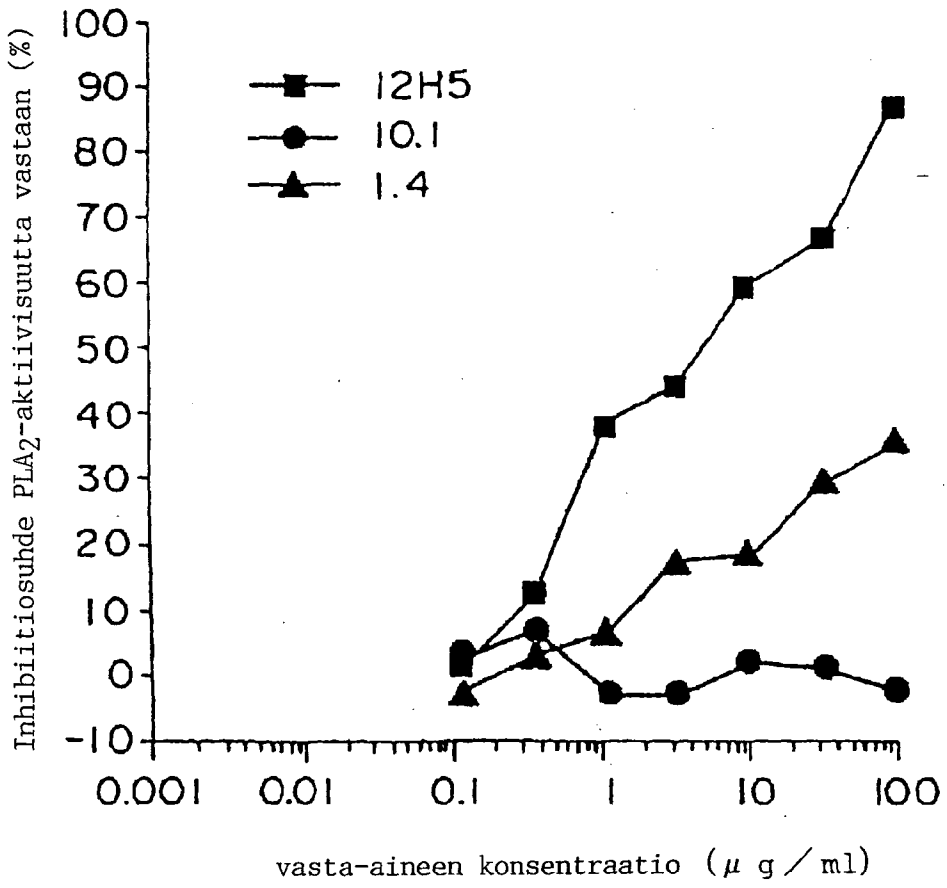
Inhibitiosuhde PLA2-aktiivisuutta vastaan (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
12H5
10.1
1.4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
vasta-aineen konsentraatio (μ g / ml)

Figure 5

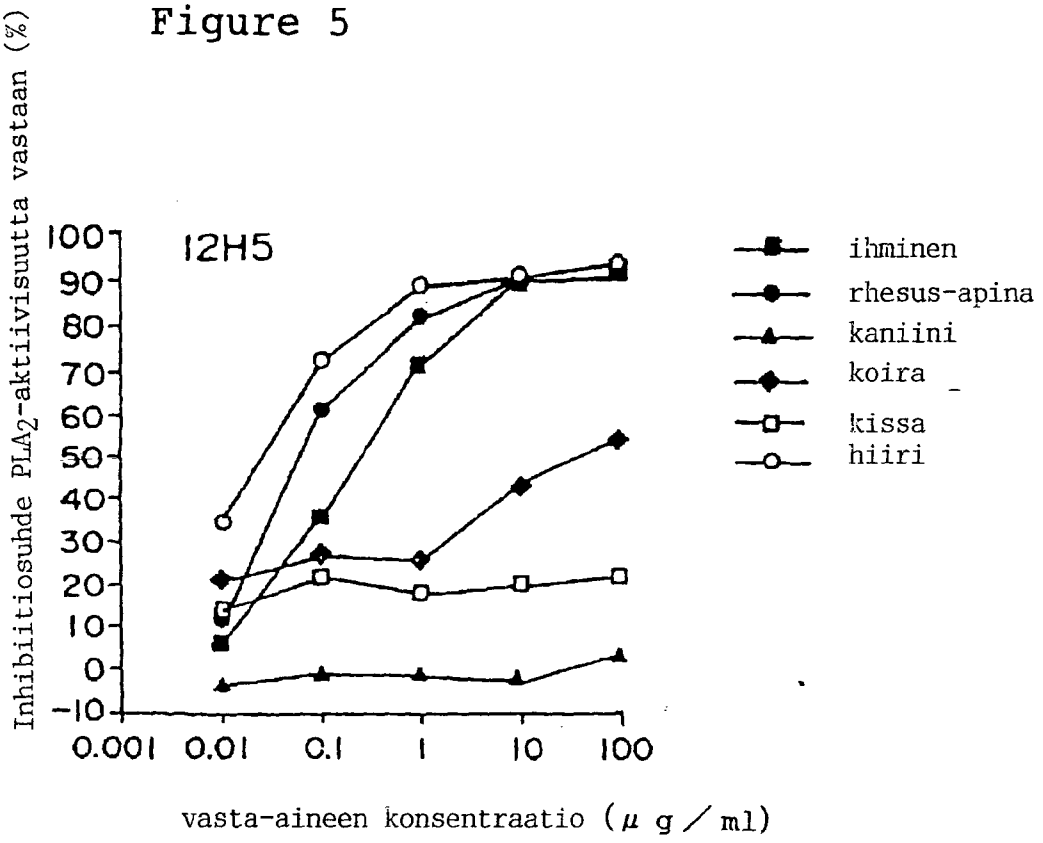
12H5
Inhibitiosuhde PLA_2-aktiivisuutta vastaan (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
vasta-aineen konsentraatio (μ g / ml)
ihminen
rhesus-apina
kaniini
koira
kissa
hiiri

Figure 6

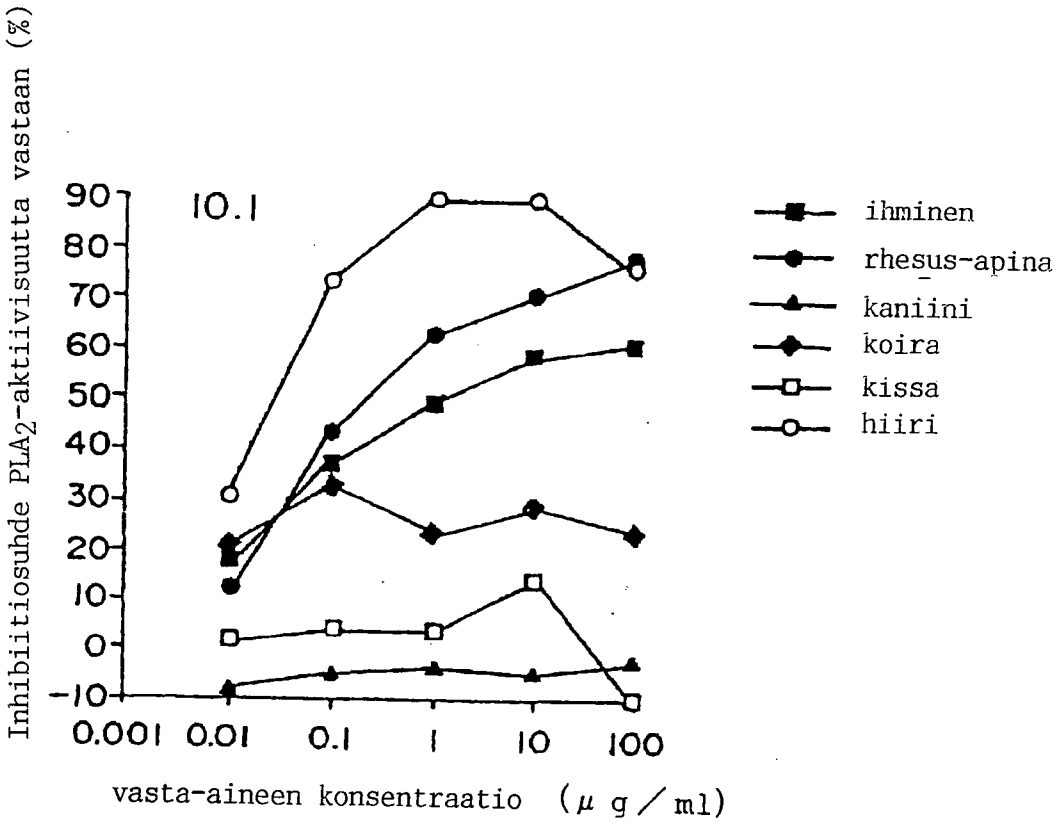
Inhibiitiosuhde PLA_2-aktiivisuutta vastaan (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
10.1
0.001
0.01
0.1
1
10
100
vasta-aineen konsentraatio (μ g / ml)
ihminen
rhesus-apina
kaniini
koira
kissa
hiiri

Figure 7

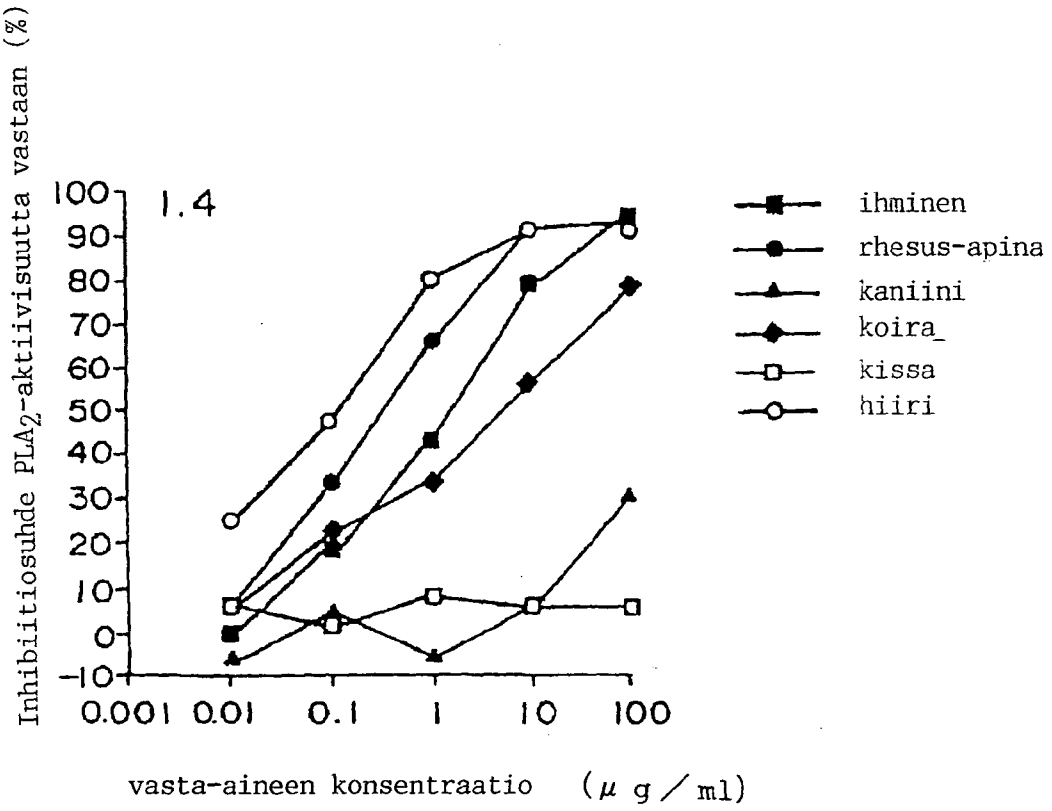
1.4
Inhibitiosuhde PLA_2-aktiivisuutta vastaan (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
vasta-aineen konsentraatio (μg/ml)
ihminen
rhesus-apina
kaniini
koira
kissa
hiiri

Figure 8

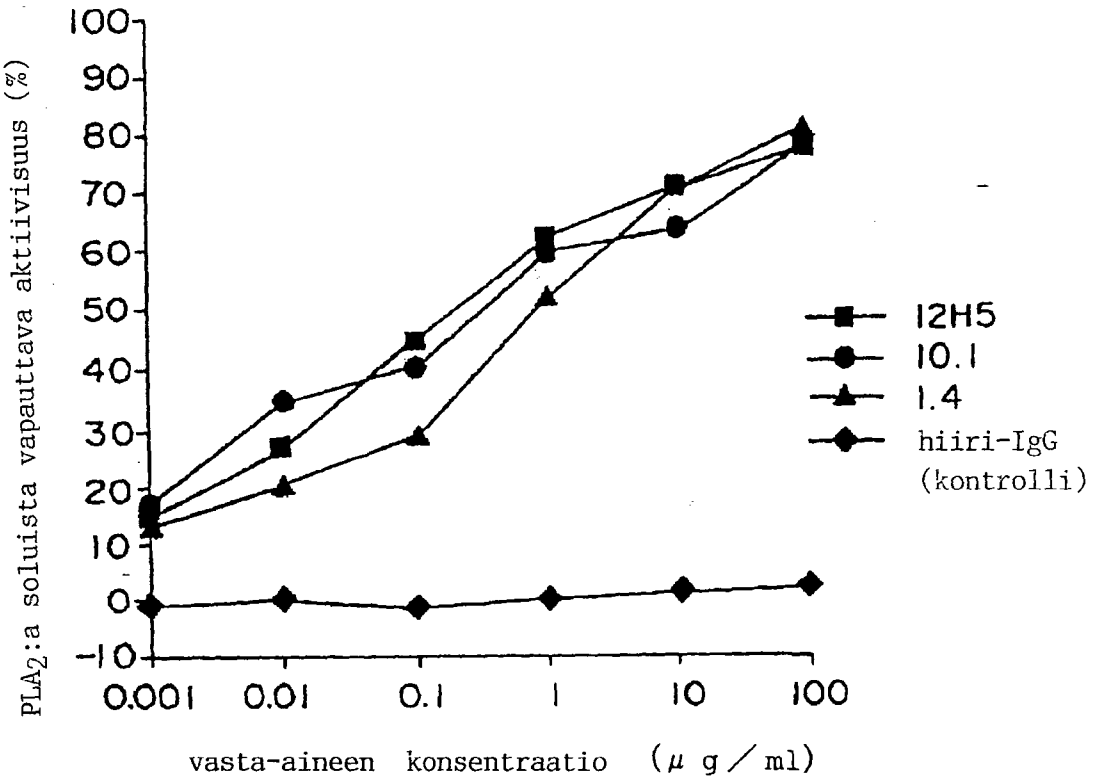
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
PLA2:a soluista vapauttava aktiivisuus (%)
vasta-aineen konsentraatio (μ g / ml)
12H5
10.1
1.4
hiiri-IgG
(kontrolli)

Figure 9

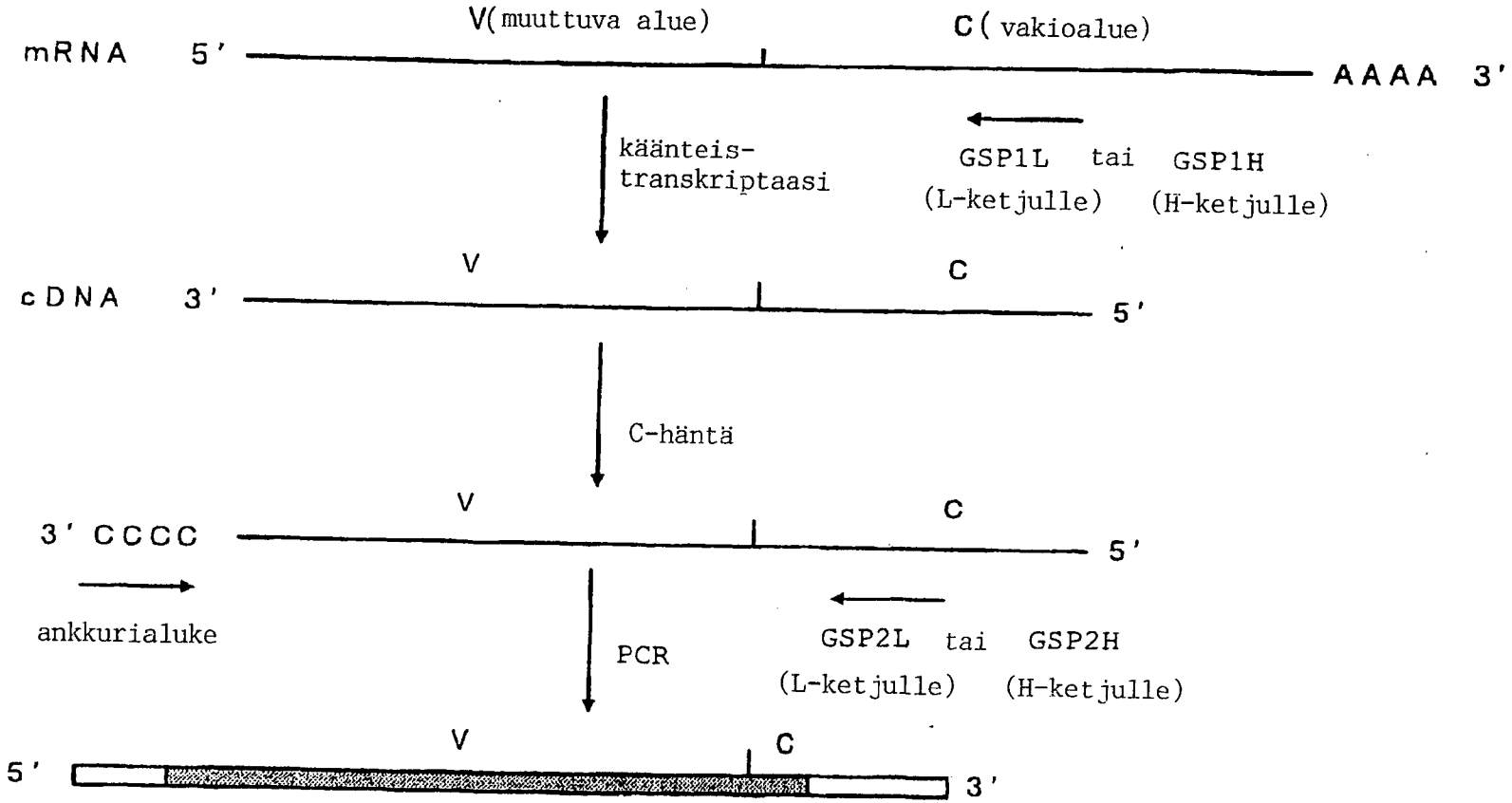
V(muuttuva alue)
C(vakioalue)
mRNA 5'
AAAA 3'
käänteis-
transkriptaasi
GSP1L tai GSP1H
(L-ketjulle) (H-ketjulle)
V
C
cDNA 3'
5'
C-häntä
V
C
3' CCCC
5'
ankkurialuke
PCR
GSP2L tai GSP2H
(L-ketjulle) (H-ketjulle)
V
C
5'
3'

Figure 10

```
ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACAGGT      60
MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuTrpValProGlySerThrGly

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCCTTGGCTGTGTCTTTAGGGCAGAGGGCCACC     120
AspIleValLeuThrGlnSerProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGlnArgAlaThr

ATATCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTGATAGTTATGGCATTAGTTTTATGCACTGGTAT     180
IleSerCysArgAlaSerGluSerValAspSerTyrGlyIleSerPheMetHisTrpTyr

CAGCAGAAACCAGGACAGCCCCCCAAACTCCTCATTTATCGTGCATCCAACCTAGAATCT     240
GlnGlnLysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrArgAlaSerAsnLeuGluSer

GGGATCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGAATTCACCCTCACCATTAAT     300
GlyIleProAlaArgPheSerGlySerGlySerArgThrGluPheThrLeuThrIleAsn

CCTGTGGAGGCTGATGATGTTGCAACCTATCACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCATTC     360
ProValGluAlaAspAspValAlaThrTyrHisCysGlnGlnSerAsnGluAspProPhe

ACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA      393
ThrPheGlySerGlyThrLysLeuGluIleLys
```

Figure 11

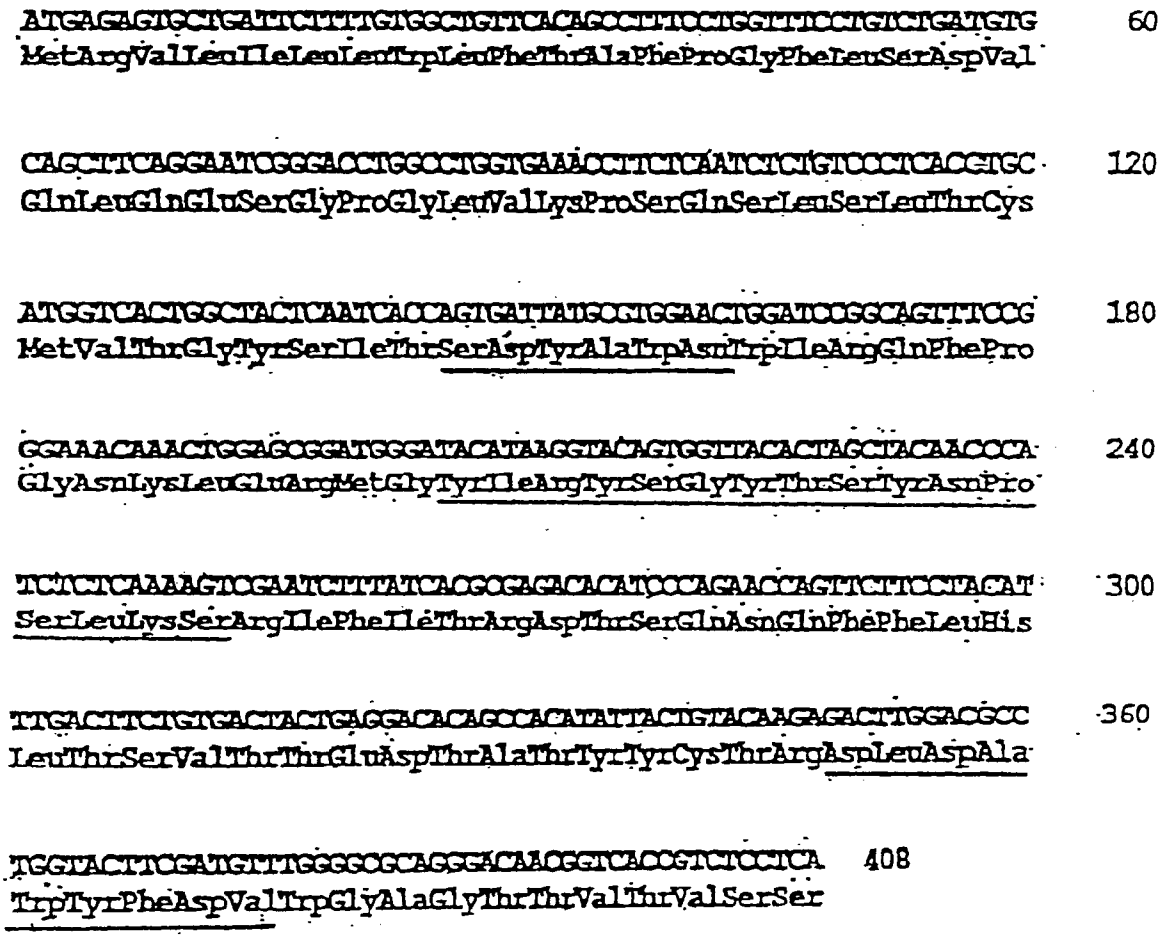
ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTCACAGCCTTCCTGGTTTCCTGTCTGATGTG 60
MetArgValLeuIleLeuLeuTrpLeuPheThrAlaPheProGlyPheLeuSerAspVal
CAGCTTCAGGAATCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAATCTCTGTCCCTCACCTGC 120
GlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValLysProSerGlnSerLeuSerLeuThrCys
ATGGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCG 180
MetValThrGlyTyrSerIleThrSerAspTyrAlaTrpAsnTrpIleArgGlnPhePro
GGAAACAAACTGGAGCGGATGGGATACATAAGGTACAGTGGTTACACTAGCTACAACCCA 240
GlyAsnLysLeuGluArgMetGlyTyrIleArgTyrSerGlyTyrThrSerTyrAsnPro
TCTCTCAAAAGTCGAATCTTTATCACGCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTACAT 300
SerLeuLysSerArgIlePheIleThrArgAspThrSerGlnAsnGlnPhePheLeuHis
TTGACTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTACAAGAGACTTGGACGCC 360
LeuThrSerValThrThrGluAspThrAlaThrTyrTyrCysThrArgAspLeuAspAla
TGGTACTTCGATGTTTGGGGCGCAGGGACAACGGTCACCGTCTCCTCA 408
TrpTyrPheAspValTrpGlyAlaGlyThrThrValThrValSerSer

Figure 12

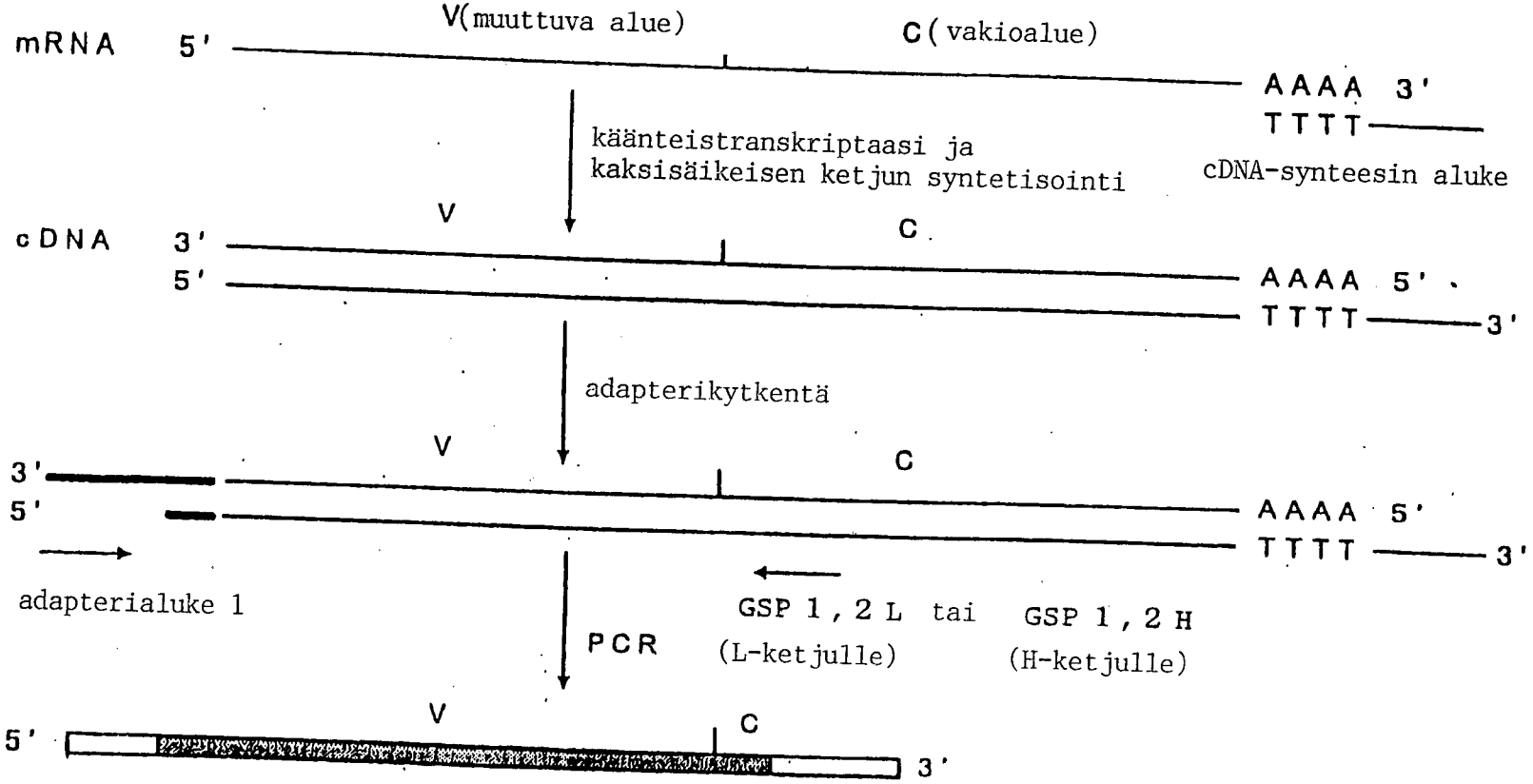
mRNA 5'
V(muuttuva alue)
C(vakioalue)
AAAA 3'
TTTT
käänteistranskriptaasi ja
kaksisäikeisen ketjun syntetisointi
cDNA-synteesin aluke
cDNA 3'
5'
V
C
AAAA 5'
TTTT 3'
adapterikytkentä
3'
5'
V
C
AAAA 5'
TTTT 3'
adapterialuke 1
GSP 1,2 L tai GSP 1,2 H
(L-ketjulle)
(H-ketjulle)
PCR
5'
V
C
3'

Figure 13

```
ATGGAATCACAGACTCTGGTCTTCATATCCATACTGCTCTGGTTATATGGAGCTGATGGG      60
MetGluSerGlnThrLeuValPheIleSerIleLeuLeuTrpLeuTyrGlyAlaAspGly

AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACC     120
AsnIleValMetThrGlnSerProLysSerMetSerMetSerValGlyGluArgValThr

TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTTCCTGGTATCAACAGAAACCA     180
LeuThrCysLysAlaSerGluAsnValValThrTyrValSerTrpTyrGlnGlnLysPro

GAGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCGAT     240
GluGlnSerProLysLeuLeuIleTyrGlyAlaSerAsnArgTyrThrGlyValProAsp

CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCT     300
ArgPheThrGlySerGlySerAlaThrAspPheThrLeuThrIleSerSerValGlnAla

GAAGACCTTGCAGATTATCACTGTGGACAGGGTTACAGCTATCCGTACACGTTCGGAGGG     360
GluAspLeuAlaAspTyrHisCysGlyGlnGlyTyrSerTyrProTyrThrPheGlyGly

GGGACCAAGCTGGAAATAAAA                                             381
GlyThrLysLeuGluIleLys
```

Figure 14

```
ATGGCTGTCCTGGCATTACTTTTTTGCCTGGTAACATTCCCAAGCTGTATCCTTTCCCAG      60
MetAlaValLeuAlaLeuLeuPheCysLeuValThrPheProSerCysIleLeuSerGln

GTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACA     120
ValGlnLeuLysGluSerGlyProGlyLeuValAlaProSerGlnSerLeuSerIleThr

TGTACCGTCTCAGGGTTCTCATTAACCGACTTTGGTGTAAACTGGGTTCGCCAGCCTCCA     180
CysThrValSerGlyPheSerLeuThrAspPheGlyValAsnTrpValArgGlnProPro

GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGACTGATGGAATCACAGACTATAATTCA     240
GlyLysGlyLeuGluTrpLeuGlyMetIleTrpThrAspGlyIleThrAspTyrAsnSer

GTTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTGAAA     300
ValLeuLysSerArgLeuSerIleSerLysAspThrSerLysSerGlnValPheLeuLys

ATGAACAATCTGCAAACTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGCCAGAGATGCATACTAC     360
MetAsnAsnLeuGlnThrAspAspThrAlaArgTyrTyrCysAlaArgAspAlaTyrTyr

GGCTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA           414
GlyPheTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer
```