



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

218 140 B

(21) A bejelentés ügyszám: P 93 03002
(22) A bejelentés napja: 1992. 04. 24.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
095 476/91 1991. 04. 25. JP
032 084/92 1992. 02. 19. JP
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/JP 92/00544
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/19759

(51) Int. Cl.⁷

C 12 P 21/08

C 07 K 16/28

C 12 N 15/13

C 12 P 21/00

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 06. 28.

(72) Feltalálók:

Bendig, Mary Margaret, London (GB)
Jones, Steven Tarran, Radlett, Hertfordshire (GB)
Saldanha, José William, Enfield, Middlesex (GB)
Sato, Koh, Shizuoka (JP)
Tsuchiya, Masayuki, Shizuoka (JP)

(73) Szabadalmas:

Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha, Tokió (JP)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Humán interleukin-6-receptorral szembeni átalakított humán antitest**

KIVONAT

A találmány többek között humán IL-6R elleni, átformált humán antitestre vonatkozik, amely tartalmaz

(A) egy L láncot, amely

- (1) egy humán L lánc C szakaszt; és
- (2) humán L lánc FR-eket és a humán IL-6R elleni egér-monoklonálisantitest L lánc CDR-eket tartalmazó L lánc V szakaszt foglal magában; és

(B) egy H láncot, amely

- (1) egy humán H lánc C szakaszt; és

- (2) humán H lánc FR-eket és a humán IL-6R elleni egér-monoklonálisantitest H lánc CDR-eket tartalmazó H lánc V szakaszt foglal magában.

Mivel az átformált humán antitest legnagyobb részét egy humán antitest és a kevésbé antigén egér CDR-ek képezik, a találmány szerinti átformált humán antitest emberre nézve kevésbé immunogén, azért gyógyászati célokra alkalmazható.

A találmány humán interleukin-6 receptor (IL-6R) elleni egér-monoklonális antitest variábilis (V) szakaszaira, humán IL-6R elleni humán/egér kiméra antitestre és egy olyan átformált humán antitestre vonatkozik, amely egy humán antitestben a humán könnyű lánc (L lánc) V szakasza és a humán nehéz lánc (H lánc) V szakasza komplementeritást meghatározó szakaszai (CDR-ek) egy humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitest CDR-jeivel vannak összeillesztve. A találmány ezenkívül a fenti antitesteket vagy azok egy részét kódoló DNS-ekre is vonatkozik. A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti DNS-t tartalmazó vektorok, főleg expressziós vektorok, és a fenti vektorokkal transzformált vagy transzfektált gazdasejtek is. A találmány tárgyát képezi ezenkívül a humán IL-6R elleni kiméra antitest előállítására szolgáló eljárás, és a humán IL-6R elleni átformált humán antitest előállítására szolgáló eljárás is.

Az interleukin-6 (IL-6) egy többfunkciós citokin, amelyet számos sejt termel. Szabályozza az immunválaszt, az akut fázisreakciókat, és hematopoiezist, és valószínűleg központi szerepet játszik a gazda védekező mechanizmusában. Számos szövetre hat, növekedést indukáló, növekedést gátló és differenciálódást indukáló aktivitást fejt ki a célsejt természetétől függően. Az IL-6 specifikus receptora (IL-6R) limfoid és nem limfoid sejtekben expresszálódik, az IL-6 többfunkciós tulajdonságaival összhangban. Feltételezték, hogy az IL-6 gén abnormalis expressziója számos betegség, főleg az autoimmun betegségek, mesangiális proliferatív glomerulonefritisz és plazmacitóma/mielóma kifejlődésében közrejátszik [lásd Hiranos és munkatársai összefoglalását, *Immunol. Today* 11, 443-449 (1990)]. Kimutatták, hogy a humán mielómasejtek IL-6-ot termelnek és IL-6R-t expresszálnak. Kísérletekben az IL-6 elleni antitest gátolta a mielómasejtek növekedését in vitro, ami azt jelenti, hogy egy autokrin szabályozó hurok működik a humán mielómák onkogenezisében [Kawano és munkatársai, *Nature* 332, 83 (1988)].

Az IL-6R különféle állati sejtek felületén jelen van, specifikusan kötődik az IL-6-hoz, és az IL-6R molekulák számát is meghatározták a sejtfelületen [Taga és munkatársai, *J. Exp. Med.* 196, 967 (1987)]. Ezenkívül, a humán IL-6R-t kódoló cDNS-t klónozták és meghatározták az IL-6R primer szerkezetét [Yamasaki és munkatársai, *Science* 241, 825 (1988)].

Az egérantitestek emberben erősen immunogének, és ezért gyógyászati értékük a humán gyógyászatban korlátozott. Az egérantitestek felezési ideje in vivo emberben viszonylag rövid. Ezenkívül az egérantitestek nem adhatók több dózissal anélkül, hogy ne váltánának ki immunválaszt, ami nemcsak a tervezett hatékonyságot csökkenti, hanem káros allergiás választ is okozhat a betegben.

A fenti problémák megoldására humanizált egérantitestek előállítására szolgáló eljárásokat fejlesztettek ki. Az egérantitestek kétféle módon humanizálhatók. Az egyszerűbb eljárás az, hogy kiméra antitesteket konstruálnak, amelyekben a V szakaszok az eredeti egér-monoklonális antitestből és a C szakaszok a megfe-

lő humán antitestekből származnak. A kapott kiméra antitest tartalmazza az eredeti egérantitest összes V doménjét, és várhatólag ugyanolyan specificitással kötődik az antigénhez, mint az eredeti egérantitest. Ezen túlmenően a kiméra antitestekben a nem humán eredetű proteinszekvencia %-os mennyisége kisebb, és ezért várhatólag kevésbé immunogének, mint az eredeti egérantitest. Noha a kiméra antitestek várhatólag jól kötődnek antigénhez és kevésbé immunogének, még mindig felléphet immunválasz az egér V szakaszokkal szemben [LoBuglio és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4220-4224 (1989)].

Az egérantitestek humanizálásának másik módja bonyolultabb, de jobban csökkenti az egérantitest potenciális immunogenitását. Ezen eljárás szerint az egérantitest V szakaszaiból a komplementaritást meghatározó szakaszokat (CDR-eket) a humán V szakaszokhoz illesztik, ezáltal „átformált” humán V szakaszokat alakítanak ki. Ezeket az átformált humán V szakaszokat kapcsolják azután a humán C szakaszokhoz. A végső, átformált humán antitestben a nem humán proteinekből származó részeket csak ezek a CDR-ek jelentik. A CDR-ek erősen variábilis proteinszekvenciákból állnak. Nem mutatnak fajspecifikus szekvenciákat. Ezen okok miatt az egér CDR-eket hordozó, átformált humán antitest nem lehet erősebben immunogén, mint egy humán CDR-eket tartalmazó, természetes humán antitest.

A fentiekből látható, hogy az átformált humán antitestek várhatólag gyógyászati célokra megfelelnek, de a humán IL-6R elleni, átformált humán antitestek nem ismertek. Ezenkívül nem ismert olyan eljárás, amely univerzálisan alkalmazható lenne bármely speciális antitest esetén átformált humán antitestek előállítására. Ezért egy speciális antigén elleni, teljesen aktív átformált humán antitest előállítására különböző eszközök szükségesek. Noha a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitestek közül a PM1-et és MT18-at már előállították (2-189420 számú japán szabadalmi leírás), és saját munkánk során is előállítottunk humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitesteket (az AUK12-20-at, AUK64-7-et és AUK146-15-öt), nem ismerünk olyan publikációt, amelyben humán IL-6R elleni átformált humán antitestek előállítását ismertetnék.

Azt találtuk, hogy ha a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitesteket egy humán mielóma-sejtvo-nallal transzplantált csupasz egerekbe injektáltuk, a tumor növekedése jelentősen csökkent. Ebből arra következtettünk, hogy az antihumán IL-6 receptorantitest gyógyszerként mielóma kezelésére alkalmas lehet.

A találmány célja a humán IL-6R elleni, kevésbé immunogén antitest előállítása volt. Ennek megfelelően a találmány tárgyát a humán IL-6R elleni, átformált humán antitestek képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a humán/egér kiméra antitestek is, amelyek az átformált humán antitest szerkesztése során alkalmazhatók. A találmány tárgyát képezi ezenkívül az átformált humán antitest egy része, valamint az átformált humán antitest és annak egy része, és a kiméra antitest előállítására szolgáló expressziós rendszerek is.

Közelebbről, a találmány a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitest L láncának V szakaszára, és a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitest H láncának V szakaszára vonatkozik.

A találmány továbbá a humán IL-6R elleni kiméra antitestre vonatkozik, amely magában foglal

- 1) egy, az IL-6R elleni humán L lánc C szakaszát és egy egér-monoklonális antitest L lánc V szakaszát tartalmazó L láncot; és
- 2) egy, a humán IL-6R elleni humán H lánc C szakaszát és egy egér-monoklonális antitest H lánc V szakaszát tartalmazó H láncot.

A találmány tárgyát képezik továbbá a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitestek L lánc V szakaszának CDR-jei; és a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitestek H lánc V szakaszának CDR-jei.

A találmány tárgyát képezi továbbá a humán IL-6R elleni antitest átformált humán L lánc V szakasza, amely tartalmazza

- (1) egy humán L lánc V szakaszának keretrégióit (FR-jeit), és
- (2) a humán IL-6R elleni, egér-monoklonális antitest L lánc V szakaszának CDR-jeit;

valamint a humán IL-6R elleni antitest átformált humán H lánc V szakasza, amely tartalmazza

- (1) egy humán H lánc V szakaszának FR-jeit, és
- (2) egy humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitest H lánc V szakaszának CDR-jeit.

A találmány tárgya továbbá a humán LL-6R elleni antitest átformált humán L lánc, amely tartalmaz

- (1) egy humán L lánc C szakaszt; és
- (2) humán FR-eket és a humán LL-6R elleni egér-monoklonális antitest CDR-eket tartalmazó L lánc V szakaszt;

valamint a humán LL-6R elleni antitest átformált humán H lánc, amely tartalmaz

- (1) egy humán H lánc C szakaszt és
- (2) humán FR-eket és a humán LL-6R elleni, egér-monoklonális antitest CDR-eket tartalmazó H lánc V szakaszt.

A találmány tárgyát képezi továbbá a humán IL-6R elleni, átformált humán antitest, amely tartalmaz

- (A) egy L láncot, amely
 - (1) egy humán L lánc C szakaszt; és
 - (2) humán L lánc FR-eket és a humán LL-6R elleni egér-monoklonális antitest L lánc CDR-eket tartalmazó L lánc V szakaszt foglal magában, és
- (B) egy H láncot, amely
 - (1) egy humán H lánc C szakaszt; és
 - (2) humán H lánc FR-eket és a humán LL-6R elleni, egér-monoklonális antitest H lánc CDR-eket tartalmazó H lánc V szakaszt foglal magában.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti antitest polipeptideket vagy azok egy részét kódoló DNS-ek is.

A találmány továbbá vektorokra vonatkozik, például a fenti DNS-eket tartalmazó expressziós vektorokra.

A találmány tárgyát képezik továbbá a fenti vektorokkal transzformált vagy transzfektált gazdasejtek is.

A találmány tárgyát képezi ezenkívül a humán IL-6R elleni kiméra antitestek előállítására szolgáló el-

járás, valamint a humán IL-6R elleni átformált humán antitest előállítására szolgáló eljárás is.

A leírás ábráit röviden az alábbiakban ismertetjük.

Az 1. ábra humán citomegalovírus (HCMV) promotererősítő rendszert tartalmazó expressziós vektorokat mutat be, amelyek a találmány szerinti antitestpeptidek expresszálására alkalmazhatók.

A 2. ábra grafikusán szemlélteti a találmány szerinti AUK12-20 kiméra antitest humán IL-6R-hoz való kötődési képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A 3. ábra grafikusán szemlélteti a találmány szerinti AUK12-20 kiméra antitest IL-6 humán IL-6R-hez való kötődését gátló képességének vizsgálati eredményeit.

A 4. ábra grafikusán szemlélteti a találmány szerinti PM1a és PM1b kiméra antitestek humán IL-6R-hoz való kötődésének ELISA-vizsgálati eredményeit.

Az 5. ábra grafikusán szemlélteti a találmány szerinti PM1a és PM1b kiméra antitestek IL-6 humán IL-6R-hoz való kötődését gátló képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A 6. ábra az átformált humán PM1 H lánc V szakasz első változatának szerkesztését bemutató diagram.

A 7. ábra az átformált humán PM1 L lánc V szakasz első változatának szerkesztését bemutató diagram.

A 8. ábra szemlélteti a HEF-12h-gtl expressziós plazmid konstruálására szolgáló eljárást, amely humán 1 α növekedési faktor (HEF-1 α) promotererősítő rendszert tartalmaz és H lánc expresszálására alkalmas.

A 9. ábra szemlélteti a HEF-12k-gk expressziós plazmid konstruálására szolgáló eljárást, amely HEF-1 α promotererősítő rendszert tartalmaz, és L lánc expresszálására alkalmas.

A 10. ábra szemlélteti a DHFR-PMh-gt1 expressziós plazmid konstruálására szolgáló eljárást, amely HCMV promotererősítő rendszert és megsokszorozáshoz egy hiányos SV40 promotererősítő szekvenciához kötött dihidrofolát-reduktáz (dhfr) gént tartalmaz, és H lánc expresszálására alkalmas.

A 11. ábra szemlélteti a DHFR-E-RVh-PM1-f expreszsiós plazmid konstruálására szolgáló eljárást, amely EF1 α promotererősítő rendszert és megsokszorozáshoz egy hiányos SV40 promotererősítő szekvenciához kötött dhfr gént tartalmaz, és H lánc expresszálására alkalmas.

A 12. ábra grafikusán mutatja az átformált humán PM1 L lánc V szakasz (a), illetve (b) változatának kötődési képességét a humán IL-6R-hoz.

A 13. ábra grafikusán mutatja az átformált humán PM1 H lánc V szakasz (f) változatának + az átformált PM1 L lánc V szakasz (a) változatának kötődési képességét a humán IL-6R-hoz.

A 14. ábra grafikusán mutatja az átformált humán PM1 H lánc V szakasz (f) változatának + az átformált PM1 L lánc V szakasz (a) változatának IL-6 humán IL-6R-hoz való kötődését gátló képességét.

A 15. ábra mutatja a humán EF1- α promotererősítő rendszert tartalmazó HEF-V_L-gk és HEF-V_H-gt1 expressziós plazmidokat, amelyek L lánc, illetve H lánc expresszálására alkalmasak.

A 16. ábra az átformált humán AUK12–20 antitest L láncának V szakaszát kódoló DNS szerkesztésére szolgáló eljárást mutatja.

A 17. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán AUK12–20 antitest L lánc V szakaszának humán IL–6R-hoz való kötődési képességét ELISA-vizsgálattal. Az ábrán a „standard AUK12–20 (kiméra)” a CHO sejtek által termelt, és nagy mennyiségben tisztított AUK12–20 kiméra antitestet jelenti.

A 18. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán AUK12–20 antitest [L lánc (a) változat + H lánc (b) változat] humán IL–6R-hoz való kötődési képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A 19. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán AUK12–20 antitest [L lánc (a) változat + H lánc (d) változat] humán IL–6R-hoz való kötődési képességének ELISA-vizsgálattal kapott eredményeit.

A 20. ábra egy átformált humán sle1220H antitest H lánc V szakasz kémiai szintézisét szemlélteti.

A 21. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán sle1220 antitest [L lánc (a) változat + H lánc (a) változat] IL–6 humán IL–6R-hoz való kötődését gátló képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A 22. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán sle1220 antitest [L lánc (a) változat + H lánc (b) változat] IL–6 humán IL–6R-hoz való kötődését gátló képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A 23. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán sle1220 antitest [L lánc (a) változat + H lánc (c) változat] IL–6 humán IL–6R-hoz való kötődését gátló képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A 24. ábra grafikusán mutatja egy átformált humán sle1220 antitest [L lánc (a) változat + H lánc (d) változat] IL–6 humán IL–6R-hoz való kötődését gátló képességének ELISA-vizsgálati eredményeit.

A találmány előnyös megvalósítási módjait alábbiakban ismertetjük.

Egér V régiókat kódoló DNS klónozása

A humán IL–6R elleni egér-monoklonális antitest V szakaszait kódoló DNS klónozására génforrásként meg kell szerkeszteni egy, a humán IL–6R elleni monoklonális antitestet termelő hibridómát. Ami a fenti hibridómát illeti, a 2–189420 számú japán szabadalmi leírás ismerteti egy PM1 monoklonális antitestet termelő PM1 egér hibridómát, és annak tulajdonságait. Az alábbi 1. és 2. referenciapéldákban leírjuk a PM1 hibridóma előállítására szolgáló eljárást. Megszerkesztettük az AUK12–20, AUK64–7 és AUK146–15 hibridómát, amelyek mindegyike humán IL–6R elleni egér-monoklonális antitestet termel. A fenti hibridómák előállítására szolgáló eljárást a 3. referenciapéldában ismertetjük.

Az egér-monoklonális antitest V szakaszait kódoló kívánt DNS-ek klónozására a hibridómasejteket homogenizáljuk, és ismert módon kinyerjük az összes RNS-t [Chirgwin és munkatársai, *Biochemistry* 18, 5294 (1977)]. Ezután ezt az összes RNS-t alkalmazzuk egy-szálú cDNS-ek szintetizálására J. W. Larrick és munkatársai módszere szerint [Biotechnology 7, 934 (1989)].

Ezt követően a cDNS valamely releváns részét specifikusan megsokszorozzuk polimeráz-láncreakciós mód-

szer (PCR) alkalmazásával. Valamely egér-monoklonális antitest kappa típusú L lánc V régiójának megsokszorozására 5'-terminális primerként 11 oligonukleotid primert [Egér Kappa Variábilis (Mouse Kappa Variable); MKV: 1–11. számú szekvencia], és 3'-terminális primerként 1 oligonukleotid primert [Egér Kappa Konstans (Mouse Kappa Constant); MKC: 12. számú szekvencia] alkalmazzunk. Az MKV primerek az egér kappa típusú L lánc szignálszekvenciáját kódoló DNS-szekvenciával hibridizálnak, és az MKC primer az egér kappa típusú L lánc konstans szakaszát kódoló DNS-szekvenciával hibridizál. Az egér-monoklonális antitest H lánc V szakaszának megsokszorozására 5'-terminális primerként 10 oligonukleotid primert [Egér Nehéz Variábilis (Mouse Heavy Variable); MHV: 13–22. számú szekvencia], 3'-terminális primerként 1 oligonukleotid primert [Egér Nehéz Konstans (Mouse Heavy Constant); MHC: 23. számú szekvencia] alkalmazzunk.

Megjegyezzük, hogy az 5'-terminális primerek 5'-végük közelében a GTCGAC nukleotidszekvenciát tartalmazzák, amely egy Sall restrikciós endonukleáz hasítási helyet biztosít; és a 3'-terminális primer 5'-vége közelében a CCCGGG nukleotidszekvenciát tartalmazza, amely egy XmaI restrikciós endonukleáz hasítási helyet biztosít. Ezeket a restrikciós endonukleáz hasítási helyeket alkalmazzuk a variábilis szakaszt kódoló DNS-fragmensek klónozóvektorokba való szubklónozásához.

A következő lépésben a sokszorozással kapott terméket Sall és XmaI restrikciós enzimmal hasítjuk, így egy egér-monoklonális antitest kívánt V szakaszát kódoló DNS-fragmenst kapunk. Másrészről egy megfelelő klónozóvektort, például a pUC19 plazmidot ugyanazzal a Sall és XmaI restrikciós enzimmal hasítjuk, és a fenti DNS-fragmenst a hasított pUC19-cel ligáljuk, így olyan plazmidot kapunk, amely egy egér-monoklonális antitest kívánt V szakaszát kódoló DNS-fragmenst tartalmaz.

A klónozott DNS-szekvenciájának meghatározását szokásos módon végezhetjük.

A kívánt DNS klónozását, és szekvenciájának meghatározását részletesen ismertetjük az 1–3. példában.

Komplementaritást meghatározó szakaszok (CDR-ek)

A találmány vonatkozik a találmány szerinti V szakaszok hipervariábilis vagy komplementaritást meghatározó szakaszaira (CDR-ekre) is, vagyis az egyes L és H láncpárok V doménjeire az antigénköthető helyről. Az L és H láncban lévő domének általános szerkezete azonos, minden egyes domén négy keretszakaszt (FR) tartalmaz, amelyek szekvenciája viszonylag megőrződik, és ezeket három CDR kapcsolja össze (lásd Kabat E. A., Wu T. T., Bilofsky H., Reid-Miller M. és Perry H., „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, US Dept. Health and Human Services (1983)). A négy FR nagyrészt β -lapkonformációt vesz fel, és a CDR-ek az FR-eket összekötő hurkokat képeznek, és bizonyos esetekben a β -lapp szerkezet részét képezik. Az FR-ek által szorosan összetartott CDR-ek a másik domén CDR-jeivel együtt részt vesznek az antigénköthető hely kialakításában. A CDR-eket a 4. példában ismertetjük.

Kiméra antitestek szerkesztése

A humán IL–6R elleni antitest átformált humán V szakaszainak megtervezése előtt be kell bizonyítani, hogy az alkalmazandó CDR-ek valóban működőképes antigénköti szakaszt képeznek. Ezen célból kiméra antitesteket szerkesztettünk. Ezenkívül az 1. és 2. példa szerinti négy egér-monoklonális antitest klónozott DNS-einek nukleotidszekvenciájából várható egér anti-humán IL–6R V szakaszok aminosavszekvenciáit összehasonlítottuk egymással és az ismert egér és humán antitestek V szakaszaival. Mind a négy egér-monoklonális antitest esetén egy sorozat tipikus, funkcionális egér L és H lánc V szakaszt klónoztunk. A négy egér anti-IL–6R antitest közül azonban mindegyik viszonylag egyedül V szakasszal rendelkezett. A négy antitest egymásnak nem egyszerű, kismértékben eltérő variánsa volt. A klónozott egérszakaszok alkalmazásával négy kiméra anti-IL–6R-t szerkesztettünk.

A kiméra antitest szerkesztésének alapeljárása abból áll, hogy összekapcsoljuk a PCR-klónozott cDNS-ekben található egér szignál- és V szakasz szekvenciákat az emlősejt-expressziósvektorokban már jelen lévő, humán C szakaszt kódoló szekvenciával. Egy kiméra antitest szerkesztését a fenti négy monoklonális antitest közül az AUK12–20 monoklonális antitestből az 5. példában ismertetjük.

Kiméra antitest szerkesztését a PM1 monoklonális antitestből a 6. példában ismertetjük. Az egér PM1 kappa típusú L lánc szignálszekvenciát és V szakaszt kódoló cDNS-t a humán kappa típusú C szakaszt kódoló, genomiális DNS-t tartalmazó expressziós vektorba szubklónozzuk PCR-módszerrel. Az egér PM1 H lánc szignálszekvenciát és V szakaszokat kódoló cDNS-t a humán gamma-l-típusú C szakaszt kódoló genomiális DNS-t tartalmazó expressziós vektorba szubklónozzuk PCR-módszerrel. Speciálisan tervezett PCR primereket alkalmazva az egér PM1 V szakaszt kódoló cDNS 5'- és 3'-végét úgy módosítjuk, hogy (1) azok expressziós vektorokba könnyen inszertálhatók legyenek, és (2) azok a fenti expressziós vektorokban megfelelően működjenek. A PCR-módosított egér PM1 V szakaszokat ezután a kívánt humán C szakaszokat már tartalmazó HCMV expressziós vektorokba inszertáljuk (1. ábra). Ezek a vektorok számos emlősejtvonalban alkalmasak genetikailag módosított antitestek átmeneti vagy stabil expressziójára.

Azonkívül, hogy szerkesztettünk egy olyan kiméra PM1 antitestet, amelynek V szakaszai azonosak az egér PM1 antitest V szakaszaival [(a) változat], egy másik kiméra PM1 antitestet is szerkesztettünk [(b) változat]. A PM1 kiméra antitest (b) változatában az L lánc V szakaszának 107. helyzetű aminosavját aszparaginról lizinre cseréltük. Az egér PM1 antitestből származó L lánc V szakaszát más egér L lánc V szakaszokkal összehasonlítva azt találtuk, hogy a 107-es helyzetben szokatlan az aszparagin jelenléte. Az egér kappa típusú L lánc V szakaszokban leggyakoribb aminosav 107-es helyzetben a lizin. Annak érdekében, hogy kiértékeljük annak jelentőségét, hogy az egér PM1 antitest L lánc V szakaszában 107-es helyzetben egy szokatlan aminosav, aszpa-

ragin van, a 107-es helyzetű aminosavat a tipikus aminosavra, vagyis lizinre cseréltük. Ezt a cserét PCR-mutagenézis módszerrel értük el [Kamman M. és munkatársai, Nucl. Acids Res. 17, 5404 (1989)], amellyel végrehajtottuk az L lánc V szakaszt kódoló DNS-szekvenciában a szükséges változtatásokat.

A kiméra PM1 antitest (a) változata rendelkezik a humán IL–6R-hoz való kötődési aktivitással. A kiméra PM1 antitest (b) változata is kötődik a humán IL–6R-hoz, ugyanúgy, mint az (a) változat. Hasonló módon két másik monoklonális antitestből, az AUK64–7-ből és az AUK146–15-ből is szerkesztettünk kiméra antitesteket. Mind a négy kiméra antitest jól kötődött a humán IL–6R-hoz, ezáltal a funkció vizsgálatával igazoltuk, hogy a helyes egér V szakaszokat klónoztuk és szekvenáltuk.

A négy egér anti-IL–6R antitest közül a PM1 antitestet választottuk elsőként a humán IL–6R elleni átformált humán antitest megtervezésére és szerkesztésére. Az egér PM1 antitestet főleg az egér anti-IL–6R antitestek csupasz egérbe transzplantált humán mielóma tumorsejtekre kifejtett hatásának vizsgálati eredményei alapján választottuk ki a fenti célra. A négy egér anti-IL–6R antitest közül a PM1 antitest mutatta a legerősebb tumorsejt elleni aktivitást.

PM1 egér monoklonális antitestből származó V szakaszok összehasonlítása ismert egér és humán antitestekből származó V szakaszokkal

Olyan átformált humán antitest szerkesztésére, amelyben egy egér-monoklonális antitest CDR-jei vannak egy humán monoklonális antitestbe illesztve, nagymértékű homológia kívánatos az egér-monoklonális antitest FR-jei és a humán monoklonális antitest FR-jei között. Ezért az egér PM1 antitestből származó L és H láncok V szakaszainak aminosavszekvenciáit az OWL (vagy Leeds) proteinszekvencia-adatbázisból ismert összes ismert humán és egér V szakasz szekvenciájával összehasonlítottuk.

Az egérantitest V szakaszát tekintve a PM1 antitest L lánc V szakasza a legnagyobb mértékben a musigkcko egérantitest L lánc V szakaszához hasonlított [Chen H. T. és munkatársai, J. Biol. Chem. 262, 13 579–13 583 (1987)], a homológia 93,5% volt. A PM1 antitest H lánc V szakasza a legnagyobb mértékben a musigvhr2 egérantitest H lánc V szakaszához hasonlított [Grant F. J. és munkatársai, Nucl. Acids Res. 15, 5496 (1987)], a homológia 84,0% volt. Az egér PM1 V szakaszok nagy %-ban analógnak bizonyultak az ismert egér V szakaszokkal, jelezvén, hogy a PM1 V szakaszok tipikus egér V szakaszok. Ez további közvetett bizonyítékot jelent arra, hogy a klónozott DNS-szekvenciák helyesek. Az L láncok V szakaszai között általában nagyobb a %-os azonosság, mint a H láncok V szakaszai között. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy általában kisebb mértékű eltérés figyelhető meg az L-lánc V szakaszokban, mint a H-lánc V szakaszokban.

A humán antitestekből származó V szakaszokat tekintve a PM1 antitest L lánc V szakasza a legnagyobb mértékben a klhure (REI-ként is ismert) humán antitest L lánc V szakaszához hasonlított [Palm W. és munka-

társai, *Physiol. Chem.* 356, 167–191 (1975)], a homológia 72,2% volt. A PM1 antitest H lánc V szakasza a legnagyobb mértékben a humighvap (VAP) humán antitest H lánc V szakaszához hasonlított [Schroeder H. W. és munkatársai, *Science* 238, 791–793 (1987)], a homológia 71,8% volt. A humán V szakaszokkal való összehasonlítás a legfontosabb ahhoz, hogy megtervezhesük az átformált humán antitesteket az egér PM1 antitestből. A humán V szakaszokkal való %-os azonosság kisebb, mint az egér V szakaszokkal való %-os azonosság. Ez közvetett bizonyítékát jelenti annak, hogy az egér PM1 V szakaszok valóban egér V szakaszokhoz, és nem humán V szakaszokhoz hasonlítanak. Ez a bizonyíték azt is jelenti, hogy legjobb lenne az egér PM1 V szakaszokat humanizálni, hogy humán betegek esetén az immunogenitás problémáját kiküszöböljük.

A PM1 egerantitestből származó V szakaszokat a humán V szakasz különböző alcsoportjaira Kabat E. A. és munkatársai által definiált konszenzusszekvenciákkal [Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4. kiadás, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office (1987)] is összehasonlítottuk. Az eredményeket az 1. táblázatban ismertetjük.

1. táblázat

Egér PM1 V szakaszokból származó FR-ek és humán V szakaszok különböző alcsoportjainak konszenzusszekvenciáiból származó FR-ek %-os azonossága

A. L lánc V szakaszaiban lévő FR-ek			
HSGI	HSGII	HSGIII	HSGIV
70,1	53,3	60,7	59,8
B. H lánc V szakaszaiban lévő FR-ek			
HSGI	HSGII	HSGIII	
44,1	52,9	49,2	

¹ A konszenzusszekvenciákat a humán V szakaszok alcsoportjaiból vettük, Kabat és munkatársai (1987) leírása szerint.

Az egér PM1 L lánc V szakaszból származó FR-ek a humán L lánc V szakaszainak I. alcsoportjára definiált konszenzusszekvenciából (HSGI) származó FR-ekhez hasonlítottak leginkább, az azonosság 70,1% volt. Az egér PM1 H lánc V szakaszból származó FR-ek a humán H lánc V szakaszainak II. alcsoportjára definiált konszenzusszekvenciából (HSGII) származó FR-ekhez hasonlítottak leginkább, az azonosság 52,9% volt. Ezek az eredmények alátámasztják az ismert humán antitestekkel való összehasonlításból származó eredményeket. A humán REI L lánc V szakasza a humán L lánc V szakaszok I. alcsoportjához, és a humán VAP H lánc V szakasza a humán H lánc V szakaszok II. alcsoportjához tartozik.

A humán antitestek V szakaszaival való fenti összehasonlításokból lehetőség nyílik olyan humán V szakaszok szelektálására, amelyek alapját képezik az átformált humán PM1 V szakaszok tervezésének. Legelőnyösebb lenne az I. alcsoportozhoz (SGI) tartozó humán L

lánc V szakaszt alkalmazni az átformált humán PM1 L lánc V szakasz tervezésére, és a II. alcsoportozhoz (SGII) tartozó humán H lánc V szakaszt alkalmazni az átformált humán PM1 H lánc V szakasz tervezéséhez.

5 Átformált humán PM1 variábilis szakaszok tervezése

Az átformált humán PM1 V szakaszok tervezésének első lépéseként olyan humán V szakaszokat szelektáltunk, amelyek a tervezés alapját képezhetik. Az egér PM1 L lánc V szakaszban lévő FR-ek legjobban az I. alcsoportozhoz tartozó humán L lánc V szakaszok FR-jeihez hasonlítottak (1. táblázat). Amint fent említettük, az egér PM1 L lánc V szakaszt ismert humán L lánc V szakaszokkal összehasonlítva az legjobban a REI humán L lánc V szakaszhoz, a humán L lánc V szakaszok I. alcsoportjának egyik tagjához hasonlított. Az átformált humán PM1 L lánc V szakaszok tervezésében a REI-ből származó FR-eket alkalmaztuk. Ezenkívül REI FR-eket alkalmaztunk kiindulási anyagként az átformált humán PM1 L lánc V szakasz szerkesztésére is.

A fenti REI-alapú humán FR-ekben öt eltérés volt az eredeti humán REI-ben lévő FR-ektől (a 39-es, 71-es, 104-es, 105-ös és 107-es helyzetben Kabat és munkatársai (1987) szerint, lásd 2. táblázatot). Az FR4-ben lévő három eltérés (104-es, 105-ös és 107-es helyzetben) egy másik humán, kappa típusú L láncból származó J szakaszon alapult, ezért nem jelentett eltérést a humántól [Riechmann L. és munkatársai, *Nature* 322, 21–25 (1988)]. A 39-es és 71-es helyzetben lévő két eltérés a patkány CAMPATH–1 L lánc V szakasz FR-jeiben talált aminosavakhoz jelentett visszatérést.

Az átformált humán PM1 L lánc V szakasz két változatát terveztük meg. Az első változatban [(a) változat] a humán FR-ek azonosak voltak az átformált humán CAMPATH–1H-ban (Riechmann és munkatársai, 1988) lévő, REI-alapú FR-ekkel, és az egér CDR-ek azonosak voltak az egér PM1 L lánc V szakaszban lévő CDR-ekkel. A második változat [(b) változat] az (a) változattal azonos, egyetlen aminosaveltéréstől eltekintve a humán FR3 71-es helyzetében. A 71-es helyzetű maradék az L lánc V szakasz CDR1-jére Chothia és munkatársai [J. Mol. Biol. 196, 901–917 (1987)] által definiált kanonikus szerkezet része. Az ebben a helyzetben lévő aminosav várhatóan közvetlen befolyással bír az L lánc V szakasz CDR1 hurokjának szerkezetére, és ezért befolyásolhatja az antigénkötődést. Az egér PM1 L lánc V szakaszában a 71-es helyzetben tirozin van. Az átformált humán PM1 L lánc V szakasz (a) változatának megtervezésében alkalmazott, módosított REI FR-ekben a 71-es helyzetben fenil-alanin található. Az átformált humán PM1 L lánc V szakasz (b) változatában a 71-es helyzetű fenil-alanint tirozinra cseréltük, amint az az egér PM1 L lánc V szakaszában található. A 2. táblázatban látható az egér PM1 L lánc V szakasz aminosavszekvenciája, a REI FR-ek aminosavszekvenciája, az átformált humán CAMPATH–1H antitestben való alkalmazásra módosított formában (Riechmann és munkatársai, 1988) és az átformált humán PM1 L lánc V szakasz két változatának aminosavszekvenciája.

2. táblázat

Átformált humán pM1 L lánc V szakasz két változatának tervezése

FR1										CDR1				
1					2					3				
12345678901234567890123										45678901234				
V _L PM-1	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISC										RASQDISSYLN			
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC													
RV _L a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC										RASQDISSYLN			
RV _L b	-----										-----			

FR2										CDR2				
4										5				
567890123456789										0123456				
V _L PM-1	WYQQKPDGTIKLLIY										YTSRLHS			
REI	WYQQKPGKAPKLLIY													
RV _L a	WYQQKPGKAPKLLIY										YTSRLHS			
RV _L b	-----										-----			

FR3										CDR3										
6					7					8					9					
78901234567890123456789012345678										901234567										
V _L PM-1	GVPSRFSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFC										QQGNTLPYT									
REI	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYC																			
RV _L a	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYC										QQGNTLPYT									
RV _L b	-----Y-----										-----									

FR4																				
10																				
8901234567																				
V _L PM-1	FGGGTKLEIN																			
REI	FGQGTKVEIK																			
RV _L a	FGQGTKVEIK																			
RV _L b	-----																			

Megjegyzés: a REI-re megadott FR-ek azok, amelyek az átformált humán CAMPATH-1H antitestben találhatóak (Riechmann és munkatársai, 1988). Az öt aláhúzott aminosavmaradék a REI FR-ekben azok, amelyek különböznek a humán REI aminosavszekvenciától [Palm és munkatársai, 1975; Epp és munkatársai, Biochemistry 14, 4943–4952 (1975)].

Az egér PM1 H lánc V szakaszában lévő FR-ek legjobban a II. alcsoportba tartozó humán H lánc V szakaszok FR-jeihez hasonlítottak (1. táblázat). Mint fent említettük, az egér PM1 H lánc V szakasz ismert humán H lánc V szakaszokkal való összehasonlításakor az legjobban a VAP humán H lánc V szakaszhoz, a humán H lánc V szakaszok II. alcsoportjának egyik tagjához hasonlított. Az átformált humán PM1 H lánc V szakasz szerkesztésére kiindulási anyagként, és az átformált humán PM1 H lánc V szakasz tervezésére alapként a

NEW humán H lánc V szakaszban, a humán H lánc V szakaszok II. alcsoportjának egy másik tagjában lévő FR-eket kódoló DNS-szekvenciákat alkalmaztuk.

Az átformált humán PM1 H lánc V szakasz hat változatát terveztük meg. Mind a hat változatban a humán FR-ek az átformált humán CAMPATH-1H-ban (Riechmann és munkatársai, 1988) jelen lévő NEW FR-eken alapultak és az egér CDR-ek az egér PM1 H lánc V szakaszban lévő CDR-ekkel azonosak voltak. Hét aminosavmaradékot azonosítottunk a humán

3. táblázat (folytatás)

RV_ge		
RV_gf	-----R-----	
	CDR3	FR4
	10	11
	5678900012	34567890123
	AB	
V_gPM-1	SLARTTAMDY	WGQGTSVTVSS
NEW		WGQGSLVTVSS
RV_ga	SLARTTAMDY	WGQGSLVTVSS
RV_gb	-----	-----
RV_gc	-----	-----
RV_ge	-----	-----
RV_ge	-----	-----
RV_gf	-----	-----

Megjegyzés: a NEW-ra megadott FR-ek azok, amelyek az átformált humán CAMPATH-1H antitest (Riechmann és munkatársai, 1988) első változatában találhatók.

Átformált humán PM1 V szakaszok szerkesztése

Az átformált humán PM1 első változatában az L lánc és H lánc V szakaszokat mind egy új, PCR-en alapuló eljárást alkalmazva szerkesztettük meg. Lényegében az átformált humán V szakaszt kódoló plazmid DNS-t – amely már tartalmazza a megfelelő humán FR-eket – módosítottuk PCR-primereket alkalmazva a kiindulási átformált humán V szakaszban lévő CDR-ek egér PM1 antitestből származó CDR-ekkel való helyettesítésére. Az átformált humán PM1 L lánc V szakasz szerkesztésére kiindulási anyagként az átformált humán D1.3 L lánc V szakaszt tartalmazó DNS-plazmidot alkalmaztuk. Az átformált humán D1.3 L lánc V szakaszt a humán REI L lánc V szakaszában lévő FR-ek alapján szerkesztettük meg. Az átformált humán PM1 H lánc V szakasz szerkesztésére kiindulási anyagként az átformált humán D1.3 H lánc V szakaszt tartalmazó DNS-plazmidot alkalmaztuk. Az átformált humán D1.3 H lánc V szakaszt a humán NEW H-lánc V szakaszban lévő FR-ek alapján szerkesztettük meg [Verhoeyen M. és munkatársai, Science 239, 1534–1536 (1988)].

Miután szelektáltuk a kívánt humán FR-eket tartalmazó kiindulási DNS-plazmidokat, PCR-primereket terveztünk, amelyek képesek az egér PM1 CDR-ekkel helyettesíteni az egér D1.3 CDR-eket. Mindegyik átformált humán PM1 V szakaszhoz három, az egér PM1 CDR-eket kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazó primert és kettő, az átformált humán V szakaszt kódoló teljes DNS-szekvenciát határoló primert terveztünk és szintetizáltunk. Az öt PCR-primert PCR-reakciók sorozatában alkalmazva olyan PCR-terméket kaptunk, amely a kiindulási átformált humán V szakaszban jelen lévő FR-ekből és az egér PM1 V szakaszban jelen lévő CDR-ekből állt (lásd 7. példa, és 7. és 8. ábra). A PCR-termékeket klónoztuk és szekvenciájának meghatározá-

sával bizonyítottuk, hogy az átformált humán PM1 L lánc és H-lánc V szakasz (a) változatának teljes DNS-szekvenciája a helyes aminosavszekvenciát kódolja (55. számú szekvencia).

30 Az átformált humán PM1 V szakasz többi változatát az ismert PCR-mutagenézis módszerek (Kamman és munkatársai, 1989) kis módosításaival szerkesztettük meg. Amint azt az átformált humán PM1 V szakaszok tervezésével kapcsolatban említettük, az átformált hu-
35 mán PM1 L lánc V szakaszra egy további változatot [(b) változat], az átformált humán PM1 H lánc V szakaszra pedig további öt változatot [(b), (c), (d), (e), és (f), változat] szerkesztettünk. Ezek a további változatok számos kisebb módosítást tartalmaznak az első változat-
40 hoz képest. Az aminosavszekvenciák fenti kisebb eltéréseit PCR-mutagenézis alkalmazásával értük el, a DNS-szekvenciákban kis változtatásokat végrehajtva. A PCR-primereket úgy terveztük, hogy azokkal a szükséges változtatásokat idézzük elő a DNS-szekvenciá-
45 ban. A PCR-reakciók sorozatos lejátszása után a kapott PCR-terméket klónoztuk és szekvenciáját meghatároztuk annak bizonyítására, hogy a DNS-szekvencia változásai a tervezett módon mentek végbe. Az átformált humán PM1 antitest H lánc V szakasz (f) változatának
50 szekvenciáját az 54. számú szekvencia mutatja.

Miután az átformált humán PM1 V szakaszok különböző változatainak DNS-szekvenciáját szekvencia-
meghatározással igazoltuk, az átformált humán PM1 V
55 szakaszokat humán C szakaszokat már tartalmazó emlőssejt-expressziós vektorokba szubklónoztuk. Az átformált humán PM1 L lánc V szakaszokat a humán kappa C szakaszt kódoló DNS-szekvenciához kapcsol-
tuk. Az átformált humán PM1 H lánc V szakaszokat a humán gamma-1 C szakaszt kódoló DNS-szekvenciá-
60 hoz kapcsoltuk. Az átformált humán PM1 antitestek na-

gyobb koncentrációkban való expressziójának biztosítására az 1. ábra szerinti HCMV expressziós vektorokat úgy módosítottuk, hogy a HCMV promoterfokozó szakaszt a humán növekedési faktor (HEF- α) promoter-erősítő szakaszával helyettesítettük (lásd 15. ábra).

Ezután az átformált humán L lánc (a) és (b) változat H lánc V szakasz (a) – (f) változataival való összes kombinációját teszteltük humán IL-6R-t kötő képességük szempontjából, és azt tapasztaltuk, hogy az L lánc (a) változatát és H lánc (f) változatát tartalmazó átformált humán antitest ugyanolyan mértékben volt képes kötődni az IL-6R-hoz, mint a kiméra PM1 (a) (13. ábra), amint azt a 11. példában részletesen ismertetjük.

Az átformált humán PM1 V szakaszokat kódoló DNS-szekvenciák módosítása az expresszió mértékének javítása céljából

A cos sejtekben termelt, átformált humán PM1 antitestek koncentrációit áttekintve nyilvánvalóvá vált, hogy az átformált humán H láncok expressziója mindig mintegy 10-szer kisebb mértékű volt, mint a humán L láncok vagy a kiméra L vagy H láncok expressziója. Úgy tűnt, hogy az átformált humán H lánc V szakaszt kódoló DNS-ben van a probléma, ami alacsony szintű expressziót okoz. Annak megállapítására, hogy a proteinexpresszió alacsony szintje vajon a transzkripció alacsony szintjének következménye-e, az átformált humán PM1 L és H láncokat expresszáló vektorokkal kotranszfektált cos sejtekből preparáltuk az RNS-t. Az első szál cDNS-t az egér PM1 V szakaszok PCR-klónozására ismertett módszerrel szintetizáltuk. Az átformált humán L vagy H lánc V szakaszokat kódoló DNS végeinek határolására tervezett PCR-primerek alkalmazásával a cDNS-ekből PCR-termékeket állítottunk elő, amelyek az átformált humán L lánc V szakasznak vagy az átformált humán H lánc V szakasznak felelnek meg.

Az átformált humán L lánc V szakaszra két PCR-terméket kaptunk, az egyik 408 bp hosszúságú, amint az várható, a másik egy rövidebb, 299 bp hosszúságú PCR-termék volt. A helyes méretű PCR-termék mintegy 90%-át tette ki a PCR-terméknek, és a rövidebb PCR-termék mintegy 10%-át tette ki a teljes hozamnak. Az átformált humán H lánc V szakaszra szintén két PCR-terméket kaptunk, az egyik a várt 444 bp hosszúságú, a másik, rövidebb PCR-termék 370 bp hosszúságú volt. Ebben az esetben azonban a téves, rövidebb PCR-termék tette ki az összes PCR-termék túlnyomó részét, mintegy 90%-át. A helyes méretű PCR-termék csak mintegy 10%-át tette ki a PCR-termék teljes hozamának. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az átformált humán V szakaszokat kódoló RNS-ek bizonyos része deléciókat tartalmaz.

A törölt szekvencia meghatározására a rövidebb PCR-termékeket klónoztuk, és meghatároztuk szekvenciájukat. A DNS-szekvenciákból világossá vált, hogy mind az L, mind a H lánc V szakaszokból specifikus DNS-részek töröltek. A törölt szekvenciákat határoló DNS-szekvenciák vizsgálata azt mutatta, hogy ezek a szekvenciák az illesztő (splice) donor-akceptor szekvenciákra definiált konszenzusszekvenciáknak felelnek meg (Breathnach R. és munkatársai, Ann. Rev. Biochem. 50,

349–383 (1981)). Az átformált humán H láncok alacsony szintű expressziójának magyarázata az volt, hogy az átformált humán H lánc V szakaszok tervezésekor véletlenül meglehetősen hatékony illesztő donor-akceptor helyek sorozatát alakítottunk ki. Az is nyilvánvalóvá vált, hogy az átformált humán L lánc V szakaszok tervezésekor véletlenül meglehetősen hatástalan illesztő donor-akceptor helyek sorozatát alakítottuk ki. Az illesztő donor-akceptor helyek eltávolítására az átformált humán PM1 L és H lánc V szakaszok (a), illetve (f) változatit kódoló DNS-szekvenciákban kisebb módosításokat hajtottunk végre a fent ismertetett PCR-mutagenézis módszer alkalmazásával.

Úgy gondoltuk, hogy az alacsony szintű expresszió másik lehetséges oka az intronok jelenléte lehet a szignálszekvenciákban mind az átformált humán L, mind a H lánc V szakaszokban (54. és 55. számú szekvencia). Ezek az intronok eredetileg a humán D1.3 és V szakaszok (Verhoeven és munkatársai, 1988) szerkesztésére alkalmazott egér mu H lánc szignálszekvenciából származtak [Neuberger M. S. és munkatársai, Nature 314, 268–270 (1985)]. Mivel az átformált humán D1.3-at egy egér immunglobulin promotert alkalmazó emlőssejtvektorban expresszálták, az egér-szignálszekvencia jelenléte fontos volt. A szignálintron az immunglobulin promoterekből való expresszióhoz fontos szekvenciákat tartalmaz, de ezek a virális promoterekből – például HCMV-ből – való expresszióhoz nem fontosak [Neuberger S. M., Nucl. Acids. Res. 16, 6713–6724 (1988)]. Amikor az átformált humán PM1 L és H láncot nem immunglobulin promotereket alkalmazó vektorokban expresszáltuk, a szignálszekvenciában lévő intronok az átformált humán V szakaszokat kódoló cDNS-ek PCR klónozásával töröltek (lásd 12. példa).

Az expresszió alacsony szintjének további oka lehetett egy mintegy 190 bp hosszúságú, nem funkcionális DNS-kiterjesztés jelenléte az intronban az átformált humán PM1 H lánc V szakasz és a humán gamma-1 C szakasz között. Az átformált humán PM1 H lánc V szakaszt eredetileg átformált humán B1–8 H lánc V szakaszból származó DNS-szekvenciákból szerkesztették [Jones P. T. és munkatársai, Nature 321, 522–525 (1986)]. Az első átformált humán V szakaszt az egér NP H lánc V szakaszból szerkesztették [Neuberger M. S. és munkatársai, Nature (1985); Neuberger M. S. és munkatársai, EMBO J. 2, 1373–1378 (1983)]. Ezt a mintegy 190 bp hosszúságú kiterjesztést az intronban az átformált humán H lánc V szakasz és az átformált humán V szakasz expressziós vektorban való illesztésére szolgáló BamI hely között az átformált humán V szakaszokat kódoló cDNS-ek PCR-klónozása során eltávolítottuk.

Az átformált humán PM1 H lánc V szakaszok az expresszió mértékének javítása céljából megváltoztattott, végső változatának DNS- és aminosavszekvenciája az 57. és 56. számú szekvenciának felel meg. Ezek a DNS-szekvenciák az átformált humán PM1 L lánc V szakasz (a) változatát (lásd 2. táblázat) és az átformált humán PM1 H lánc V szakasz (f) változatát

(lásd 3. táblázat) kódolják. Amikor ezeket a HEF-1 α expressziós vektorba illesztjük (15. ábra), ezek a vektorok átmenetileg mintegy 2 μ g/ml antitestet termelnek a transzfektált cos sejtekben. Annak érdekében, hogy a sejtek stabilan nagyobb mennyiségben termeljék az átfarmált humán PM1 antitestet, a dhfr gén beépítésével egy új expressziós vektort szerkesztettünk (11. példa, 11. ábra). A „béna” dhfr gént a humán gamma-1 típusú H láncokat expresszáló HEF-1 α vektorba úgy inszertáltuk, ahogy azt a humán gamma-1 H láncokat expresszáló HCMV vektorra leírtuk. Az átfarmált humán PM1 L láncokat expresszáló HEF-1 α vektort és az átfarmált humán PM1 H láncokat expresszáló HEF-1 α -dhfr vektort CHO dhfr(-) sejtekbe kotranszfektáltuk. A stabilan transzformált CHO-sejteket nukleozidok nélküli, 10% FCS-sel és 500 μ g/ml G418-cal kiegészített alfa-minimális esszenciális táptalajon (α -MEM) szelektáltuk. A génmegszorozási lépések előtt a CHO-sejtvonal vizsgálataink szerint mintegy 10 μ g/10⁶ sejt/nap mennyiségben termelt átfarmált humán PM1 antitestet.

AUK12-20 egér-monoklonálisantitestből származó V szakaszok összehasonlítása ismert humán antitestek V szakaszaival

Az AUK12-20 egér-monoklonálisantitest kappa típusú L lánc V szakasz FR-jeinek homológiáját a humán kappa típusú L lánc V szakasz I-IV. alcsoport (HSG) FR-jeivel, és az AUK 12-20 egér-monoklonálisantitest kappa típusú H lánc V szakasz FR-jeinek homológiáját a humán H lánc V szakasz I-III. alcsoport (HSG) FR-jeivel a 4. táblázatban ismertetjük.

4. táblázat

Azonosság (%) az egér AUK12-20 V szakaszok FR-jei és a humán V szakaszok különböző alcsoportjaira megadott konszenzusszekvencia FR-jei között

FR-ek az L lánc V szakaszokban			
HSG1	HSG2	HSG3	HSG4
65,8	64,0	67,6	67,6
FR-ek az H lánc V szakaszokban			
HSGI	HSGII	HSGIII	
58,6	53,6	49,1	

A 4. táblázatból látható, hogy az AUK12-20 egér-monoklonálisantitest kappa típusú L lánc V szakasza azonos mértékben (64-68%) homológ a humán kappa típusú L lánc V szakasz I-IV. alcsoportjával (HSG). A proteinek LEEDS adatbázisában végzett kutatás szerint a HSGIV alcsoportba tartozó LEN humán antitest L lánc V szakasz [Schneider M. és munkatársai, Physiol. Chem. 366, 507-557 (1975)] mutatja a legnagyobb, 68%-os homológiát. Másrésről a REI humán antitest, amelyet az átfarmált humán antitest PM1 egér-monoklonálisantestből való szerkesztésére alkalmaztunk, a HSGI alcsoportba tartozik, és 62% homológiát mutat az AUK12-20 egér-monoklonálisantest L lánc V szakasszal. Ezenkívül az AUK12-20 antitest L lánc V szakaszban lévő CDR-ek, különösen a CDR2, jobban megfelelnek a REI-ben, mint a LEN-ben lévő CDR-ek kanonikus szerkezetének.

A fentieket figyelembe véve, nem szükségszerű az AUK12-20 egér-monoklonálisantest L lánc V szakasz humanizálásához egy HSGIV alcsoportba tartozó humán antitestet választani. Ezért a PM1 egér-monoklonálisantest L lánc V szakasz humanizálásához hasonlóan, a REI FR-jeit alkalmaztuk az AUK12-20 egér-monoklonálisantest L lánc V szakasz humanizálására is.

A 4. táblázat szerint az AUK12-20 antitest H lánc V szakasza a HSGI-gyel mutatja a legnagyobb mértékű homológiát. Ezenkívül, a LEEDS adatbázisban végzett kutatás szerint a szintén HSGI alcsoportba tartozó HAX humán antitest [Stollar B. O. és munkatársai, J. Immunol. 139, 2496-2501 (1987)] mintegy 66%-os homológiát mutat az AUK12-20 antitest H lánc V szakasszal. Ezzel összhangban az átfarmált humán AUK 12-20 antitest H lánc V szakasz tervezésére a HSGI-be tartozó humán HAX antitest FR-jeit és a HSGI konszenzusszekvenciából álló FR-ekkel rendelkező humanizált 425 antitest H lánc V szakasz [Ketteborough C. A. és munkatársai, Protein Engineering 4, 773-783 (1991)] FR-jeit alkalmaztuk. Megjegyezzük, hogy az AUK12-20 antitest H lánc V szakasz mintegy 64%-os homológiát mutat a humanizált 425 antitest H lánc V szakasz (a) változatával.

Átfarmált humán AUK12-20 antitest L lánc V szakaszok tervezése

A fenti okok miatt az átfarmált humán AUK12-20 antitest L lánc V szakaszokat az 5. táblázatban ismertett módon terveztük meg, a REI FR-jeinek alkalmazásával.

5. táblázat

	FR1		CDR1
	1	2	3
	12345678901234567890123		45677778901234
			ABCD
V _L AUK 12-20	DIVL	TQSPASLGVS	LQGRATISC
REI	DIQMTQSP	SSLSASV	GDRVTITC
RV _L	DIQMTQSP	SSLSASV	GDRVTITC
			RASKSVSTSGYSYMH

5. táblázat (folytatás)

	FR2	CDR2
	4	5
	567890123456789	0123456
V _L AUK 12-20	WYQQKPGQTPKLLIY	ASNLES
REI	WYQQTPGKAPKLLIY	
RV _L	WYQQKPGKAPKLLIY	ASNLES
	FR3	CDR3
	6 7 8	9
	78901234567890123456789012345678	901234567
V _L AUK 12-20	GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC	QHSRENPYT
REI	GVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAATYYC	
RV _L	GVPSRFSGSGSGTDF T FTTISLQPEDIAATYYC	QHSRENPYT
	FR4	
	10	
	8901234567	
V _L AUK 12-20	FGGGTKLEIK	
REI	FGQGTKLQIT	
RV _L	FGQGTKV E IK	

Megjegyzés: az öt aláhúzott nukleotid az, amely változott a CAMPATH-1H antitest tervezésében (lásd a 2. táblázat lábjegyzetét).

Átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakaszok tervezése

A fenti okok miatt az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakaszokat az átformált humán VHa 425 FR-jeinek alkalmazásával terveztük meg. Azt találtuk azonban, hogy az így tervezett átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakaszt kódoló DNS nukleotidszekvenciája egy olyan szekvenciát tartalmaz, amely jól egyezik egy illesztő donorszekvenciával. Ezért az átformált humán PM1 antitest esetéhez hasonlóan az

30 átformált humán AUK12-20 antitestben is előfordulhat egy abnormalis illesztés. Ezért az illesztődonorszerű szekvencia eliminálása céljából a nukleotidszekvenciát részben módosítottuk. A módosított szekvenciát (a) változatnak jelöltük.

35 Ezenkívül megterveztük az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (b)–(d) változatait is. Az (a)–(d) változatok aminosavszekvenciái a 6. táblázatban láthatók.

6. táblázat

	FR1	CDR1
	1 2 3	
	123456789012345678901234567890	12345
V _B AUK 12-20	EIQ L QQSGPELMKPGASVKISCKASGYSFT	SY Y I H
SGI	ZVQLVQSGAEVKKPGXSVXVSCKASGYTFS	
RV _B a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY S <u>FT</u>	SY Y I H
RV _B b	-----	-----
RV _B c	-----	-----
RV _B d	-----	-----
	FR2	CDR2
	4 5 6	
	67890123456789	01223456789012345
		A
V _B AUK 12-20	WVKQSHGKSLEWIG	YIDPFNGGTSYNQKFKG
SGI	WVRQAPGXGLEWVG	

6. táblázat (folytatás)

RV_Ha	WVRQAPGQGLEWVG	YIDPFNGGTSYNQKPKG
RV_Hb	-----	-----
RV_Hc	-----I-	-----
RV_Hd	-----I-	-----

	FR3	
	7 8 9	
	67890123456789012222345678901234	
	ABC	
V_HAUK 12-20	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR	
SGI	RVTXTXDXSXNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	
RV_Ha	RVTMTLDTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	
RV_Hb	K---V-----	
RV_Hc	-----	
RV_Hd	K---V-----	

	CDR3	FR4
	10 11	
	5678900012	34567890123
	AB	
V_HAUK 12-20	GGN-RF--AY	WGQGTLVTVSA
SGI		WGQGTLVTVSS
RV_Ha	GGN-RF--AY	WGQGTLVTVSS
RV_Hb	-----	-----
RV_Hc	-----	-----
RV_Hd	-----	-----

Megjegyzés: X-szel jelöltük azokat a helyzeteket, amelyekben nem adtunk meg egy közösleges aminosavmaradékot a HSGI V_H szakaszokban (SGI). A két aláhúzott aminosavmaradék különbözik az SGI konszenzusszekvenciában levőktől. Az RV_Hb, RV_Hc és RV_Hd esetében csak az RV_Ha aminosavjaitól eltérő aminosavakat tüntettük fel.

Ezenkívül megterveztük az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (a)-(d) változatait is (7. táblázat), a humán HAX antitest [J. Immunology 139, 2496-2501 (1987)]; egy SLE-beteg B-sejtjeiből származó 21/28 hibridómasejtek által termelt an-

titest; aminosavszekvenciája ezen irodalmi hely 6. ábráján és az aminosavszekvenciát kódoló DNS nukleotidszekvenciája annak 4. és 6. ábráján látható)] FR-jeinek alkalmazásával.

7. táblázat

	FR1	CDR1
	1 2 3	
	123456789012345678901234567890	12345
V_HAUK 12-20	EIQQLQQSGPELMPGASVKISCKASGYSFT	SYIIH
SGI	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT	
sle:		
1220Ha	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY^SFT	SYIIH
1220Hb	-----S--	-----
1220Hc	-----S--	-----
1220Hd	-----S--	-----

7. táblázat (folytatás)

	FR2	CDR2
	4 67890123456789	5 0122223456789012345 ABC
V _H AUK 12-20	WVKQSHGKSLEWIG	YIDP--FNGGTSYNQKFKG
HAX	WVRQAPGQRLEWMG	
sle:		
1220Ha	WVRQAPGQRLEWMG	YIDP--FNGGTSYNQKFKG
1220Hb	-----I-	-----
1220Hc	-----	-----
1220Hd	-----I-	-----
	FR3	
	7 67890123456789012222345678901234 ABC	9
V _H AUK 12-20	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAR	
HAX	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	
sle:		
1220Ha	RVTITVDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCAR	
1220Hb	-----V-----	
1220Hc	K----V-----	
1220Hd	K----V-----	
	CDR3	FR4
	10 5678900012 AB	11 34567890123
V _H AUK 12-20	GGN-RF--AY	WGQGT LVT VSA
HAX		WGQGT LVT VSS
sle:		
1220Ha	GGN-RF--AY	WGQGT LVT VSS
1220Hb	-----	-----
1220Hc	-----	-----
1220Hd	-----	-----

Megjegyzés: a két aláhúzott maradék az sle1220Ha-ban az, amely különbözik a HAX FR-ektől. Az sle1220Hb, sle1220Hc és sle1220Hd esetén csak azokat az aminosavakat tüntettük fel az FR-ekben, amelyek eltérnek a HAX FR-ek aminosavjaitól.

A találmány szerinti humán IL-6R elleni kiméra vagy átfomált humán antitestek előállítására bármely expressziós rendszer alkalmazható, többek között eukariótasejtek, például állati sejtek, így például bizonyos emlőssejtvonalak, gombasejtek, élesztősejtek, valamint prokariótasejtek, például baktériumsejtek, így például az *Escherichia coli*. A találmány szerinti kiméra vagy átfomált humán antitesteket előnyösen emlőssejtekben, például cos sejtekben vagy CHO-sejtekben expresszáljuk.

Ebben az esetben az emlőssejtekben való expresszióra alkalmas szokásos promoterek alkalmazhatók. Előnyösen virális expressziós rendszer, így például

humán citomegalovírus azonnali korai (HCMV) promotor alkalmazható. A HCMV promotert tartalmazó expressziós vektorra példaként említjük a HCMV-V_H-HC_{τ1}, HCMV-V_LHC_κ, HCMV-12h-gtl, HCMV-12k-gk és a pSV2neo-ból származó hasonló vektorokat, amint az 1. ábra mutatja.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható másik promotor az lα humán növekedési faktor (HEF-lα) promotor. A fenti promotert tartalmazó expressziós vektorok például a HEF-12h-gtl és a HEF-12h-gk (8. és 9. ábra), valamint a HEF-V_H-gtl és HEK-V_L-gk (15. ábra).

A dhfr gén sokszorozásához valamely gazdasejt-vonalban, az expressziós vektornak tartalmaznia kell a dhfr gént. A dhfr gént tartalmazó expressziós vektorok például a DHFR- Δ E-PMh-gtl (10. ábra), a DHFR- Δ E-RVh-PM1-f (11. ábra) és hasonlóak.

Összefoglalóan, a találmány első megközelítésben egy humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitestet L lánc V szakaszra vagy H lánc V szakaszra, valamint az L lánc V szakaszt kódoló DNS-re, és a H lánc V szakaszt kódoló DNS-re vonatkozik. Ezek humán IL-6R elleni humán/kiméra antitestek és átformált humán antitestek szerkesztésére alkalmazhatók. A monoklonális antitestekre példa az AUK12-20, PM1, AUK64-7 és AUK146-15. Az L lánc V szakasz aminosavszekvenciája például a 24., 26., 28. vagy 30. számú szekvenciának felel meg; a H lánc V szakasz aminosavszekvenciáját például a 25., 27., 29. és 31. számú szekvencia mutatja. Ezeket a aminosavszekvenciákat kódoló nukleotidszekvenciák például a 24-31. számú szekvenciák.

A találmány továbbá humán IL-6R elleni kiméra antitestre vonatkozik, amely tartalmaz

- (1) egy humán L lánc C szakaszt és egy egér L lánc V szakaszt magában foglaló L láncot; és
- (2) egy humán H lánc C szakaszt és egy egér H lánc V szakaszt magában foglaló H láncot.

Az egér L lánc V szakaszt, az egér H lánc V szakaszt és az ezeket kódoló DNS-t fent ismertettük. A humán L lánc C szakasz bármely humán L lánc C szakasz lehet, például a humán C_K. A humán H lánc C szakasz szintén bármely humán H lánc C szakasz lehet, például a humán C_{H1}.

A kiméra antitest előállítására két expressziós vektort szerkesztettünk, azaz egy egér L lánc V szakaszt és egy humán L lánc C szakaszt egy expressziós szabályozószakasz, például egy erősítő-promoter rendszer szabályozása alatt kódoló DNS-t tartalmazó vektort; és egy másik vektort, amely egy egér H lánc V szakaszt és egy humán H lánc C szakaszt egy expressziós szabályozószakasz, például egy erősítő-promoter rendszer szabályozása alatt kódoló DNS-t tartalmaz. Ezt követően az expressziós vektorokat gazdasejtekbe, például emlőssejtekbe kotranszfektáltuk, és a transzfektált sejteket in vitro vagy in vivo tenyésztve előállítottuk a kiméra antitestet.

Alternatív módon egy egér L lánc V szakaszt és egy humán L lánc C szakaszt kódoló DNS-t és egy egér H lánc V szakaszt és egy humán H lánc C szakaszt kódoló DNS-t egyetlen expressziós vektorba illeszthetünk, és a vektort alkalmazzuk egy gazdasejt transzfektálására, amelyet azután in vivo vagy in vitro tenyésztve előállítjuk a kívánt kiméra antitestet.

A találmány tárgyát képezi továbbá a humán IL-6R elleni átformált humán antitest, amely tartalmaz

- (A) egy L láncot, amely
 - (1) egy humán L lánc C szakaszt; és
 - (2) humán L lánc FR-eket és a humán LL-6R elleni egér-monoklonális antitest L lánc CDR-eket tartalmazó L lánc V szakaszt foglal magában; és
- (B) egy H láncot, amely

(1) egy humán H lánc C szakaszt; és

(2) humán H lánc FR-eket és a humán LL-6R elleni egér-monoklonális antitest H lánc CDR-eket tartalmazó H lánc V szakaszt foglal magában.

- 5 Egy előnyös kiviteli alak szerint az L lánc CDR-ek olyan aminosavszekvenciával rendelkeznek, mint amelyek a 24., 26., 28. és 30. számú szekvenciákban láthatók, ahol az aminosavszekvenciák kiterjesztései a 9. táblázatban megadottak; az L lánc CDR-ek olyan aminosavszekvenciával rendelkeznek, mint amelyek a 25., 27., 29. és 31. számú szekvenciákban láthatók, ahol az aminosavszekvenciák kiterjesztései a 9. táblázatban megadottak; a humán L lánc FR-ek a REI-ből származnak; és a humán H lánc FR-ek a NEW-ből vagy a HAX-ből származnak.

Az előnyös kiviteli alakban az L lánc V szakasz aminosavszekvenciája a 2. táblázat szerinti RV_La; a H lánc V szakasz aminosavszekvenciája a 3. táblázat szerinti RV_Ha, RV_Hb, RV_Hc, RV_Hd, RV_He vagy RV_Hf. Legelőnyösebb az RV_Hf aminosavszekvencia.

Az átformált humán antitest előállítására két expressziós vektort szerkesztettünk, az egyik a fent megadott, átformált L láncot kódoló DNS-t tartalmazza egy expressziós szabályozószakasz, például egy erősítő-promoter rendszer szabályozása alatt, a másik a fent megadott, átformált humán H láncot kódoló DNS-t tartalmazza egy expressziós szabályozószakasz, például egy erősítő-promoter rendszer szabályozása alatt. Ezt követően az expressziós vektorokat gazdasejtbe, például emlőssejtbe kotranszfektáltuk, és a transzfektált sejteket in vitro vagy in vivo tenyésztve előállítottuk az átformált humán antitestet.

Alternatív módon az átformált humán L láncot kódoló DNS-t és az átformált H láncot kódoló DNS-t egyetlen expressziós vektorba illeszthetjük, és e vektort alkalmazzuk egy gazdasejt transzfektálására, amelyet azután in vivo vagy in vitro tenyésztve előállítjuk a kívánt humán antitestet.

Az ily módon előállított kiméra antitestet vagy átformált humán antitestet szokásos módon izolálhatjuk és tisztíthatjuk, például Protein A affinitási kromatográfias eljárással, ioncserélő kromatográfias eljárással, gél-sűrítéssel vagy hasonló módon.

A találmány szerinti kiméra L láncot vagy átformált humán L láncot egy H láncsal kombinálhatjuk a teljes antitest előállítására. Hasonló módon a találmány szerinti kiméra H láncot vagy átformált humán H láncot egy L láncsal kombinálva előállíthatjuk a teljes antitestet.

A találmány szerinti egér L lánc V szakasz, átformált humán L lánc V szakasz, egér H lánc V szakasz és átformált humán H lánc V szakasz természetükből adódóan olyan szakaszok, amelyek egy antigénhez, a humán IL-6R-hez kötődnek, ezért önmagukban, vagy más proteinekkel fuzionálva alkalmasak gyógyászati készítmények vagy diagnosztikai szerek előállítására.

Továbbá a találmány szerinti L lánc V szakasz CDR-ek és H lánc V szakasz CDR-ek természetükből adódóan olyan szakaszok, amelyek egy antigénhez, a humán IL-6R-hez kötődnek, ezért önmagukban, vagy

más proteinekkel fuzionálva alkalmasak gyógyászati készítmények vagy diagnosztikai szerek előállítására.

A találmány szerinti egér L lánc V szakaszt kódoló DNS egy kiméra L láncot kódoló DNS vagy egy átformált humán L láncot kódoló DNS szerkesztésére alkalmazható.

Hasonló módon a találmány szerinti egér H lánc V szakaszt kódoló DNS egy kiméra H láncot kódoló DNS vagy egy átformált humán H láncot kódoló DNS szerkesztésére alkalmazható.

Ezenkívül a találmány szerinti L lánc V szakasz CDR-t kódoló DNS egy átformált humán L lánc V szakasz kódoló DNS és egy átformált humán L láncot kódoló DNS szerkesztésére alkalmazható. Hasonló módon, a találmány szerinti H lánc V szakasz CDR-t kódoló DNS egy átformált humán H lánc V szakasz kódoló DNS és egy átformált humán H láncot kódoló DNS szerkesztésére alkalmazható.

A találmányt közelebbről – a korlátozás szándéka nélkül – az alábbi példákkal kívánjuk ismertetni.

1. példa

Humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitest V szakaszát kódoló DNS (1) klónozása

A humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitest V szakaszát kódoló DNS-t az alábbiak szerint klónozzuk.

1. Összes DNS preparálása

Az AUK12-20 hibridómából preparáljuk az összes RNS-t Chirgwin és munkatársai módszere szerint [Biochemistry 18, 5294 (1979)]. Közelebbről, $1 \cdot 10^8$ AUK12-20 hibridómasejtet 20 ml 4 mol/l koncentrációjú guanidin-tiocianát-pufferben (Fluka) teljesen homogenizálunk. A homogenizátumot centrifugacsőben 5,3 mol/l koncentrációjú cézium-klorid-rétegre rétegezzük, majd Beckman SW40 rotorban 31 000 fordulat/perccel 20 °C-on 24 órán keresztül centrifugálva kicsapjuk az RNS-t. Az RNS-csapadékot 80%-os etanollal mossuk és 150 µl 10 mmol/l koncentrációjú, 1 mmol/l EDTA-t és 0,5% SDS-t tartalmazó Tris-HCl pufferben (pH 7,5) oldjuk, majd hozzáadunk 0,5 mg/ml Proténase-t (Boehringer), és 37 °C-on 20 percen keresztül inkubáljuk. Az elegyet fenollal és kloroformmal extraháljuk, és az RNS-t etanollal kicsapjuk. Az RNS-csapadékot ezután 200 µl 10 mmol/l koncentrációjú, 1 mmol/l EDTA-t tartalmazó Tris-HCl-ben (pH 7,5) oldjuk.

2. Egyszálú cDNS szintézise

Az egyszálú cDNS-t Larrick J. W. és munkatársai [Biotechnology 7, 934 (1989)] módszere szerint szintetizáljuk úgy, hogy mintegy 5 µg fenti módon előállított össz-RNS-t 10 µl 50 mmol/l koncentrációjú Tris-HCl pufferben (pH 8,3) oldunk, amely 40 mmol/l KCl-t, 6 mmol/l $MgCl_2$ -t, 10 mmol/l ditiotreitolt, 0,5 mmol/l dATP-t, 0,5 mmol/l dGTP-t, 0,5 mmol/l dCTP-t, 0,5 mmol/l dTTP-t, 35 mmol/l oligo-dT primert (Amersham), 48 egység RAV-2 reverz transzkriptázt (REV-2; Rous associated vírus 2; Amersham) és 25 egység humán placentalribonukleáz-inhibitor (Amersham) tartalmaz, és a reakcióelegyet 37 °C-on 60 percen keresz-

tül inkubáljuk, majd közvetlenül alkalmazzuk a soron következő polimeráz-láncreakció (PCR) eljárásban.

3. Az antitest V szakaszt kódoló cDNS megsokszorozása PCR-eljárással

A PCR-eljárás kivitelezésére Thermal Cycler Model PHC-2 (Techne) készüléket használunk.

(1) Egér kappa típusú könnyű lánc (κL) variábilis szakaszát kódoló cDNS megsokszorozása

A PCR-eljárásban primerként MKV (Mouse Kappa Variable) primereket (1-11. számú szekvencia) alkalmazunk, amelyek egy egér κL lánc szignálszekvenciával hibridizálnak [Jones S. T. és munkatársai, Biotechnology 9, 88 (1991)], és egy MKC (Mouse Kappa Constant) primert (12. számú szekvencia), amely egy egér κL lánc C szakasszal hibridizál [Jones S. T. és munkatársai, Biotechnology 9, 88 (1991)].

Először 100 µl PCR-oldatot – amely 10 mmol/l Tris-HCl-t (pH 8,3), 50 mmol/l KCl-t, 0,1 mmol/l dATP-t, 0,1 mmol/l dGTP-t, 0,1 mmol/l dCTP-t, 0,1 mmol/l dTTP-t, 1,5 mmol/l $MgCl_2$ -t, 2,5 egység AmpliTaq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus), 0,25 µmol/l megfelelő MKV primert, 3 µmol/l MKC primert és az egyszálú cDNS-szintézis reakcióelegyből 1 µl-t tartalmaz – 94 °C kiindulási hőmérsékleten 1,5 percen keresztül inkubálunk, majd 94 °C-on 1 percen keresztül, 50 °C-on 1 percen keresztül, és 72 °C-on 1 percen keresztül melegítünk, ebben a sorrendben. Ezt a hőkezelési ciklust 25-ször megismételjük, majd a reakcióelegyet 72 °C-on 10 percen keresztül tovább inkubáljuk.

(2) Egér H lánc V szakaszát kódoló cDNS megsokszorozása

A PCR-eljárásban primerként MHV (Mouse Heavy Variable) 1-10. primert (szekvenciájuk a 13-22. számú szekvenciának felel meg) [Jones S. T. és munkatársai, Biotechnology 9, 88 (1991)], és egy MHC (Mouse Heavy Constant) primert (23. számú szekvencia) [Jones S. T. és munkatársai, Biotechnology 9, 88 (1991)] alkalmazunk. A megsokszorozást a kappa típusú L lánc V szakasz gén megsokszorozására a 3 (1) részben fent ismertetett módon végezzük.

4. PCR-termék tisztítása és emésztése

A PCR-eljárással a fent ismertetett módon megsokszorozott DNS-fragmenseket QIAGEN PCR-termék-tisztító kit (QIAGEN Inc. US) segítségével tisztítjuk, és 10 egység SalI restrikciós endonukleázzal (GIBCO BRL) emésztjük 10 mmol/l $MgCl_2$ -t és 150 mmol/l KCl-t tartalmazó, 100 mmol/l koncentrációjú Tris-HCl pufferben (pH 7,6) 37 °C-on 3 órán keresztül. Az emésztett elegyet fenollal és kloroformmal extraháljuk, és a DNS-t etanolos kicsapással kinyerjük. Ezután a DNS-csapadékot 10 egység XmaI restrikciós endonukleázzal (New England Biolabs) emésztjük 37 °C-on 2 órán keresztül, a kapott DNS-fragmenseket agarózgél-elektroforézissel elválasztjuk, alacsony olvadáspontú agarózt (FMC Bio Products USA) alkalmazva.

A mintegy 450 bp hosszúságú DNS-fragmenseket tartalmazó agarózdarabot kivágjuk, és 5 percen keresztül 65 °C-on megolvasztjuk, majd azonos térfogatú, 2 mmol/l EDTA-t és 200 mmol/l NaCl-t tartalmazó,

20 mmol/l koncentrációjú Tris-HCl puffert (pH 7,5) adunk hozzá. Az elegyet fenollal és kloroformmal extra-háljuk, a DNS-t etanolos kicsapással kinyerjük, és 1 mmol/l EDTA-t tartalmazó, 10 µl 10 mmol/l koncentrációjú Tris-HCl pufferben (pH 7,5) feloldjuk. Ily módon egy egér κH lánc V szakaszt kódoló gént tartalmazó DNS-fragmenst és egy egér H lánc V szakaszt kódoló gént tartalmazó DNS-fragmenst kapunk. Mindkét fenti DNS-fragmens tartalmaz 5'-végén egy Sall ragadós véget, és 3'-végén egy XmaI ragadós véget.

5. Ligálás és transzformálás

Mintegy 0,3 µg fenti módon előállított, egér κL lánc V szakaszt kódoló gént tartalmazó Sall-XmaI DNS-fragmenst mintegy 0,1 µg pUC19 vektorral ligálunk, amely utóbbit úgy állítjuk elő, hogy a pUC19 plazmidot Sall-gyel és XmaI-gyel 16 °C-on 16 órán keresztül emésztjük 50 mmol/l Tris-HCl-t (pH 7,4), 10 mmol/l MgCl₂-t, 10 mmol/l ditiotreitolt, 1 mmol/l spermidint, 1 mmol/l dATP-t, 0,1 g/ml marhaszérum-albumint és 2 egység T4 DNS-ligázt (New England Biolabs) tartalmazó reakcióelegyben.

Ezután a fenti ligációs elegy 7 µl-ét 200 µl kompetens E. coli DH5α sejthez adjuk, és a sejteket jeges hűtés alkalmazása mellett 30 percen keresztül, 42 °C-on 1 percen keresztül, majd újra jégen 1 percen keresztül inkubáljuk. 800 µl SOC közeg (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) hozzáadása után a sejtszuspenziót 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáljuk, 2xYT agarlemezre (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) oltjuk, és 37 °C-on egy éjszakán keresztül inkubálva kapjuk az E. coli-transzformánsokat. A transzformált sejteket 5 ml, 50 µg/1 ampicillint tartalmazó 2xYT közegben tenyésztjük 37 °C-on egy éjszakán keresztül, és a tenyészetből lúgos eljárással (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook és munkatársai, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) preparáljuk a plazmid DNS-t. Az így kapott plazmidot – amely egy AUK12–20 hibridómából származó egér L lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz – p12–k2-nek nevezzük.

A fent ismertetett eljárás szerint állítjuk elő azt a plazmidot is a Sall-XmaI DNS-fragmensből, amely egy AUK12–20 hibridómából származó egér H lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz, ezt a plazmidot p12–h2-nek nevezzük.

2. példa

Egér monoklonális atitest V szakaszt kódoló DNS (2) klónozása

Lényegében az 1. példában leírtak szerint eljárva állítjuk elő a PM1, AUK64–7 és AUK146–15 hibridómából az alábbi plazmidokat:

- a pPM–3k plazmidot, amely egy PM1 hibridómából származó κL lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz;
- a pPM–h1 plazmidot, amely egy PM1 hibridómából származó H lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz;

- a p64–k4 plazmidot, amely egy AUK64–7 hibridómából származó κL lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz;
- a p64–h2 plazmidot, amely egy AUK64–7 hibridómából származó H lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz;
- a p146–k3 plazmidot, amely egy AUK146–15 hibridómából származó κL lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz; és
- a p146–h1 plazmidot, amely egy AUK146–15 hibridómából származó H lánc V szakaszt kódoló gént tartalmaz.

A fenti plazmidokat tartalmazó E. coli törzseket a Budapesti Egyezmények megfelelően letétbe helyeztük a National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd.-nél, a letéti számokat a 8. táblázatban foglaltuk össze.

8. táblázat

Plazmid	Szekvencia száma	Letéti szám
p12 – k2	24	NCIMB 40367
p12 – h2	25	NCIMB 40363
pPM – k3	26	NCIMB 40366
pPM – h1	27	NCIMB 40362
p64 – k4	28	NCIMB 40368
p64 – h2	29	NCIMB 40364
p146 – k3	30	NCIMB 40369
p146 – h1	31	NCIMB 40365

3. példa

DNS-szekvencia meghatározása

A fenti plazmidokban a cDNS-kódolószakasz nukleotidszekvenciáját a Sequenase™ kit Version 2.0 (U. S. Biochemical Corp. USA) alkalmazásával határozzuk meg.

Először 3 µg fenti módon előállított plazmid DNS-t 0,2 n NaOH-dal denaturálunk, egy szekvenáló primerrel illesztjük és ³⁵S–dATP-vel jelezzük a gyártó útmutatása szerint. Ezután a jelzett DNS-t 8 mol/l karbamidot tartalmazó, 6%-os poliakrilamid gélre visszük fel, majd az elektroforézis után a gél 10%-os metanollal és 10%-os ecetsavval fixáljuk, szárítjuk és autoradiográfiás eljárással meghatározzuk a nukleotidszekvenciát.

Az egyes plazmidok nukleotidszekvenciáját a 24–31. számú szekvencia mutatja.

4. példa

CDR-ek meghatározása

Az L lánc és H lánc V szakaszok általános szerkezete egymáshoz hasonló, mivel 4 keretszakaszt (framework, FR) 3 szupervariábilis szakasz, azaz komplementaritást meghatározó szakasz (CDR) köt össze. Míg az FR-ek aminosavszekvenciája viszonylag jól megőrződik, a CDR-ek aminosavszekvenciája nagyon változékony [Kabat E. A. és munkatársai, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1983)].

A humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitestek V szakaszainak fent meghatározott aminosav-szekvenciája alapján, Kabat E. A. és munkatársai fent idézett munkájával összhangban meghatároztuk a humán IL-6R elleni egér-monoklonális antitestek V szakaszainak CDR-jeit, amelyet a 9. táblázatban közlünk.

9. táblázat

Plazmid	Szekvencia száma	CDR(1)	CDR(2)	CDR(3)
		(aminosav száma)		
p12-K2	24	24-38	54-60	93-101
p12-h2	25	31-35	50-66	99-105
pPM-k3	26	24-34	50-56	89-97
pPM-h1	27	31-36	51-66	99-108
p64-k4	28	24-38	54-60	93-101
p64-h2	29	31-35	50-66	99-109
p146-k3	30	24-34	50-56	89-97
p146-h1	31	31-35	50-66	99-106

5. példa.

Klónozott cDNS (1) (kiméra

AUK12-20 antitestkonstruktum) expressziójának kimutatása

Expressziós plazmid szerkesztése

Az AUK12-20 kappa típusú L lánc és H lánc V szakaszokat kódoló, PCR-klónozott cDNS-ekből szerkesztünk egy kiméra L láncot vagy H láncot. Annak érdekében, hogy az egér AUK12-20 V szakaszt kódoló cDNS-t egy humán C szakaszt kódoló cDNS-sel könnyen összekapcsolhassunk egy emlős-expressziós vektorban, amely humán citomegalovírus (HCMV) expressziós vektor erősítőt és promotert tartalmaz, az egér cDNS 5'- és 3'-végeken megfelelő restrikciós enzimsítási helyeket kell kialakítani.

Az 5'- és 3'-végek ilyen módosítását PCR-eljárással hajtjuk végre. Két primersorozatot terveztünk és szintetizáltunk. Egy L lánc V szakasz hátsó primert (32. számú szekvencia) és egy H lánc V szakasz hátsó primert (33. számú szekvencia) terveztünk úgy, hogy a primerek a szignálszekvencia elejét kódoló DNS-sel hibridizáljanak, a kielégítő mértékű translációhoz szükséges DNS-szekvencia fennmaradjon [Kozak M., J. Mol. Biol. 196, 947-950 (1987)], és a HCMV expressziós vektor klónozásához egy HindIII hely alakuljon ki. Az L lánc V szakasz elülső primert (34. számú szekvencia) és a H lánc V szakasz elülső primert (35. számú szekvencia) úgy terveztük meg, hogy a primerek a J szakasz terminális részét kódoló DNS-sel hibridizáljanak, fennmaradjon a C szakaszba való beillesztéshez szükséges DNS-szekvencia, és a HCMV expressziós vektorban a humán C szakaszhoz való kapcsolódáshoz kialakuljon egy BamHI hely.

A PCR-eljárással való megsokszorozás után a PCR-terméket HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, a humán kappa és τ 1 lánc C szakasz DNS-t tartalmazó HCMV-vektorba klónozzuk és szekvenciáját meghatá-

rozzuk annak bizonyítására, hogy a PCR-sokszorozás során nem vittünk be hibákat. A kapott expressziós vektorok jelölése HCMV-12k-gk, illetve HCMV-12h-gt1.

- 5 A HCMV expressziós plazmidok szerkezete az 1. ábrán látható. A HCMV-V_L-HC_k plazmidban a V_L szakasz bármely egér L lánc V szakasz lehet. Ebben a példában az AUK12-20 κ L lánc V szakasz inszertálásával kaptuk a HCMV-12k-t. A HCMV-V_H-HC _{τ 1} plazmidban a V_H szakasz bármely egér H lánc V szakasz lehet. Ebben a példában az AUK12-20 H lánc V szakaszt inszertálva kaptuk a HCMV-12h-gt1 plazmidot.

Átmeneti expresszió COS-sejtekben

- A kiméra AUK12-20 antitest COS-sejtekben való átmeneti expressziójának kimutatására a fentiekben ismertetett módon szerkesztett expressziós vektorokat 15 COS-sejtekben teszteljük. A vektor DNS-eket elektroporálással visszük be a COS-sejtekbe, Gene Pulser készülék (Bio Rad) alkalmazásával. Közlelebről, a COS-sejteket $1 \cdot 10^7$ sejt/ml koncentrációban szuszpendáljuk foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS), és a szuszpenzió 20 0,8 ml alikvotjához 10 μ g DNS-t adunk minden plazmid esetén. A pulzusokat 1900 V és 25 μ F kapacitással adjuk.

- A pihentetési periódus után (szobahőmérsékleten 25 10 perc) az elektroporált sejteket 10% magzati borjúsérummal (FCS) kiegészített 8 ml DMEM (GIBCO) tápközeghez adjuk. A sejteket 72 órán keresztül inkubáljuk, majd a sejttermelést centrifugálással eltávolítjuk, és aszeptikus körülmények között, rövidebb időtartamra 4 °C-on, hosszabb időn át -20 °C-on tároljuk.

Kiméra antitestek mennyiségének meghatározása

ELISA-módszerrel

- A transzfektált COS-sejtek felülúszójában ELISA-módszerrel mutatjuk ki a kiméra antitest termelődését. 35 A kiméra antitest detektálására egy lemezt kecske antihumán teljes molekula IgG-vel (Sigma) vonunk be. A lemezt blokkoljuk, és minden egyes rezervoárba sorozathígított COS-sejttenyészet felülúszót mérünk. Inkubálás és mosás után minden egyes rezervoárba alkalikus foszfátazzal kötött kecske antihumán IgG-t (τ lánc specifikus, Sigma) mérünk. Inkubálás és mosás után szubsztrátpuffert adunk hozzá. A reakcióelegyet inkubáljuk, majd a reakció befejeződése után 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget. Standardként tisztított humán IgG-t (Sigma) alkalmazunk.

- Humán IL-6R-hoz való kötődés képességének vizsgálata ELISA-módszerrel

- A transzfektált COS-sejttenyészet felülúszóját ELISA-módszerrel vizsgáljuk annak megállapítására, 50 hogy a termelődött antitestek képesek-e kötődni az antigénhez. Az antigénhez való kötődés kimutatására a lemezt MT18 egér-monoklonális antitesttel (1. referenciapélda) vonjuk be, és 1%-os marhaszérum-albuminnal (BSA) való blokkolás után oldható rekombináns humán IL-6R-t (SR344) adunk hozzá. Mosás után minden egyes rezervoárba sorozathígított COS-sejttenyészet-felülúszót mérünk. Inkubálás és mosás után minden egyes rezervoárba alkalikus foszfátazzal kötött kecske antihumán IgG-t adunk. A reakcióelegyet inkubáljuk, és mosás után szubsztrátpuffert adunk hozzá. 60

Inkubálás után a reakciót leállítjuk, és 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget.

Az eredmények a 2. ábrán láthatók. A kiméra AUK12–20 antitestet kódoló gén transzfektálását COS-sejtekbe kétszer megismételtük. Mindkét sejtenyészet-felülszó minta erős kötődést mutatott az IL–6R-hoz, és a 405 nm-en mért optikai sűrűség is a minta hígításától (monoklonális antitestkoncentrációtól) függő módon változott (amit a 2. ábrán az üres körök és a teli körök jelölnek), ami az IL–6R elleni antitestek jelenlétére utal a mintában.

IL–6 IL–6R-hoz való kötődését gátló képesség meghatározása

Annak meghatározására, hogy egy mintában lévő antitest képes-e az IL–6 IL–6R-hoz való kötődését gátolni, a lemezt MT18 monoklonális antitesttel (1. referenciapélda) vonjuk be. Blokkolás után oldható rekombináns humán IL–6R-t (SR344) adunk hozzá. Mosás után COS-sejtenyészet sorozathígításával kapott mintát mérünk az egyes rezervoárakba, biotinilezett IL–6-tal.

Mosás után alkalikus foszfátazzal kötött sztreptavidint adunk hozzá, és inkubálás és mosás után hozzáadjuk a szubsztrátpuffert. A reakcióelegyet inkubáljuk, majd a reakció leállítása után 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget. Pozitív kontrollként tisztított egér AUK12–20 monoklonális antitestet adunk a mintához, és negatív kontrollként egy nem rokon antitestet expresszáló COS-sejtekből származó tenyészetet alkalmazunk.

Az eredmények a 3. ábrán láthatók. Az AUK12–20 antitestet kódoló génnel transzfektált COS-sejtek tenyészetének felülszója a legnagyobb, és a másik legnagyobb koncentrációban gátolja az IL–6 kötődését az IL–6R-hoz. Közelebről, a 3. ábrán a teli körök mutatják, hogy a 405 nm-en mért optikai sűrűség a minta hígításától (antitestkoncentrációtól) függő módon változik, ami arra utal, hogy a mintában lévő antitest gátolja az IL–6 IL–6R-hoz való kötődését. Ezt megerősíti a teljes hasonlóság a pozitív kontroll antitest koncentrációtól függő változásához (üres körök). Megjegyzendő, hogy a negatív kontroll (üres háromszögek) nem mutat gátló aktivitást.

6. példa

Klónozott cDNS (2) (kiméra

PM1 antitestkonstruktum) expressziójának kimutatása Expressziós vektorok szerkesztése

A kiméra PM1 antitestet expresszáló vektorok szerkesztésére az egér PM1 κ L lánc, illetve H lánc V szakaszokat kódoló pPM–k3, illetve pPM–h1 cDNS-klónokat PCR-eljárással módosítjuk, majd HCMV expressziós vektorokba illesztjük (1. ábra). Az L lánc V szakaszhoz tervezett pmk-s (38. számú szekvencia), a H lánc V szakaszhoz tervezett pmh-s (40. számú szekvencia) hátsó primerek a szignálszekvencia elejét kódoló DNS-sel hibridizálnak, és Kozak-konszenzusszekvenciával és egy HindIII restrikciós hellyel rendelkeznek. Az első primereket – az L lánc V szakaszhoz a pmk-a primert (36. számú szekvencia), a H lánc V szakaszhoz a pmh-a primert (39. számú szekvencia) úgy

terveztük, hogy azok a J szakaszok végeit kódoló DNS-szekvenciákkal hibridizáljanak, és egy illesztő donorszekvenciával és egy BamHI restrikciós hellyel rendelkezzenek.

A kappa típusú L lánc V szakaszhoz két első primert szintetizálunk. Noha a legtöbb kappa típusú L láncban a 107-es helyzetű lizinek konzerváltak, az egér PM1 kappa típusú L láncban 107-es helyzetben aszparagin van. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a változás hatását a kiméra PM1 antitest antigénkötő aktivitására, az első pmk-b primert (37. számú szekvencia) úgy terveztük meg, hogy a 107-es helyzetben az aszparagin lizinre mutáljon. A PCR-reakciót követően a PCR-termékeket tisztítjuk. HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük és pUC19 vektorba [Yanish-Perron és munkatársai, Gene 33, 103–109 (1985)] szubklónozzuk. A DNS szekvenciájának meghatározása után a HindIII–BamHI fragmenseket kivágjuk és a kiméra H lánchoz HCMV–V_H–HC_κ1 expressziós vektorba klónozzuk, így kapjuk a HCMV–pmh-gt1-et, illetve a kiméra L lánchoz HCMV–V_L–HC_κ expressziós vektorba klónozzuk, és így kapjuk a HCMV–pmka–gk-t és HCMV–pmkb–gk-t.

Transzfektálás cos-sejtekbe

A kiméra humán PM1 antitestek átmeneti expressziójának vizsgálatra a vektorokat cos sejtekben teszteljük. A HCMV–pmh-gt1-et és a HCMV–pmka–gk-t vagy HCMV–pmkb–gk-t elektroporálással kotranszfektáljuk a cos sejtekbe, Gene Pulsar készülék (BioRad) segítségével. Az egyes plazmid-DNS-ekből 10 μ g-ot adunk 1 $\cdot$ 10⁷ sejt/ml koncentrációjú, PBS-sel készült szuszpenzió 0,8 ml alikvotjához. A pulzust 1900 V, 25 μ F kapacitással adjuk. Szobahőmérsékleten 10 perces pihentetési periódus után az elektroporált sejteket 20 ml Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközeghez (DMEM, GIBCO) adjuk, amely 10% gamma-globulinmentes magzati borjúsérumot tartalmaz. 72 órán keresztül inkubálás után a tenyészeteket összegyűjtjük, a sejtörmelékcentrifugálással eltávolítjuk, és steril körülmények között, rövidebb időtartamra 4 °C-on, hosszabb időre –20 °C-on tároljuk.

Kiméra PM1 antitestek expressziója és analízise

A cos sejtek tenyészetét 3 napos átmeneti expresszió után összegyűjtjük, és kiméra PM1 antitestre teszteljük. A tenyészetet először ELISA-val analizáljuk annak kimutatására, hogy a transzfektált cos-sejtekben termelődött-e emberihez hasonló antitest. A fenti vizsgálatban standardként ismert mennyiségű tisztított humán IgG-t alkalmazva az emberihez hasonló antitestek (jelen esetben kiméra PM1 antitestek) mennyiségét is meghatározhatjuk a cos sejtekből kapott tenyészlében. A humán antitestek detektálására a lemezeket kecske antihumán IgG-vel (teljes molekula, Sigma) vonjuk be. Blokkolás után a cos-sejtekből származó mintákat sorozathígítjuk, és bemérjük az egyes rezervoárakba. Inkubálás és mosás után alkalikus foszfátazzal konjugált kecske antihumán IgG-t (gamma-láncspecifikus, Sigma) adunk hozzá. Inkubálás és mosás után hozzáadjuk a szubsztrátpuffert. Inkubálás után a reakciót leállítjuk, és 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget. Standardként tisztított humán IgG-t (Sigma) alkalmazunk.

A kiméra PM1 géneket hordozó vektorokkal transzfektált cos-sejtekből származó tenyészlé pozitív volt az emberihez hasonló antitest expressziója szempontjából, és a közelítő mennyiségeket is meghatároztuk az említett módon.

Ezt követően a kiméra PM1 géneket hordozó vektorokkal transzfektált cos sejtekből származó ugyanezen tenyészelvet megvizsgáltuk humán IL-6R-hoz való kötődési képessége szempontjából is. Az antigénhez való kötődés detektálására a lemezeket egy humán IL-6R elleni antitesttel, az MT18 egér-monoklonálisantitesttel (1. referenciapélda) vonjuk be. A blokkolást követően hozzáadjuk az oldható rekombináns humán IL-6R-t (SR344). Mosás után a mintákat sorozathígítjuk, és az egyes rezervoárakba mérjük. Inkubálás és mosás után alkalikus foszfáttal konjugált kecske antihumán IgG-t (gamma-láncspecifikus, Sigma) adunk hozzá. Inkubálás és mosás után hozzáadjuk a szubsztrátpuffert. Inkubálás után a reakciót leállítjuk, és 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget. Standardunk nem volt ebben a vizsgálatban.

Két minta származott az egér PM1 antitestben talál-takkal azonos V szakaszokat tartalmazó kiméra antitest kódoló génekkel végzett transzfektálásból (kiméra PM1a antitest, 4. ábra). Egy minta származott olyan kiméra antitest kódoló génekkel végzett transzfektálásból, amelyekben egyetlen aminosavcsere volt az L lánc V szakasz 107-es helyzetében a fent leírtak szerint (kiméra PM1b antitest, 4. ábra). Minden minta erős kötődést mutatott az IL-6R-hoz, amely a minta hígításával csökkent. Így a találmány szerint szerkesztett kiméra PM1 antitest működőképes, és jól kötődik saját antigénjéhez. Még jelentősebb az, hogy egy működőképes kiméra PM1 kimutatása közvetlen bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a helyes egér PM1 V szakaszokat klónoztuk és szekvenáltuk. A kiméra PM1 antitest – az L lánc V szakasz 107-es helyzetében mind a két aminosavval – jól kötődik antigénjéhez, az IL-6R-hoz. Úgy tűnik, hogy az egér PM1 L lánc V szakasz 107-es helyzete nem nagyon kritikus az antigénkötődés szempontjából, és akár aszparagin, akár lizin van ebben a helyzetben, mindkettő kielégítően működik. Mivel az egér PM1 antitest aszparagint tartalmaz az L lánc V szakasz 107-es helyzetében, a kiméra PM1 antitesttel végzett összes soron következő kísérletben az (a) változatot alkalmaztuk, vagyis azt a változatot, amelynek V szakasza azonos az egér PM1 antitestben találhatóval.

A kiméra PM1 antitest nagy mennyiségeinek stabil expresszálására egy új HCMV expressziós vektort szerkesztettünk, amely a dhfr gént tartalmazza. A kiméra PM1 antitest nagyobb koncentrációkban való expressziójának elérésére első lépésben a HCMV-V_H-HC_{T1} vektort (1. ábra) úgy módosítjuk, hogy ez a vektor egy „béna” (crippled) promotererősítő által expresszált dhfr gént tartalmazzon. A pSV-dhfr vektorból töröljük az SV40 erősítőelemeket [Subramani S. és munkatársai, Mol. Cell. Biol. 1, 854–864 (1981)], és a „béna” SV40 promotor által expresszált dhfr gént a HCMV-V_H-HC_{T1}-be inszertáljuk az SV40 promoter-erősítő által expresszált neo gén helyére. Az így kapott

új HCMV-V_H-HC_{T1}-dhfr vektorba ezután inszertáljuk az egér PM1 V szakaszt. A fenti javított expressziós vektor szerkesztését részletesen a 10. példában ismertetjük.

- 5 CHO dhfr(-) sejteket [Urlaub G. és munkatársai, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 77, 4216–4220 (1980)] két plazmid DNS-sel transzfektáltunk, a kiméra PM1a L lánc (HCMV-pmka-gk) expresszálására a HCMV-V_L-HC_K vektorral, és a kiméra PM1 H lánc (DHFR-ΔE-PMhgt1; 10. példa) expresszálására a HCMV-V_H-HC_{T1}-dhfr vektorral. Mindegyik plazmid esetén 10 μg/ml DNS-t adunk egy 1·10⁷ sejt/ml koncentrációjú, PBS-sel készült szuszpenzió 0,8 ml alikvotjához. A pulzust 1900 V, 25 μF kapacitással adjuk. Szobahőmérsékleten 10 perces pihentetési periódus után az elektroporált sejteket 10 ml α-MEM-hez (alfa minimál tápközeg) adjuk, amely nukleozidokat és 10% FCS-t tartalmaz. Egy éjszakán keresztüli inkubálás után a tápközeget nukleozidok nélküli, 10% FCS-t és 500 μg/ml G418-at (GIBCO) tartalmazó tápközegre cseréljük a dhfr⁺ és neo⁺ transzformánsok szelektálására. A szelektálás után a szelektált klónokat alkalmazzuk a gén megsokszorozására. A megsokszorozás egy ciklusa után 2·10⁻⁸ mol/l metotrexátban (MTX) egy sejt vonalat (PM1k3–7) szelektáltunk, amely mintegy 3,9 μg/10⁶ sejt/nap hozammal termel kiméra PM1a antitestet.

25 *Kiméra antitestek IL-6 humán IL-6R-hoz való kötődést gátló képességének meghatározása ELISA-módszerrel*

- 30 A transzfektált cos sejtekben vagy a stabil CHO sejt vonalban termelődött antitesteket vizsgáltuk annak meghatározására, hogy az antitestek képesek-e versengeni a biotinilezett IL-6-tal az IL-6R-hoz való kötődésben. A lemezeket MT18 egér-monoklonálisantitesttel vonjuk be. Blokkolás után oldható rekombináns humán IL-6R-t (SR344) adunk hozzá. Mosás után a cos-sejttenyészet sorozathígításával kapott mintát mérünk az egyes rezervoárakba, biotinilezett IL-6-tal együtt. Mosás után alkalikus foszfáttal kötött sztreptavidint adunk hozzá. Inkubálás és mosás után hozzáadjuk a szubsztrátpuffert. A reakcióelegyet inkubáljuk, majd a reakció leállítása után 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget. Az eredmények az 5. ábrán láthatók.

45 7. példa

Átformált humán PM1 antitestek szerkesztése

- A gyorsabb és hatékonyabb CDR-illesztés elérésére eljárást dolgoztunk ki a CDR-ek sorozatos illesztésére PCR-módszerrel. Ez az eljárás PCR-mutagenézis eljárásokon alapul [Kamman és munkatársai, 1989].

- 50 A CDR-illesztéshez a választott humán FR-eket tartalmazó templát-DNS-ek előállítására szükséges volt a megfelelő átformált humán V szakaszok újbóli klónozására megfelelő vektorokba. Az alysl1 és F10 plazmid DNS-ek az átformált humán D1.3 L és H láncot kódolják, és a humán REI-ből, illetve NEW-ből tartalmazák az FR-eket. Az alysl1-ből kivágjuk az átformált humán D1.3 L lánc V szakaszt kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, mintegy 500 bp NcoI-BamHI fragmenst, és HindIII-BamHI-gyel hasított pBR327-be

szubklónozva kapjuk a V1-lys-pBR327 vektort. A V1-lys-pBR327-ből származó HindIII-BamHI fragmenst HindIII-BamHI-gyel hasított pUC19-be inszertálva kapjuk a V1-lys-pUC19-et. Az F10-ből kivágjuk az átformált humán D1.3 H lánca V szakasz kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, mintegy 700 bp NcoI-BamHI fragmenst, és a pBR327 HindIII-BamHI helyére szubklónozzuk, egy HindII-NcoI adaptert alkalmazva, így kapjuk a Vh-lys-pBR327-et. A kapott vektorból ezután kivágunk egy HindIII-BamHI fragmenst, és HindIII-BamHI-gyel hasított pUC19 vektorba szubklónozva kapjuk a Vh-lys-pUC19-et.

Az alys11 plazmid és a templátban alkalmazott, az átformált humán D1.3 L lánca V szakasz kódoló DNS-szekvencia szerkesztését ismertetjük. Az F10 plazmidban az átformált humán D1.3 H lánca V szakasz kódoló, templátként alkalmazott DNS-szekvencia ismert [Verhoey és munkatársai, *Science* 237, 1534–1536 (1988), 2. ábra].

A 6. ábra mutatja a primereket és a PCR-reakciókat, amelyeket az átformált humán PM1 H lánca V szakasz első változatának szerkesztésére alkalmaztunk. Egy elülső A primer (APCR1; 41. számú szekvencia) és egy hátsó E primer (APCR4; 42. számú szekvencia) hibridizál a vektoron lévő DNS-szekvenciákkal. Noha az APCR1-et és APCR4-et specifikusan a pUC19 vektorhoz terveztük, az M13 univerzális szekvenciaprimer is alkalmazható.

A CDR1-illesztő/mutagén B primer (phv-1; 43. számú szekvencia), a CDR2-illesztő C primer (phv-2; 44. számú szekvencia) és a CDR3-illesztő D primer (phv-3; 45. számú szekvencia) hossza 40–60 bp, és az egér PM1 H lánca V szakaszából származó CDR-eket kódoló DNS-szekvenciából és a CDR-szakaszokat határoló templát DNS-ben lévő humán FR-ekből áll. Az első PCR-reakcióban az elülső APCR4 primert és a hátsó D primert alkalmazzuk. Az első PCR-terméket – amely az egér PM1 CDR3 szekvenciát tartalmazza – tisztítjuk és elülső primerként alkalmazzuk a második PCR-reakcióban, hátsó primerként a C primerrel együtt. A második és harmadik PCR-terméket – amelyek az egér PM1 CDR2-t és CDR3-at, illetve mindhárom egér CDR-t tartalmazzák – azonos módon primerként alkalmazzuk a soron következő PCR-lépésben. A negyedik PCR-terméket – amely a teljes átformált humán PM1 H lánca V szakaszt tartalmazza – tisztítjuk, HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, és további analízis céljára a pUC19 vektorba szubklónozzuk.

Az átformált humán PM1 H lánca V szakasz szerkesztésére három mutagén primert – phv-1, phv-2 és phv-3 – szintetizálunk, a primereket 8 mmol/l karbamidot tartalmazó 12%-os poliakrilamid gélen tisztítjuk. A phv-1 mutagén primert nemcsak az egér PM1 CDR1-illesztéshez terveztük, hanem a humán FR1 27-es és 30-as helyzetében a Ser → Tyr és Ser → Thr mutációkhoz is. Az egyes PCR-reakcióelegyek 100 µl-e tipikusan 10 mmol/l Tris-HCl-t (pH 8,3), 50 mmol/l KCl-t, 1,5 mmol/l MgCl₂-ot, 250 µmol/l dNTP-t, 50 ng templát-DNS-t (Vh-lys-pUC19), 2,5 egység AmpliTaq-ot (Perkin Elmer Cetus) és a pri-

mereket tartalmazzák. Az első PCR-reakciót 1 µmol/l phv-3 primer és 1 µmol/l APCR4 primer jelenlétében hajtjuk végre, az első, kezdő denaturálást 94 °C-on 1,5 percen keresztül végezzük, majd 94 °C-on 1 percen, 37 °C-on 1 percen és 72 °C-on 1 percen keresztüli denaturálási ciklust ismételünk meg harmincszor. Az illesztés és a szintézislépések közötti állási idő 2,5 perc. Az utolsó ciklus befejezése után 72 °C-on 10 percen keresztül végezzük a végső extenziót. Az 523 bp méretű PCR-terméket 1,6%-os alacsony olvadáspontú agarózgél alkalmazásával tisztítjuk, majd primerként alkalmazzuk a második PCR-reakcióban.

A második PCR-reakcióban primerként mintegy 1 µg tisztított első PCR-reakcióterméket és 25 pmol phv-2 mutagén primert alkalmazunk. A PCR-reakció körülményei azonosak az első PCR-reakció körülményeivel. Hasonlóképpen a második PCR-reakcióból származó, 665 bp PCR-terméket és a harmadik PCR-reakcióból származó, 737 bp PCR-terméket alkalmazzuk primerként a phv-1 primerrel a harmadik, illetve az APCR1 primerrel a negyedik PCR-reakcióban. A negyedik PCR-reakcióban kapott, 1172 bp PCR-terméket tisztítjuk, HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, majd az átformált humán PM1 H lánca V szakaszt tartalmazó, mintegy 700 bp fragmenst egy pUC19 vektorba szubklónozzuk. Négy szekvenált klón közül kettő tartalmazta a helyes aminosavszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát, ezt pUC-RVh-PM1a-nak jelöltük.

Az átformált PM1 H lánca V szakasz további változatainak szerkesztésére öt mutagén primert szintetizáltunk. Mindegyik PCR-reakciót alapvetően a fent ismertetett körülmények között hajtottuk végre. A (b) változathoz az első PCR-reakcióban a phv-m4 mutagén primert (Val-71 → Arg-71 csere; a számozás megfelel a Kabat és munkatársai által alkalmazott számozásnak, lásd 3. táblázat; 46. számú szekvencia) és az APCR4-et alkalmazzuk a pUC-RVh-PM1a templát-DNS-sel. Az első PCR-reakcióban kapott terméket tisztítjuk, és elülső primerként alkalmazzuk a második PCR-reakcióban, az APCR1 primerrel együtt. A második PCR-reakció terméket 1,6%-os alacsony olvadáspontú agarózgél alkalmazásával tisztítjuk, HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, és pUC19-be szubklónozzuk, így kapjuk a pUC-RVh-PM1b vektort. Hasonló módon, a (c) változatot (pUC-RVh-PM1c) a phv-nm mutagén primer (Asp-1 → Gln-1 csere; 47. számú szekvencia) és egy pUC-RVh-PM1b templát alkalmazásával; a (d) változatot (pUC-RVh-PM1d) a phv-m6 mutagén primer (Ile-48 → Met-48 csere; 48. számú szekvencia) és egy pUC-RVh-PM1b templát alkalmazásával; az (e) változatot (pUC-RVh-PM1e) a phv-m6 mutagén primer és egy pUC-RVh-PM1c templát alkalmazásával; az (f) változatot (pUC-RVh-PM1f) a phv-m7 mutagén primer (Thr-28 → Ser-28 és Phe-29 → Ile-29 csere; 47. számú szekvencia) és egy pUC-RVh-PM1b templát alkalmazásával állítjuk elő. Az átformált humán H lánca V szakasz (f) változatának aminosavszekvenciája és az azt kódoló nukleinsavszekvencia az 54. számú szekvenciában látható.

A 7. ábra mutatja az átfarmált humán PM1 L lánc V szakasz első változatának szerkesztésére alkalmazott primereket és PCR-reakciókat. Az átfarmált humán PM1 L lánc V szakasz első változatának szerkesztésére szintetizáljuk a pkv-1 CDR1-illesztő primert (51. számú szekvencia), a pkv-2 CDR2-illesztő primert (51. számú szekvencia) és a pkv-3 CDR3-illesztő primert (52. számú szekvencia), és 8 mol/l karbamidot tartalmazó, 12%-os poliakrilamid gélen tisztítjuk. A PCR-reakciókat a fent ismertetett módon hajtjuk végre. Az első PCR-reakcióban 1 μ mol/l pkv-3 és 1 μ mol/l APCR4 primert alkalmazunk. Az első PCR-reakcióban kapott 350 bp PCR terméket 1,5%-os, alacsony olvadáspontú agarózgél alkalmazásával tisztítjuk, és először primerként alkalmazzuk a második PCR-reakcióban. A második PCR-reakcióban kapott terméket tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és a CDR3-illesztett DNS-t tartalmazó 500 bp fragmenst a DNS-szekvencia meghatározása céljából egy pUC19 vektorba szubklónozzuk. Egy, a helyes szekvenciát tartalmazó DNS-plazmidot a következő PCR-reakcióban templát DNS-ként alkalmazunk. A harmadik PCR-reakcióban 25 pmol/l pkv-2 mutagén primert és 25 pmol/l APCR4-et alkalmazunk. A harmadik PCR-reakcióban kapott PCR-terméket tisztítjuk, és a pkv-1-gyel együtt primerként alkalmazzuk a negyedik PCR-reakcióban. Hasonló módon, a negyedik PCR-reakcióban kapott PCR-terméket alkalmazzuk primerként az APC R1 primerrel együtt az ötödik PCR-reakcióban.

Az ötödik PCR-reakcióban kapott PCR-terméket tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és a DNS-szekvencia meghatározására pUC19 vektorba szubklónozzuk. A CDR2 szakaszban probléma volt. Két további PCR-reakciót kellett végrehajtani. A hatodik és hetedik PCR-reakcióban a pUC19 vektorba klónozott ötödik PCR-terméket alkalmazzuk templát DNS-ként. A hatodik PCR-reakcióban primerként a pkv-2-t és az APCR4-et alkalmazzuk. A hatodik PCR-reakcióban kapott PCR-terméket tisztítjuk és primerként alkalmazzuk az APCR1 primerrel együtt a hetedik PCR-reakcióban. A hetedik PCR-reakcióban kapott PCR-terméket tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és egy 500 bp fragmenst pUC19 vektorba klónozzuk DNS-szekvenáláshoz. Öt szekvenált klón közül kettő rendelkezett a helyes DNS-szekvenciával. A klónt pUCRV1-PM1a-nak neveztük, szekvenciája az 55. számú szekvenciának felel meg.

Az átfarmált humán PM1 L lánc V szakasz további változatainak szerkesztésére egy pkv-ml mutagén primert (53. számú szekvencia) szintetizálunk. A PCR-reakciókat a fent leírt módon hajtjuk végre. Az első PCR-reakcióban a pkv-ml mutagén primert (Phe-71 $\rightarrow$ Tyr-71) és az APCR4 primert alkalmazzuk a pUC-RV1-PM1a templát DNS-sel. Az első PCR-reakcióban kapott PCR-terméket primerként alkalmazzuk az APCR1 primerrel együtt a második PCR-reakcióban. A második PCR-reakció termékét tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és DNS-szekvenáláshoz pUC19-be szubklónozzuk. A klón jelölése pUC-RV1-PM1b.

8. példa

Humán citomegalovírus közvetlen korai (HCMV) promotert alkalmazó vektorok szerkesztése genetikailag módosított antitestek expresszáására emlőssejtekben (1. ábra)

A kiméra PM1 L lánc és H lánc V szakaszokat kódoló DNS-fragmenseket a humán kappa típusú L láncok, illetve humán gamma-1 típusú H láncok emlőssejtekben való expresszáására kiindulásként HCMV vektorokba (HCMV-V_L-HC_K és HCMV-V_H-HC_L) illesztettük (1. ábra). A HCMV expressziós vektorok szerkesztése ismert [Maeda és munkatársai, Human Antibodies and Hybridomas 2, 124–134 (1991); Kettleborough C. A. és munkatársai, Protein Engineering 4, 773–783 (1991)]. Mindkét vektor pSV2neo-alapú [Southern P. J. és munkatársai, J. Mol. Appln. Genet. 1, 327–341 (1982)] és humán citomegalovírus promotert és erősítőt tartalmaz [Boshart M. és munkatársai, Cell 41, 521–530 (1985)] az immunglobulin L és H lánc magas szintű transzkripciójához. Az L lánc expressziós vektor a humán kappa C szakaszt kódoló genomális DNS-t tartalmazza [Rabbitts T. H. és munkatársai, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 113, 166–171 (1984)], és a H lánc expressziós vektor a humán gamma-1 C szakaszt kódoló genomális DNS-t tartalmazza [Takahashi N. és munkatársai, Cell 29, 671–679 (1982)]. A HCMV expressziós vektorok változékonyak, és mind átmeneti, mind stabil expresszióra alkalmazhatók számos emlőssejtípusban.

9. példa

Humán 1 α növekedési faktor (HEF-1 α) promotert alkalmazó vektorok szerkesztése genetikailag módosított antitestek expresszáására emlőssejtekben (8. és 9. ábra)

A humán 1 α polipeptidlánc-növekedési faktor (HEF-1 α) egyike a leggyakoribb proteineknek. A legtöbb sejtben expresszálódik. A humán EF-1 α promoter-erősítő transzkripció aktivitása mintegy 100-szoros az SV40 korai promotererősítő aktivitásának [Kim D. W. és munkatársai, Gene 91, 217–223 (1990); és Uetsuki T. és munkatársai, J. Biol. Chem. 264, 5791–5798 (1989)]. A 2.5 kb HEF-1 α promoter-erősítő szakasz a gén 5'-végét határoló, mintegy 1,5 kb hosszúságú DNS-ből, az első exonban 33 bp-ból, az első intronban 943 bp-ból, és a 2. exon első részében 10 bp-ból áll. A pEF321-CAT plazmid-DNS-ből kivágjuk a mintegy 2,5 kb HindIII–BamHI fragmenst [Kim D. W. és munkatársai, Gene 91, 217–223 (1990); és Uetsuki T. és munkatársai, J. Biol. Chem. 264, 5791–5798 (1989)], és a pdKCR vektor-DNS-be [Tsuchiya M. és munkatársai, EMBO J. 6, 611–616 (1987); O'Hare K. és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (3), 1527–1531 (1981)] klónozzuk a mintegy 300 bp hosszúságú, SV40 korai promotererősítő szekvenciát tartalmazó HindIII–BamHI fragmens helyettesítésére, így kapjuk a pTEF-1-et. A pTEF-1-et EcoRI-gyel emésztjük, Klenow-polimerázzal betöltjük, és HindIII linkerekkel ligáljuk. Ezután kivágunk egy mintegy 1,6 kb HindIII–SmaI fragmenst a módosított pTEF-1 vektor-DNS-ből.

A HCMV-12h-g τ 1(Δ E2) plazmid-DNS-t az 5. példa szerint előállított HCMV-12h-g τ 1-ből szerkesztjük meg, a HCMV-12h-g τ 1 EcoRI-lyel végzett részleges emésztésével, Klenow-polimerázzal való betöltéssel és önligálással.

A HCMV-12h-g τ 1(Δ E2) plazmidot EcoRI-lyel emésztjük, Klenow-polimerázzal betöltjük, és HindIII-mal emésztjük. A kapott mintegy 7 kb hosszúságú, a humán gamma-1 C szakaszt kódoló DNS-t tartalmazó fragmenst a fentiek szerint előállított 1,6 kb hosszúságú, a HEF-1 α promotererősítőt tartalmazó HindIII-SmaI fragmenssel ligálva kapjuk a HEF-12h-g τ 1-et. Ebben a vektorban a HEF-1 α promotererősítő szakasz ugyanaz, mint a pTEF-1-ben, az 5'-véget határoló 380 bp hosszúságú DNS kivételével. A HindIII-BamHI fragmensként jelen lévő H lánc V szakasz könnyen kicserélhető más H lánc V szakaszokkal.

Az átformált humán H lánc V szakaszt tartalmazó HindIII-BamHI DNS-fragmenst a pUC-RVh-PM1a-ból, pUC-RVh-PM1b-ből, pUC-RVh-PM1c-ből, pUC-RVh-PM1d-ből, pUC-RVh-PM1e-ből és pUC-RVh-PM1f-ből (7. példa) kivágjuk, és a HEF-12h-g τ 1 HindIII-BamHI részébe inszertáljuk, így kapjuk az RVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e, illetve RVh-PM1f expressziós vektorokat. Az RVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e és RVh-PM1f expressziós vektorok, valamint a HEF-12h-g τ 1 az átformált humán PM1 H lánc V szakasz (a), (b), (c), (d), (e), és (f) változatát, illetve az egér PM1 H lánc V szakaszt tartalmazzák.

A HEF-12k-gk L lánc expressziós vektor szerkesztésére a HEF-12h-g τ 1-ből kivágjuk a HEF-1 α promotererősítő szakaszt tartalmazó, mintegy 3,0 kb PvuI-HindIII fragmenst, és azt az 5. példa szerint előállított HCMV-12k-gk HCMV L lánc expressziós vektorból származó, mintegy 7,7 kb hosszúságú PvuI-HindIII fragmenssel ligáljuk, így kapjuk a HEF-12k-gk-t. Ami a HEF-12h-g τ 1 H lánc expressziós vektort illeti, a HEF-12k-gk-ban HindIII-BamHI fragmensként jelen lévő L lánc V szakasz könnyen kicserélhető egyéb L lánc V szakaszokkal.

Az átformált humán L lánc V szakaszt tartalmazó HindIII-BamHI DNS-fragmenst a pUC-RV1-PM1a-ból és pUC-RV1-PM1b-ből (7. példa) kivágjuk, és a HEF-12k-gk HindIII-BamHI részébe illesztjük, így kapjuk az RV1-PM1a, illetve RV1-PM1b expressziós vektorokat. Az RV1-PM1a és RV1-PM1b expressziós vektorok, illetve a HEF-PMk-gk az átformált humán L lánc V szakasz (a) és (b) változatát, illetve az egér PM1 L lánc V szakaszt tartalmazzák.

10. példa

Hiányos SV40 promotererősítő szekvenciához kötött dihidrofolát-reduktáz (dhfr) gént alkalmazó vektorok szerkesztése genetikailag módosított antitestek CHO-sejtekben való, magas szintű expressziójának biztosítására (10. és 11. ábra)

Az erősítőszekvencia eltávolítására az SV40 korai promotorból, a pSV2-dhfr plazmid DNS-t [Subramani

S. és munkatársai, Mol. Cell. Biol. 1, 854-865 (1981) (ATCC 33694) SphI-lyel és PvuII-vel emésztjük, Klenow-polimerázzal betöltjük, és önmagával ligáljuk, így kapjuk a pSV2-dhfr- Δ E-t (lásd 10. ábra).

5 A HCMV promotert, a H lánc V szakaszt és a humán gamma-1 C szakaszt tartalmazó, mintegy 3,7 kb EcoRI fragmenst EcoRI-lyel végzett részleges emésztéssel kivágjuk a HCMV-pMh-g τ 1-ből. Ezt a fragmenst az EcoRI-lyel emésztett pSV2-dhfr- Δ E-hez ligálva kapjuk a DHFR- Δ E-PMh-g τ 1-et.

Egy, a H lánc expressziós vektoron alapuló hasonló vektort szerkesztünk, amely a HEF-1 α promotererősítőt alkalmazza (lásd 11. ábra). A HCMV-12h-g τ 1-ből származó, mintegy 3,7 kb hosszúságú EcoRI fragmenst EcoRI-lyel emésztett pSV2-dhfr- Δ E-hez ligálva kapjuk a DHFR- Δ E-12h-g τ 1-et. A DHFR- Δ E-12h-g τ 1-ben a dhfr cDNS-szekvencia utáni BamHI helyet BamHI-lyel végzett részleges emésztéssel eltávolítjuk, Klenow-polimerázzal betöltjük, és önmagával ligáljuk. A módosított DHFR- Δ E-12h-g τ 1 DNS-ből kivágjuk a dhfr cDNS-t tartalmazó, mintegy 4 kb hosszúságú PvuI-BamHI fragmenst, és a 12. példa szerint előállított RVh-PM1f-4-ből származó, mintegy 3 kb hosszúságú PvuI-BamHI fragmenssel ligáljuk, így kapjuk a DHFR- Δ E-2RVh-PM1f-et,

25 A fentiek szerint előállított, javított expressziós plazmidok a találmány szerinti átformált humán PM1 antitestek előállítására alkalmazhatók,

11. példa

Átformált humán PM1 antitestek különböző változatainak expressziója és analízise

Az átformált humán PM1 L és H láncokat expresszáló HEF-1 α vektorokat cos-sejtekbe kotranszfektáljuk. Standard kontrollként kiméra PM1 L és H láncokat expresszáló HEF-1 α vektorokkal is kotranszfektáljuk a cos-sejteket. 3 nap elteltével a transzfektált cos-sejtek tenyészlét összegyűjtjük és ELISA-módszerrel analizáljuk (1) a felülszóban jelen lévő humán IgG antitest mennyiségére és (2) a fenti humán ISG IL-6R-hoz való kötődési képességére. Később ugyan ezen mintákat ELISA-val megvizsgáljuk az antitest humán IL-6 humán IL-6R-hoz való kötődését gátló képességére is.

Az átformált humán PM1 L lánc V szakasz két változatát úgy értékeljük ki, hogy cos-sejteket kotranszfektálunk az átformált humán PM1 L-láncokat expresszáló két vektor (RV1-PM1a és RV1-PM1b) egyikével, és a kiméra PM1 H láncot expresszáló vektorral (HCMV-PMh-g τ 1). A sejteket a kiméra PM1 L és H láncokat expresszálóvektorokkal (HCMV-PMka-gk és HCMV-PMh-g τ 1) is kotranszfektáljuk. A tisztítatlan cos-sejtek felülszójával kapott adatok azt mutatják, hogy az átformált humán PM1 L lánc (a) változata egyenértékű a kiméra PM1 L láncsal az IL-6R-hez való kötődés vizsgálatában. Az átformált humán PM1 L lánc (b) változata azonban láthatólag elveszti az IL-6R-hez való kötődés képességét (12. ábra). Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az FR3 71-es helyzetben végzett változtatás fenil-alaninról (ami a humán

REI-ben van, ahogy a CAMPATH-1H-ra módosították) tirozinra (ami a természetes humán REI-ben és eger PM1-ben van) nagyon káros a működőképes antigén-kötőhely képződése szempontjából.

Az átformált humán PM1 L lánc V szakasz (a) változatát választottuk legjobb változatként. Az átformált humán PM1 H lánc V szakasz különböző változatainak vizsgálatára végzett további kísérletekben az átformált humán PM1 L lánc V szakasz (a) változatát mindig alkalmaztuk.

Az átformált humán PM1 H lánc V szakasz hat változatának kiértékelésére a cos-sejteket az átformált humán PM1 H láncokat expresszáló hat vektor (RVh-PM1a, RVh-PM1b, RVh-PM1c, RVh-PM1d, RVh-PM1e, és RVh-PM1f) egyikével és az átformált humán PM1 L lánc (a) változatát expresszáló vektorral (RV1-P-M1a) kotranszfektáljuk. A sejteket kiméra PM1 L és H láncokat expresszáló vektorokkal (HEF-PMk-gk és HEF-PMh-gr1) is kotranszfektáljuk. Tisztítatlan cos-sejtek felülúszóival kapott előzetes adatok azt mutatják, hogy az átformált humán PM1 L lánc (a) változata és az átformált humán PM1 H lánc (f) változata egyenértékű a kiméra PM1 L- és H láncokkal az IL-6R-hez való kötődés vizsgálatában.

A fenti előzetes eredmények megerősítésére a kiméra és átformált humán PM1 antitesteket a cos-sejtek felülúszójából koncentrálnak és tisztítjuk Protein A alkalmazásával. Közlebből, a cos-sejtek tenyésztését 100 kd kizárású ultraszűrőberendezéssel (Amicon) koncentrálnak. A koncentrált tenyésztet Protein A agaróz (Affi-Gel Protein A MAPSII kit, BioRad) alkalmazásával tisztítjuk. Röviden, a koncentrált tenyésztet Protein A agarózoszlopára visszük fel, amelyet öt oszloptér fogatnyi kötőpufferrel ekvilibráltunk. Az oszlopot 15 ágytér fogatnyi elúciós pufferrel mossuk. Az eluátumot koncentrálnak, és a puffert PBS-re cseréljük mikrokonzentrátor (Centricon 10, Amicon) alkalmazásával. A tisztított antitesteket használjuk további analízisre.

A kiméra PM1 antitest, valamint az L lánc V szakasz (a) változatát és a H lánc V szakasz (a), (b), (c), (d), (e) és (f) változatát tartalmazó, átformált humán PM1 antitestek tisztított mintáit analizáljuk. Az L lánc V szakasz (a) változata plusz a H lánc (f) változata nyilvánvalóan a legjobb átformált humán PM1 antitest. Az IL-6R-hoz ugyanolyan jól kötődik, mint a kiméra PM1 antitest (13. ábra). A humán IL-6 IL-6R-hez való kötődését is ugyanolyan jól gátolja, mint az eger vagy a kiméra PM1 antitestek (14. ábra).

12. példa

Az átformált humán PM1 V szakaszok rekonstruálása az expresszió mértékének javítására

Az átformált humán PM1 L lánc és H lánc V szakaszok szignálszekvenciáit kódoló DNS-szekvenciákban (lásd 54. és 55. számú szekvenciát) lévő intronok eltávolítására a V szakaszokat kódoló cDNS-eket PCR primerek alkalmazásával újraklózzuk. Az RV1-PM1a és RVh-PM1f L és H lánc expressziós vektorokat cos-sejtekbe kotranszfektáljuk. 48 óra elteltével preparáljuk az össz-RNS-t [Chirgwin és munkatársai, Biochemistry 18,

5294–5299 (1979)], és 5 µg össz-RNS-t alkalmazunk az első szál cDNS-szintézisre az egerantitest V szakaszok PCR-klónozására leírtak szerint. Három PCR-primert tervezünk és szintetizálunk. A LEV-P1 (60. számú szekvencia) és a HEV-P1 (58. számú szekvencia) az illesztő donorszekvenciát és a BamHI helyet tartalmazza, ezeket elülső primerként alkalmazzuk az L, illetve H lánc V szakaszhoz. A HEV-P2 (59. számú szekvencia) a Kozak-konszenzusszekvenciát és a HindIII helyet tartalmazza, ezt hátsó primerként alkalmazzuk mind az L, mind a H lánc V szakaszokhoz. Minden egyes 100 µl PCR-reakcióelegy 20 mmol/l Tris-HCl-t (pH 8,8), 10 mmol/l KCl-t, 10 mmol/l (NH₄)₂SO₄-ot, 2 mmol/l MgSO₄-ot, 0,1% Triton X-100-at, 0,1 µg BSA-t, 250 µmol/l dNTP-t, 2,5 egység Vent DNS-polimerázt (Biolabs, U.K.), 50% első szál cDNS-reakcióelegyet és 100-100 pmol elülső és hátsó primert tartalmaz. Az egyes PCR-csőveket 50 µl ásványolajjal felülrétegezzük, majd 94 °C-on 1,5 percen keresztül, kezdő hőkezelés után 94 °C-on 1 percig, 50 °C-on 1 percig és 72 °C-on 1 percig tartó kezeléssel álló ciklussal, majd 72,2 °C-on 10 percen keresztül kezeljük. Az L lánc V szakaszt tartalmazó, 408 bp PCR-terméket és a H lánc V szakaszt tartalmazó, 444 bp PCR-terméket 2,0% alacsony olvadáspontú agarózgél alkalmazásával tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és pUC19 vektorba szubklónozzuk, így kapjuk a pUC-RV1-PM1a-3 és pUC-RVh-PM1f-3 vektort.

Kimutattuk, hogy az átformált humán PM1 L lánc és H lánc V szakaszok nem megfelelő illesztő donor- és akceptorhelyeket tartalmaznak (lásd 54. és 55. számú szekvencia). Az L lánc V szakaszban lévő helyeket nem használják gyakran (a mRNS mintegy 10%-a), de a H lánc V szakaszban lévő helyeket gyakran használják (a mRNS mintegy 90%-a). Ez a hibás illeszkedés az átformált humán PM1 antitest kismértékű expresszióját eredményezi. A V szakaszok hibás illeszkedésének kiküszöbölésére az illesztő donorhelyeket PCR-alapú módszer alkalmazásával eltávolítottuk. A H lánc V szakaszhoz szintetizáljuk a hátsó NEW-SP1 primert (61. számú szekvencia) és az elülső NEW-SP2 primert (62. számú szekvencia), ezzel a DNS-szekvenciát TGG GTG AGA-ról TGG GTT CGC-re változtatjuk. A PCR-reakciók körülményei a cDNS-klónozásra fent leírtakkal azonosak, azzal az eltéréssel, hogy templát DNS-ként 50 µg pUC-RVh-PM1f-3-at, és primerként HEV-P2-t és NEW-SP2-t, vagy HEV-P1-et és NEW-SP1-et alkalmazunk.

A két PCR-reakcióból származó PCR-terméket 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, és PCR-kapcsolási reakcióban alkalmazzuk. A 0,5 µg első PCR-terméket és 5 egység Vent DNS-polimerázt tartalmazó 98 µl PCR-reakcióelegyet 94 °C-on 2 percen keresztül, 50 °C-on 2 percen keresztül, és 72 °C-on 5 percen keresztül inkubáljuk, majd hozzáadjuk a HEV-P1 és HEV-P2 primereket, 100-100 pmol mennyiségben. A PCR-csőveket 30 µl ásványolajjal felülrétegezzük, és 94 °C-on 1 perc, 50 °C-on 1 perc és 72 °C-on 1 perc inkubálásból álló ciklussal 25-ször kezeljük, majd 72 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk.

Hasonló módon eljárva az átformált humán PM1 L lánc V szakaszban lévő illesztődonorhelyet REI–SP1 (63. számú szekvencia) és REI–SP2 (64. számú szekvencia) PCR-primerek alkalmazásával távolítjuk el, amellyel a DNS-szekvencia CAG GTA AGG-ről CAG GAA AGG-re változik. Mindkét PCR-terméket – az L lánc V szakaszra egy 408 bp DNS-fragmenst és a H lánc V szakaszra egy 444 bp DNS-fragmenst – 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgél alkalmazásával tisztítjuk, HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, és pUC19 vektorba szubklónozzuk, így kapjuk a pUC–RV1–PM1a–4-et, illetve a pUC–RVh–PM1f–4-et.

Az RVh–PM1f–4 szerkesztésére az RVh–PM1f HindIII–BamHI fragmenst a pUC–RVh–PM1f–4-ből kivágott HindIII–BamHI fragmenssel helyettesítjük. Az átformált humán PM1 antitest L lánc V szakasz (a) változatának szekvenciája – amelyből az intronokat töröltük – az 57. számú szekvencia; és az átformált humán PM1 antitest H lánc V szakasz (f) változatának szekvenciája – amelyből az intronokat töröltük – az 56. számú szekvencia.

13. példa

Átformált humán AUK12–20 antitest L lánc V szakaszt kódoló DNS szerkesztése

Az átformált humán AUK12–20 antitest H lánc V szakaszt kódoló DNS szerkesztésének folyamata a 16. ábrán látható. A humán antitest L lánc V szakaszt kódoló gént a pUC19 vektorba HindIII és BamHI restrikciós enzimek alkalmazásával építjük be. Nyolc PCR-primert (A – H) állítunk elő, és az első PCR-reakcióban a V szakaszt kódoló gént alkotó 4 szakaszt sokszorozzuk meg. Az A és H primer a pUC19 vektorban lévő DNS-szekvenciákkal homológiát mutat. A B, C és D primerek hossza 40–60 bp, és mindegyik a beillesztendő CDR gén szekvenciájával rendelkezik. Az E, F és G primer a B, C, illetve D primer 5'-végén lévő 15–20 bp hosszúságú DNS-szekvenciával homológ. A négy első PCR-ben alkalmazott primerpárok az A és E, B és F, C és G, illetve D és H.

Az A–E PCR-termék kódolja az FR1-et, és a B–F PCR-termék a CDR1-et és az FR2-t. Az A–E fragmens 3'-terminális része és a B–F fragmens 5'-terminális része 15–20 bp hosszúságban homológ, amely lehetővé teszi ezen fragmensok kapcsolódását a későbbiekben. Hasonlóképpen a B–F fragmens homológ a CDR2-t és FR3-at kódoló C–G fragmenssel. A C–G fragmens továbbá homológ a CDR3-at és FR4-et kódoló D–H fragmenssel. Így ez a négy fragmens kölcsönös homológiája következtében összekapcsolható. A fenti négy fragmens kapcsolása után a PCR-reakcióegyben hozzáadjuk az A és H primereket a második PCR-ben a négy fragmens helyes összekapcsolásával képződött termék megsokszorozása céljából. Az így kapott második PCR-termék három beillesztett CDR-t tartalmaz, a terméket HindIII-mal és BamHI-gyel végzett emésztés után pUC19 vektorba szubklónozzuk.

Közelebbről, templátként pUC–RV1–PM1a–4 plazmidot alkalmazunk, amelyet úgy állítunk elő, hogy

az átformált humán antitest L lánc V szakasz (a) változatát kódoló DNS-t a pUC19 plazmidba inszertáljuk.

A fent említett A–H primerek szekvenciája a következő:

Hátsó primer	Szekvencia száma	Elülső primer	Szekvencia száma
A reverz	83	E 1120–L1b	66
B 1120–L1	65	F 1220–L2b	68
C 1220–L2	67	G 1220–L3b	70
D 1220–L3	69	H univerzális	82

A CDR-illesztéshez a 1220–L1, 1220–L2 és 1220–L3 hátsó primereket alkalmazásuk előtt 8 mol/l karbamidot tartalmazó 12%-os poliakrilamid gélen tisztítjuk.

A PCR-reakcióegy 100 µl-e 20 mol/l Tris–HCl-t (pH 8,8), 10 mmol/l KCl-t, 100 mmol/l (NH₄)₂SO₄-ot, 2 mmol/l MgSO₄-ot, 0,1% Triton X–100-at, 1 µg BSA-t, 250 µmol dNTP, 5 egység Vent DNS-polimerázt (BioLabs. U.K.), 50 ng pUC–RV1–PM1a–4 DNS-t, és az egyes elülső és hátsó primerekből 100–100 pmol-t tartalmaz. Az egyes PCR-csöveket 50 µl ásványolajjal felülrétegezzük, és egy kezdeti denaturálás után 94 °C-on 1,5 percen keresztül, 30 reakcióciklust végzünk, egy ciklus 94 °C-on 1 perc, 50 °C-on 1 perc és 72 °C-on 1 perc inkubálásból áll, majd a reakcióegyet 72 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk.

Az egyes 252 bp (A–E), 96 bp (B–F), 130 bp (C–G) és 123 bp (D–H) PCR-termékeket 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgéllel (FMC, Bio. Products, USA) tisztítjuk. Közelebbről, a DNS-fragmenst tartalmazó agarózgél darabot kivágjuk, 65 °C-on 5 percen keresztül megolvasztjuk, és azonos térfogatú 20 mmol/l Tris–HCl puffert (pH 7,5) adunk hozzá, amely 2 mmol/l EDTA-t és 200 mmol/l NaCl-t tartalmaz. Az elegyet fenollal és kloroformmal extraháljuk. A DNS-fragmenst etanolos kicsapással visszanyerjük, 10 mmol/l koncentrációjú, 1 mmol/l EDTA-t tartalmazó Tris–HCl pufferben (pH 7,5) oldjuk, és így alkalmazzuk a PCR-kapcsolási reakcióban.

Ezután a PCR-reakcióegyeket – amelyek 98 µl-e 0,2 µg első PCR-terméket és 5 egység Vent DNS-polimerázt tartalmaz – 94 °C-on 2 percen keresztül, 50 °C-on 2 percen keresztül és 72 °C-on 5 percen keresztül inkubáljuk a kapcsolási reakció lejárásáért. Ezután 100–100 pmol A (reverz) és H (univerzális) primert adunk az elegyhez, ezzel térfogatát 100 µl-re állítjuk be, és a reakcióegyet 50 µl ásványolajjal felülrétegezzük, majd 30 reakcióciklusnak vetjük alá, egy ciklus 94 °C-on 1 perc, 50 °C-on 1 perc és 72 °C-on 1 perc inkubálásból áll, majd 72 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk az elegyet.

A második PCR-terméket – amely 558 bp hosszúságú, és egy L lánc V szakaszt tartalmaz, amelybe az AUK12–20 egér-monoklonális antitest L lánc CDR-jei vannak beillesztve – 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgéllel tisztítjuk, HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, és pUC19 vektorba szubklónozzuk. A ka-

pott pUC–RL_L–1220a vektort szekvenáljuk. Az L lánc V szakasz aminosavszekvenciáját és az azt kódoló nukleotidszekvenciát a 71. számú szekvencia mutatja.

Ezután egy L lánc expressziós vektor szerkesztésére az átfarmált humán AUK12–20 antitest L lánc V szakaszt tartalmazó HindIII–BamHI DNS-fragmenst kivágjuk a fenti pUC–RV_L–1220a plazmidból, és a HEF–12k–gk L lánc expressziós vektor HindIII–BamHI helyére illesztjük, így kapjuk az átfarmált humán AUK12–20 antitest L lánc V szakasz (a) változatára az RV_L–1220a expressziós vektort.

14. példa

Átfarmált humán AUK12–20 antitest L lánc expressziója és analízise

Átmeneti expresszió COS sejtekben

Az átfarmált humán AUK12–20 antitest L láncához szerkesztett RV_L–1220a expressziós vektort és a kiméra 12–20 antitest H láncához szerkesztett HEF–12h–gr1 expressziós vektort (5. példa) COS-sejtekbe kotranszfektáljuk az átfarmált humán AUK12–20 antitest L lánc V szakasz (a) változatának kiértékelése céljából. Közlebről, a COS-sejteket 1·10⁷ sejt/ml koncentrációban szuszpendáljuk foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS), és a szuszpenzió 0,8 ml-éhez hozzáadjuk a plazmid DNS-eket (10 µg-ot az egyes plazmidokból). A szuszpenziót 1900 V és 25 µF elektromos kapacitású pulzusokkal kezeljük, Gene Pulser készülék (Bio Rad) alkalmazásával.

Szobahőmérsékleten 10 percen keresztüli pihentetés után az elektroporált sejteket 10% magzati borjúsérummal kiegészített 8 ml DMEM tápközeghez (GIBCO) adjuk, 72 órán keresztül inkubáljuk, majd a felülúszót összegyűjtjük, a sejttörmeléket centrifugálással eltávolítjuk, és aseptikus körülmények között rövidebb ideig 4 °C-on, hosszabb időn át –20 °C-on tároljuk.

Emberihez hasonló antitestek meghatározása ELISA-val

A transzfektált COS-sejtek felülúszóját ELISA-val vizsgáltuk és kimutattuk a kiméra antitestek termelődését. Az emberihez hasonló antitestek detektálására a lemezt kecske antihumán IgG-vel (teljes molekula, Sigma) vonjuk be. Blokkolás után a COS-sejtek felülúszóját sorozathígítjuk, és az egyes rezervoárakba mérjük.

A lemezt inkubáljuk és mossuk, majd alkalikus foszfátázzal konjugált kecske antihumán IgG-t α lánc-specifikus, Sigma) adunk hozzá. Inkubálás és mosás után hozzáadjuk a szubsztátoldatot. További inkubálás után a reakciót leállítjuk és 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget. Standardként tisztított IgG-t (Sigma) alkalmazunk.

Humán IL–6R-hoz való kötődési képesség kimutatása ELISA-val

A transzfektált COS sejtek felülúszóját ELISA-val vizsgáltuk annak kimutatására, hogy a termelődött emberihez hasonló antitest képes-e kötődni az antigénhez, vagyis a humán IL–6R-hoz. A lemezt MT18 egérmonoklonális antitesttel vonjuk be (1. referenciapélda). 1% BSA-val való blokkolás után oldható rekombináns humán IL–6R-t (SR344) adunk a lemezre. A lemezt

mossuk, majd a COS sejtekből származó felülúszót sorozathígítjuk, és bemérjük a lemez rezervoárjaiba. Inkubálás és mosás után a rezervoárakba alkalikus foszfátázzal konjugált kecske antihumán IgG-t adunk, és további inkubálás és mosás után hozzáadjuk a szubsztátoldatot. Inkubálás után a reakciót leállítjuk, és 405 nm-en mérjük az optikai sűrűséget.

Az eredményeket a 17. ábrán mutatjuk be. Az átfarmált humán AUK12–20 antitest L lánc V szakasz (a) változat és egy kiméra 12–20 antitest H lánc kombinációját tartalmazó, emberihez hasonló antitest ugyanolyan erősen kötődött az IL–6R-hoz, mint a kiméra 12–20 antitest. A 405 nm-en mért optikai sűrűség hígítástól függő módon változott, megerősítve, hogy a minta IL–6R elleni antitestet tartalmaz. Ezenkívül ezek az eredmények azt mutatják, hogy az átfarmált humán AUK12–20 antitest L lánc (a) változatának antigénkötő képessége ugyanolyan nagy, mint a kiméra AUK 12–20 antitest L láncé.

15. példa

Átfarmált humán AUK12–20 antitest H láncot kódoló gén szerkesztése HSGI konszenzusszekvencia alkalmazásával

A 13. példában leírtak szerint eljárva illesztjük be az AUK12–20 antitest H lánc V szakasz CDR-eket az FR-ként HSGI konszenzusszekvenciákat tartalmazó átfarmált humán V_HA425-be [Kettleborough és munkatársai, Protein Engineering 4, 773–783 (1991)]. Első lépésben az átfarmált humán V_HA425-öt kódoló HindIII–BamHI DNS-fragmenst (idézett irodalom 3. ábra) kivágjuk a HCMV–RV_HA–425–r1 plazmidból, és a pUC19 vektor HindIII–BamHI helyeire szubklónozzuk. A kapott pU–CRV_HA–425a-t alkalmazzuk ezután templátként. Nyolc PCR-primert (A1–H1) szintetizálunk. Az 1220–H1 primert a CDR1-illesztésre és egy T–28–> 5–28 mutáció bevitelére, az 1220–H3 primert a CDR3-illesztésre és egy 5–94–> R–94 mutáció bevitelére terveztük. Az 1220–H1, 1220–H2 és 1220–H3 primereket 8 mol/l karbamidot tartalmazó 12%-os poliakrilamid gélen tisztítjuk alkalmazásuk előtt. Az egyes primerek nukleotidszekvenciája a következő.

Hátsó primer	Szekvencia	Elülső primer	Szekvencia
A1 reverz	83	E1 1220–H1b	73
B1 1220–H1	72	F1 1220–H2b	75
C1 1220–H2	74	G1 1220–H3b	77
D1 1220–H3	76	H1 univerzális	82

A PCR-reakció körülményei azonosak a 13. példában ismertetett körülményekkel, azzal az eltéréssel, hogy templát DNS-ként a pUC–RV_HA–425a-t, és a H lánc CDR-ek illesztésére a fenti primereket alkalmazzuk. Az első PCR-reakciók kivitelezésére az A1–E1, B1–F1, C1–G1 és D1–H1 primerpárokat alkalmazzuk, és az első PCR-termékeket – 186 bp (A1–E1), 75 bp (B1–F1), 173 bp (C1–G1) és 105 bp (D1–H1) – 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgéllel tisztítjuk, és a so-

ron következő PCR kapcsolási reakcióban alkalmazzuk. A 13. példában ismertetett körülményekkel összhangban, 0,2 µg első PCR-terméket alkalmazunk a második PCR-reakció kivitelezésére (amely a PCR-kapcsolást is magában foglalja), így kapjuk a 495 bp hosszúságú második PCR-terméket, amely egy humán H lánc V szakaszt kódoló DNS-t tartalmaz, amelybe eger AUK12-20 antitest H lánc V szakasz CDR-ek vannak illesztve, ezt a PCR-terméket 2,5%-os alacsony olvadáspontú agarózgél alkalmazva tisztítjuk. A PCR-terméket BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, majd a kapott HindIII-BamHI fragmenst pUC19-be szubklónozzuk és a kapott pUC-RV_H-1220a plazmidot szekvenáljuk.

Kimutattuk, hogy az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakaszt kódoló DNS-szekvencia egy olyan szekvenciát tartalmaz, amely jól egyezik egy illesztő donorszekvenciával, amely abnormalis illesztést okozhat, ami problémát jelentett az átformált humán PM1 antitest előállításában is. Ezért ezt a DNS-szekvenciát PCR-rel módosítottuk. Szintetizáljuk a mutagén primereket, az SGI-SP1-et (97. számú szekvencia) és az SGI-SP2-t (98. számú szekvencia). Ezek a primerek az AAG GTG AGC DNS-szekvenciát AAA GTC AGC DNS-szekvenciára változtatják. A PCR-reakció körülményei a fent megadottak, azzal az eltéréssel, hogy templát DNS-ként 50 ng pUC-RV_H-1220a-t, és primerként az SGI-SP1-et és az univerzális primert (82. számú szekvencia), vagy az SGI-SP2-t és a reverz primert (83. számú szekvencia) alkalmazzuk.

A két PCR-reakcióból származó PCR-termékeket 2%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, és PCR kapcsolási reakcióban alkalmazzuk. A PCR-reakcióelegy 98 µl-e az első PCR-termékből 0,2 µg-ot és 5 egység Vent DNS-polimerázt tartalmaz. A reakcióelegyet a kapcsolási reakció lejátszatására 94 °C-on 2 percen, 55 °C-on 2 percen, és 72 °C-on 5 percen keresztül inkubáljuk. Ezután a reakcióelegyhez 100-100 pmol univerzális, illetve reverz primert adunk, majd 50 µl ásványolajjal felülrétegezzük az elegyet, és a második PCR-reakciót 30 ciklusban lejátszatjuk, egy ciklus 94 °C-on 1 perc, 50 °C-on 1 perc és 72 °C-on 1 perc inkubálásból áll, majd a reakcióelegyet 72 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk. A második PCR-reakcióban kapott 495 bp DNS-fragmenst 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgéllel tisztítjuk, és pUC19 vektorba szubklónozzuk, majd szekvenáljuk. Így kapjuk a pUC-RV_H-1220a-2 vektort.

Ezt követően az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakaszt kódoló DNS-t tartalmazó HindIII-BamHI DNS-fragmenst kivágjuk a pUC-RV_H-1220a-2-ből, és a HEF-12h-gr1 H lánc expressziós vektor HindIII-BamHI helyeire inszertálva kapjuk az RV_H-1220a expressziós vektort az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc (a) változatához.

Az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (b) – (d) változatait kódoló gének szerkesztésére két pár mutagén primert szintetizálunk. Az egyes PCR-reakciókat lényegében a fent leírt körülmények között hajtjuk végre. A (b) változat szerkesztésére két első

PCR-reakcióban vagy az univerzális primert (82. számú szekvencia) és az 1220H-ml mutagén primert (78. számú szekvencia), vagy a reverz primert (83. számú szekvencia) és az 1220H-m1b mutagén primert (79. számú szekvencia), valamint templátként a pUC-RV_H-1220a-t alkalmazzuk. A 202 bp, illetve 323 bp hosszúságú első PCR-termékeket 2,0%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, és a második PCR-reakcióban alkalmazzuk (amely magában foglalja a PCR kapcsolási reakciót is) a fent ismertetett körülmények között, így egy 495 bp terméket [(b) változat] kapunk. A terméket HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük, és pUC19-be szubklónozzuk, így kapjuk a pUC-RV_H-1220b-t.

Hasonlóképpen az 1220H-m2 (80. számú szekvencia) és 1220H-m2b (81. számú szekvencia) mutagén primerek és egy pUC-RV_H-1220a templát alkalmazásával PCR-reakcióban egy PCR-terméket [(c) változat] kapunk. A terméket HindIII és BamHI restriktív endonukleázokkal emésztve, és a pUC19 vektor HindIII-BamHI helyeire inszertálva kapjuk a pUC-RV_H-1220c-t. Továbbá az 1220H-m1a (78. számú szekvencia) és 1220H-m1b (79. számú szekvencia) mutagén primerek és egy pUC-RV_H-1220c templát alkalmazásával PCR-reakcióban egy PCR-terméket [(d) változat] kapunk, amelyet HindIII és BamHI restriktív endonukleázokkal emésztve és pUC19 vektor HindIII-BamHI helyeire inszertálva kapjuk a pUC-RV_H-1220d-t.

Megjegyzendő, hogy az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (b) változat aminosavszekvenciáját és az azt kódoló nukleotidszekvenciát a pUC-RV_H-1220b plazmidban a 84. számú szekvencia mutatja; és az átformált humán AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (d) változat aminosavszekvenciáját és az azt kódoló nukleotidszekvenciát a pUC-RV_H-1220d plazmidban a 85. számú szekvencia mutatja.

Ezután az expressziós vektorok szerkesztésére az átformált humán AUK12-20 H lánc V szakaszt tartalmazó HindIII-BamHI fragmenseket kivágjuk a pUC-RV_H-1220b, pUC-RV_H-1220c, illetve pUC-RV_H-1220d plazmidokból, és a HEF-12h-gr1 H lánc expressziós vektor HindIII-BamHI helyeire inszertáljuk. Így kapjuk az RV_H-1220b-t, RV_H-1220c-t, illetve RV_H-1220d-t.

16. példa

Átformált humán AUK12-20 antitest különféle változatainak expressziója és analízise

COS sejteket az átformált humán AUK12-20 antitest H láncra szerkesztett négy expressziós vektor (RV_H-1220a, RV_H-1220b, RV_H-1220c és RV_H-1220d) egyikével és egy VR_L-1220a expressziós vektorral kotranszfectálunk az átformált humán AUK123-20 antitest H lánc V szakasz négy változatának kiértékelésére. Összehasonlításként COS-sejteket a kiméra 12-20 antitest L láncra és H láncra szerkesztett expressziós vektorokkal (HEF-12h-gr1 és HEF-12-gk) kotranszfectálunk. A humán IL-6R-hoz való kötődési vizsgálatban egy, az átformált humán

AUK12–20 antitest L láncból és az átfarmált humán AUK12–20 antitest H lánc (b) változatából álló átfarmált humán AUK12–20 antitest és egy, az átfarmált humán AUK12–20 antitest L láncból és az átfarmált humán AUK12–20 antitest H lánc (d) változatából álló átfarmált humán AUK12–20 antitest ugyanolyan jó kötődést mutat, mint a kiméra 12–20 antitest. Ezek az eredmények a 18. és 19. ábrán láthatók.

17. példa

Átfarmált humán sle1220 antitest H láncot kódoló gén szerkesztése humán HAX antitest alkalmazásával

Az AUK12–20 egér-monoklonális antitest H lánc V szakasszal legnagyobb homológiát mutató humán antitest a „Leeds” proteinadatbázis szerint a HAX [J. Immunol. 139, 2496–2501 (1987); 21/28 hibridóma által termelt antitest, amely egy SLE-beteg B-sejtjeiből származott; aminosavszekvenciája a fenti irodalmi hely 6. ábráján, nukleotidszekvenciája annak 4. és 5. ábráján látható]. Az átfarmált humán sle1220H antitest H lánc V szakaszt a HAX antitest FR-jei és az AUK12–20 egér-monoklonális antitest H lánc V szakasz CDR-jei alkalmazásával szerkesztjük meg.

Az átfarmált humán sle1220 antitest H lánc V szakasz (a) változatát kódoló teljes DNS-t kémiai úton szintetizáljuk. Az sle1220H antitest H lánc V szakaszt kódoló, 439 bp teljes hosszúságú DNS-t úgy tervezzük meg, hogy a DNS-t hat, egyenként 90–94 bp hosszúsági oligonukleotidra osztjuk fel, amelyek egymást 21 bp-al átfedik (sle1220h 1–6; 86–91. számú szekvencia). Az oligonukleotidok tervezésében teszteljük a másodlagos szerkezetet, és a szerkezetileg problémás helyeken a kodon harmadik nukleotidját megváltoztatjuk anélkül, hogy ezzel az általa kódolt aminosavat megváltoztatnánk. A fenti oligonukleotidok közötti hasonlóságot, és a kettős szálú szintetikus DNS szerkesztésére szolgáló eljárást a 20. ábra mutatja.

A 20. ábrán bemutatott eljárás kivitelezésére PCR-módszert alkalmazunk. Közelebbről, hat szintetikus oligonukleotidot adunk egyetlen PCR-reakcióedénybe az első PCR-reakció kivitelezésére, ezáltal két oligonukleotidot illesztünk össze és hosszabbítunk meg, és további négy oligonukleotidot vagy egy teljes oligonukleotidot kapunk.

Ezután hozzáadjuk az A (92. számú szekvencia) és B (93. számú szekvencia) terminális primert és lejátszatjuk a második PCR-reakciót, amelyben csak a teljes hosszúságú, helyes oligonukleotid tud sokszorozódni. A kapott terméket BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és pUC19 vektorba szubklónozzuk, majd szekvenáljuk.

Közelebbről, 98 µl reakcióelegyet – amely 100 mmol/l Tris–HCl-t (pH 8,5), 50 mmol/l KCl-t, 0,1 mmol/l dATP-t, 0,1 mmol/l dGTP-t, 0,1 mmol/l dCTP-t, 0,1 mmol/l dTTP-t, 1,5 mmol/l MgCl₂-ot és 2,5 egység AmpliTaq DNS-polimerázt (Perkin Elmer Cetus), továbbá az egyes oligonukleotidokból 5 pmol-t tartalmaz – 94 °C-on 1,5 percen keresztül denaturálunk, majd 30 reakcióciklusnak vetünk alá – egy ciklus 92 °C-on 3 percen, 50 °C-on 2 percen és 72 °C-on

5 percen keresztüli inkubálásból áll –, ezután 72 °C-on 10 percen keresztül inkubálunk. A reakcióelegyhez 1–1 µl 50 mmol/l koncentrációjú A és B terminális primert adunk, majd 80 µl ásványolajjal felülrétegezzük, és 94 °C-on 1,5 percen keresztül denaturáljuk, majd ciklusonként 94 °C-on 1 percen, 50 °C-on 1 percen és 72 °C-on 1 percen keresztüli inkubálásból álló 30 reakcióciklusnak vetjük alá, végül 72 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk. A 439 bp PCR-terméket 1,5%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, BamHI és HindIII restrikciós enzimmal emésztjük, pUC19 vektorba szubklónozzuk, majd szekvenáljuk. Egy így kapott klónt pUC–RV_H–sle–1220Ha-nak jelölünk. Az átfarmált humán sle1220H antitest H lánc V szakasz (a) változatának aminosavszekvenciája és a pUC–RV_H–sle–1220Ha plazmidban ezt kódoló nukleotidszekvenciát a 94. számú szekvencia mutatja.

Ezután az átfarmált humán 12–20 (sl 1220H) antitest H lánc V szakaszt kódoló gént tartalmazó DNS-fragmentet kivágjuk a pUC–RV_H–sle–1220Ha plazmidból, és a HindIII–BamHI helyeken egy HEF–12h–gt1 H lánc expressziós vektorba inszertáljuk, így kapjuk az RV_H–sle–1220Ha-t.

Az átfarmált humán sle1220H antitest H lánc V szakasz (b) – (d) változatainak szerkesztésére két mutagén primert szintetizáltunk, az egyik az sle1220Hm1 (95. számú szekvencia), a másik az sle1220Hm2 (96. számú szekvencia). Az egyes PCR-reakciókban Vent DNS-polimerázt és a 13. példában ismertetett összetételű reakcióelegyet alkalmazunk. Az egyes PCR-reakciókban a templátként pUC–RV_H–sle–1220Ha plazmidot és 50 pmol sle1220Hm1 vagy sle1220Hm2 mutagén primert és 50 pmol B terminális primert tartalmazó reakcióelegyet 94 °C-on 1,5 percen keresztül denaturáljuk, majd 30, egyenként 94 °C-on 1 percen, 50 °C-on 1 percen és 72 °C-on 1 percen keresztüli inkubálásból álló reakcióciklusnak vetjük alá, végül 72 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk. A 235 vagy 178 bp terméket 1,5%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, majd primerként alkalmazzuk a második PCR-reakcióban. Közelebbről, a második PCR-reakciót 50 pmol A terminális primer, 0,2 µg PCR-termék és templátként pUC–RV_H–sle–1220Ha alkalmazásával hajtjuk végre, és a kapott 439 bp terméket 1,5%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és pUC19 vektorba szubklónozzuk. Így kapjuk az átfarmált humán sle1220 antitest H lánc V szakasz (b), illetve (c) változatát kódoló pUC–RV_H–sle–1220, illetve pUC–RV_H–sle–1220Hc plazmidot.

Előállítjuk az átfarmált humán sle1220 H antitest H lánc V szakasz (d) változatát kódoló DNS-t is az alábbiak szerint. Templátként pUC–RV_H–sle–1220 plazmidot alkalmazunk. Az első PCR-reakció 30 ciklusát 50 pmol sle1220Hm2 mutagén primer és 50 pmol B terminális primer alkalmazásával játszátjuk le. A kapott 176 bp PCR-terméket 1,6%-os alacsony olvadáspontú agarózgélben tisztítjuk, és primerként alkalmazzuk a második PCR-reakcióban. A második PCR-reakcióban a fenti primer és 50 pmol A terminális primer alkalmazá-

sával egy 439 bp DNS-fragmentst kapunk. A kapott PCR-terméket tisztítjuk, BamHI-gyel és HindIII-mal emésztjük, és pUC19 vektorba szubklónozzuk. Így kapjuk a pUC-RV_H-ELISA-vizsgá220Hd plazmidot.

Ezután az átformált humán sle1220H antitest H lánc V szakasz különböző változatait expresszáló expressziós vektorok szerkesztésére a pUC-RV_H-sle-1220, pUC-RV_H-sle-1220Hc, illetve pUC-RV_H-sle-1220Hd plazmidból kivágjuk az átformált humán sle1220 antitest H lánc V szakaszt kódoló DNS-t tartalmazó BamHI-HindIII fragmentseket, és HEF-12h-gr1 H lánc expressziós vektorba illesztjük a HindIII-BamHI helyeken. Így kapjuk az RV_H-sle-1220b, RV_H-sle-1220c, illetve RV_H-sle-1220d expressziós vektort.

Az átformált humán sle1220H antitest H láncot expresszáló négy vektor (RV_H-sle-1220a, RV_H-sle-1220b, RV_H-sle-1220c, illetve RV_H-sle-1220d) mindegyikével és az átformált humán AUK12-20 antitest L láncot expresszáló RV_L-1220a vektorral COS-sejteket kotranszfectálunk az átformált humán sle1220H antitest H láncot expresszáló négy vektor IL-6 IL-6R-hoz való kötődését gátló képességének vizsgálatára. Az eredményeket a 21-24. ábra mutatja. Megjegyezzük, hogy ezeket az eredményeket a termelt antitestek A proteinnel való tisztítása után kaptuk.

A fentiekből látható, hogy a találmány értelmében egy kiméra L láncban vagy egy átformált humán L láncban, vagy egy kiméra H láncban vagy egy átformált humán H láncban, és különösen az FR-ben, egy vagy több aminosav egy másik aminosavval helyettesíthető a humán IL-6R-hoz való kötődés képességének megtartása mellett. Ezért a találmány tárgykörébe tartoznak mindazon kiméra antitestek és átformált humán antitestek, kiméra L láncok és átformált humán L láncok, kiméra H láncok és átformált humán H láncok, átformált L lánc V szakaszok és az átformált H lánc V szakaszok, amelyekben egy vagy több aminosav egy másik aminosavval van helyettesítve, valamint az ezeket kódoló DNS-ek, ha ezek megtartják natív tulajdonságukat.

A találmány értelmében alkalmazott kiindulási hibridómákat az alábbiak szerint szerkesztjük meg.

1. referenciapélda

MT18 hibridóma szerkesztése

A humán IL-6R elleni monoklonális antitestet termelő hibridóma szerkesztésére immunogénként a sejtfületen humán IL-6R-t expresszáló egér T-sejtvonalat konstruálunk az alábbi módon. A pBSF2R.236 plazmidot (HI-9774 számú japán szabadalmi leírás) és a pSV2neo plazmidot szokásos módon egér CTLL-2 T-sejtvonalba (ATCC TIB214) transzfectáljuk, és a kapott transzformánsokat ismert módon, G418 alkalmazásával szelektáljuk, így egy olyan sejtvonalat kapunk, amely sejtenként mintegy 30 000 IL-6R-t expresszál. Ezen sejtvonal jelölése CTBC3.

A CTBC3 sejteket ismert módon RPMI 1640 tápközegben tenyésztjük, a tenyésztett sejteket négyszer mosuk PBS-pufferrel, és immunizálás céljából $1 \cdot 10^7$ sejtet

intraperitoneálisan injektálunk C57BL/6 egerekbe. Az immunizálást hetente 1 alkalommal végezzük, 6 héten keresztül.

Az immunizált egerekből kinyerjük a lépsejteket, és ismert módon, polietilénlikol alkalmazásával P3U1 mielómasejtekkel fuzionáljuk, majd a fuzionált sejteket az alábbiak szerint szűrjük. A JURKAT (ATCC CRL 8163) IL-6R negatív humán T-sejtvonalat a pBSF2R.236 és pSV2neo plazmiddal kotranszfectáljuk, és a transzformált sejteket szűrjük, így kapunk egy olyan sejtvonalat, amely mintegy 100 000 IL-6R-t expresszál sejtenként. A sejtvonal jelölése NJBC8. Egy olyan antitestet termelő hibridómasejtklont, amely felismeri az NP40-lizált NJBC8-at, de nem ismeri fel az NP40-lizált JURKAT-ot, klónozzuk, és MT18-nak nevezzük. Az MT18 hibridómát a Fermentation Institute Agency of Industrial Science and Technologyban (FRI) helyeztük letétbe a Budapesti Egyezmény szerint 1990. július 10-én, letéti száma FED BP2999.

2. referenciapélda

PM1 hibridóma szerkesztése

A humán IL-6R elleni monoklonális antitestet termelő hibridóma szerkesztésére a humán IL-6R-t mint antigént az alábbiak szerint extraháljuk. $3 \cdot 10^9$ U266 humán mielóma- (IL-6R termelő) sejtet 1 ml 1% digitonint, 10 mmol/l trietanol-amin puffert (pH 7,4), 0,15 mol/l NaCl-ot és 1 mmol/l PMSF-et (fenil-metilszulfonil-fluorid; Wako Pure Chemicals) tartalmazó elegyben szuszpendálunk. Másrésről, az 1. referenciapélda szerint előállított MT18 hibridóma által termelt MT18 antitestet ismert módon bróm-ciánnal aktivált Sepharose 4B-hez (Pharmacia) kötjük. Ezt az MT18-cal kapcsolt Sepharose 4B-t a fenti sejtlizátummal elegyítve a szolubilizált IL-6R-t a Sepharose 4B-n lévő MT18 antitesthez kötjük. A Sepharose 4B-hez nem specifikusan kötődött anyagokat lemoszuk, és a Sepharose 4B-hez az MT18-on keresztül kötődött IL-6R-t immunogénként alkalmazzuk.

A fenti módon előállított immunogénnel intraperitoneálisan immunizálunk BALB/c egereket, hetente 1 alkalommal, 4 héten keresztül. Ezután az immunizált egerekből kinyerjük a lépsejteket, és ismert módon, polietilénlikol alkalmazásával P3U1 mielómasejtekkel fuzionáljuk, majd a fuzionált sejteket az alábbiak szerint szűrjük. Először a sejtenyészet felülúszóját 0,01 ml Protein G Sepharose-zal elegyítjük, ezáltal a felülúszóban lévő immunglobulint a Protein G Sepharose-hoz kötjük. Másrésről, belsőleg ^{35}S -metioninnal jelzett 10^7 U266 sejtet lizálunk, és az IL-6R-t MT18-cal konjugált Sepharose 4B alkalmazásával affinitási kromatográfián tisztítjuk. Ezután az ^{35}S -metioninnal jelzett IL-6R-t a fenti módon előállított, kötött immunglobulint tartalmazó Protein G Sepharose-zal immunprecipitáljuk, és a csapadékot SDS/PAGE eljárással analizáljuk. Ennek eredményeként egy hibridómaklont izolálunk, amely az IL-6R-hoz specifikusan kötődő antitestet termel. A klont PM1-nek nevezzük. A PM1 hibridómát az FRI-ben helyeztük letétbe a Budapesti Szerződés szerint 1990. július 10-én, letéti száma FED BP-2998.

3. referenciapélda

AUK12–20, AUK64–7 és AUK146–15 hibridóma szerkesztése

Immunogénként egy oldható IL–6R-t (SR344) pre-
parálunk Yasukawa K. és munkatársai [J. Biochem.
108, 673–676 (1990)] módszere szerint. Közelebbről,
a pECEdhfr 344 plazmida – amely IL–6R-t kódoló
cDNS-t tartalmaz, amelyben az N-terminálistól számí-
tott 345. kodon egy stopkodonnal van helyettesítve –
CHO (5E2T) sejteket transzfektálunk, a transzfektált
sejteket szérummentes közegben (SF–0 tápközeget,
Sanko Junyaku) tenyésztjük, és Blue–5PW oszlopon
és Phenyl–5PW oszlopon tisztítjuk. A tisztított, oldha-
tó IL–6R SDS/PAGE analízissel egyetlen sávot ad.

Nőstény BALB/cAnNCrj (Nippon CREA) egerekbe
szubkután módon 10 µg/egér dózisban injektáljuk az
immunogént Freund-féle komplett adjuvánsban (Bacto
Adjuvant Complete H 37 Ra, Difco), majd egy második
és egy harmadik injekcióban azonos mennyiségű immu-
nogént adunk Freund-féle nem komplett adjuvánsban
(Bacto Adjuvant Incomplete Freund, Difco) az első in-
jektálás után két, illetve három héttel. Az utolsó immuni-
zálást (negyedik injekció) adjuváns nélkül végezzük a
farokvénaiba adott injekcióval a harmadik injekció után
egy héttel. Az immunizált egerekből szérummintát pre-
parálunk, hígítópufferrel sorozathígítjuk, és ELISA-val
vizsgáljuk Goldsmith P. K. [Analytical Biochemistry
117, 53–60 (1981)] módszere szerint. Közelebbről, egy
SR344-gyel (0,1 µg/ml) bevont lemezt 1% BSA-val
blokkolunk, majd hozzáadjuk a hígított mintát. Az
SR344-hez kötött egér IgG-t kecske anti-egér IgG/alkali-
kus foszfatáz (A/P) (ZYMED) és az alkalikus foszfatáz
egy szubsztátja (Sima–104) alkalmazásával mérjük.

A szérumban az anti-SR344 antitest mennyiségi nö-
vekedésének kimutatása után 5 BALB/c egerből lépsej-
teket veszünk az utolsó immunizálás után 3 nappal.
A lépsejteket és mielómasejteket (P3U1) 25:1 arány-
ban elegyítjük, PEG1500 alkalmazásával fuzionáljuk,
és 2000 rezervoárban tenyésztjük 0,7·10⁶–1,1·10⁶
sejt/rezervoár koncentrációban. A rezervoárokból vett
felülúszókat SR344-kötő képességükre (első szűrés,
amelyet R344 felismerési vizsgálatnak nevezünk) és az
SR344 interleukin–6-hoz való kötődését gátló képessé-
gükre [második szűrés, IL–6/sIL–6R kötődés gátlásá-
nak vizsgálata (RBIA)] szűrjük. Az első szűréssel 240,
a második szűréssel 36 pozitív rezervoárt találtunk.

A fent említett B344 felismerési vizsgálatot az
alábbi módon végezzük. Kecse anti-egér Ig-vel (Cap-
pel) (1 µg/ml) bevont lemezt (MaxiSorp, Nunc) 1%
BSA-val blokkolunk, majd hozzáadjuk a hibridóma-
sejttenyésztet felülúszóját, és szobahőmérsékleten
1 órán keresztül inkubáljuk. A lemezt mossuk, majd
mindegyik rezervoárba 20 µg/ml SR344-et mérünk, és
a lemezt szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkuba-
ljuk. A felülúszóból származó immobilizált antitest által
megkötött SR344 mennyiségének meghatározására
nyúl anti-SR344 IgG-t (#2, 5 µg/ml) és kecske antinyúl
IgG-alkalikus foszfatázt (A/P) (1:3000, Tago), és
szubsztátot (1 mg/ml, Sima–104) adunk hozzá, majd
405–600 nm-en mérjük az optikai sűrűséget.

A fent említett RBIA-vizsgálatot az alábbiak szerint
végezzük. MT18 antitesttel bevont lemez rezervoárjai-
ba 100 µg/ml SR344-et mérünk (100 µl/rezervoár), és a
lemezt szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inku-
báljuk. Mosás után a lemez minden egyes rezervoárjába
egyidejűleg bemérünk rezervoáronként 50 µl hib-
ridóma felülúszót és 50 µg 20 µg/ml koncentrációjú
biotin-interleukin–6 konjugátumot, és a lemezt szoba-
hőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáljuk. A bio-
tin–IL–6R-hez kötött SR344 mennyiségének meghatá-
rozására streptoavidin–A/P-t (1:7000, PIERCE) és
egy megfelelő szubsztátot (Sigma–104) adunk hozzá,
majd 405–600 nm-en mérjük az optikai sűrűséget.

Végül a pozitív klónokat kétszer megismételt limi-
táló hígítási módszerrel tisztítjuk. Három hibridóma-
klónt kapunk, amely gátolja az SR344 IL–6-hoz való
kötődését, ezek jelölése AUK12–20, AUK145–15,
illetve AUK64–7; továbbá egy olyan hibridóma-
klónt (AUK181–6) kapunk, amely nem gátolja az
SR344 IL–6-hoz való kötődését.

Ipari alkalmazhatóság

A találmány szerinti humán IL–6R elleni átfarmált
humán antitest egy olyan humán antitestet tartalmaz,
amelyben a humán V szakaszok CDR-jei egy humán
IL–6R elleni egér-monoklonális antitest CDR-jeivel
vannak helyettesítve. Mivel az átfarmált humán antitest
legnagyobb része egy humán antitestből és a kevésbé
antigén egér CDR-ekből származik, a találmány szerin-
ti átfarmált humán antitest emberre nézve kevésbé
immunogén, azért gyógyászati célokra alkalmazható.

A Budapesti Egyezmény szerint deponált mikroor- ganizmusok jegyzéke

Letéti intézmény: National Collection of Industrial
and Marine Bacteria Limited
23 St Macher Drive, Aberdeen
AB2 1RY, United Kingdom

Mikroorganizmus	Deponálási szám	Deponálás napja
E. coli DH5α, pPM–h1	NCIMB 40362	1991. 02. 12.
E. coli DHSα, p12–h2	NCIMB 40363	1991. 02. 12.
E. coli DHSα, p64–h2	NCIMB 40364	1991. 02. 12.
E. coli DH5α, p146–h1	NCIMB 40365	1991. 02. 12.
E. coli DH5α, pPM–k3	NCIMB 40366	1991. 02. 12.
E. coli DH5α, p12–k2	NCIMB 40367	1991. 02. 12.
E. coli DH5α, p64–k4	NCIMB 40368	1991. 02. 12.
E. coli DH5α, p146–k3	NCIMB 40369	1991. 02. 12.

Letéti intézmény: Fermentation Research Institute,
Agency of Industrial Science and
Technology

Címe: 103, Higashi 1-chome Tsukuba-shi
Ibaraki Japan

Mikroorganizmus	Deponálási szám	Deponálás napja
MT18	FERM BP-2999	1990. 07. 10.
PM1	FERM BP-2998	1990. 07. 10.

Szekvenciajegyzék

1. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 40

Szekvencia típusa: nukleinsav

5 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG 40

2. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 39

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

15

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT 39

3. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 40

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

20 Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGS GTTG 40

4. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 43

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTCGMWTC TTG 43

5. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 40

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

35 Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGATTTCW AGGTGCAGAT TWTGAGCTTC 40

6. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 37

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

40 Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG 37

7. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 41

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

50

ACTAGTCGAC ATGGGCWTC AGATGGAGTC ACAKWYYCWG G 41

8. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 41

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

55 Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G 41

9. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 35

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG 35

10. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 37

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

10 Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGTC TATTTCT 37

11. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 38

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

15 Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC 38

12. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 27

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

25

CGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG 27

13. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 37

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

30 Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC 37

14. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 36

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT 36

15. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 37

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

45 Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTTTTT 37

16. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 35

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

50 Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGRACCTTG GGYTCAGCTT GRITT 35

17. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 40

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

60 Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCTT 40

18. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 37

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

5 Topológia: lineáris
Molekula típusa: szintetikus DNS
Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRCSGCTRCT CTTCTGC 37

19. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 36

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
Molekula típusa: szintetikus DNS
Szekvencia leírása:

15

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT 36

20. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 33

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
20 Molekula típusa: szintetikus DNS
Szekvencia leírása:

ACTAGTCCAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG 33

21. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 40

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
Molekula típusa: szintetikus DNS
Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG 40

22. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 37

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
Molekula típusa: szintetikus DNS
35 Szekvencia leírása:

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG 37

23. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 28

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

40 Topológia: lineáris
Molekula típusa: szintetikus DNS
Szekvencia leírása:

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG 28

24. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 393

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér
Közvetlen forrás:
Klón: p12-k2
50 Jellemző: 1...60 szignálpeptid
61...393 érett peptid
Szekvencia leírása:

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA 48

Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

-20

-15

-10

-5

GGT TCC ACT GGT GAC ATT CTG CTG ACA CAG TCT CCT GCT TCC TTA GGT	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Gly	
1 5 10	
GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT	144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser	
15 20 25	
GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA	192
Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
30 35 40	
GGA CAG ACA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC AAC CTA GAA TCT	240
Gly Gln Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
45 50 55 60	
GGG GTC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC	288
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT	336
Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	
80 85 90	
CAG CAC AGT AGG CAG AAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG	384
Gln His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu	
95 100 105	
GAA ATA AAA	393
Glu Ile Lys	
110	

25. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 405

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás:

Klón: p12-h2

55 Jellemző: 1...57 szignálpeptid

58...405 érett peptid

Szekvencia leírása:

ATG GGA TGG AGC GGG ATC TTT CTC TTC CTT CTG TCA GGA ACT GCA GGT	48
Met Gly Trp Ser Gly Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly	
-15 -10 -5	
GTC CAC TCT GAG ATC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG ATG AAG	96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Met Lys	
-1 5 10	
CCT GGG GCT TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
ACT AGC TAT TAC ATA CAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GCA AAG AGC CTT	192
Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG ATT GGA TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT ACT AGC TAC AAC	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn	
50 55 60	
CAG AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTT GAC AAA TCT TCC AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG CAT CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC	336
Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCA AGG GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	
95 100 105	
ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	405
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
110 115	

26. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 381

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás:

Klón: pPM-k3

Jellemző: 1...60 szignálpeptid

5 61...381 érett peptid

Szekvencia leírása:

```

ATG GTG TCC TCA GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA      48
Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
-20                -15                -10                -5

GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT      96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
               1                5                10

GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC      144
Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
           15                20                25

ATT AGC AGT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT ATT      192
Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile
           30                35                40

AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
           45                50                55                60

AGG TTC AGT GGC ACT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AAC      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn
           65                70                75

AAC CTG GAG CAA GAA GAC ATT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AAC      336
Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn
           80                85                90

ACG CTT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAT      381
Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
           95                100                105

```

27. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 411

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás:

Klón: pPM-hl

Jellemző: 1...54 szignálpeptid

5 55...411 érett peptid

Szekvencia leírása:

```

ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TGG CTG TTC ACA GCC TTT CCT GGT ATC      48
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

          -15          -10          -5

CTG TCT GAT GTG CAG CTT CAG GAG TCG GGA CCT GTC CTG GTG AAG CCT      96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro

          -1          5          10

TCT CAG TCT CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC ACT GGC TAC TCA ATC ACC      144
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

          15          20          25          30

AGT GAT CAT GCC TGG AGC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG      192
Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

          35          40          45

GAG TGG ATG GGC TAC ATA AGT TAC AGT GGT ATC ACT ACC TAC AAC CCA      240
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro

          50          55          60

TCT CTC AAA AGT CGA ATC TCT ATC ACT CGA GAC ACA TCC AAG AAC CAG      288
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

          65          70          75

TTC TTC CTA CAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GGG GAC ACG TCC ACA TAT      336
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ser Thr Tyr

          80          85          90

TAC TGT GCA AGA TCC CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG GAC TAC TGG GGT      384
Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

          95          100          105          110

CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA      411
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

```

28. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 393

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás:

Klón: p64-k4

Jellemző: 1...60 szignálpeptid

5 61...393 érett peptid

Szekvencia leírása:

ATG GAG TCA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA 48
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 -20 -15 -10 -5
 GGT TCC ACA GGT GAC ATT GTG TTG ATC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 -1 5 10
 GTG TCT CTA 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
 15 20 25
 GTT GAT AGT TAT GGC AAT AGT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA CCA 192
 Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 30 35 40
 GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC 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
 45 50 55 60
 GGG ATC CCT GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC 288
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT TAC TGT 336
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 80 85 90
 CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG 384
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 95 100 105
 CAG CTG AAA 393
 Glu Leu Lys
 110

29. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 417

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás:

Klón: p64-h2

Jellemző: 1...57 szignálpeptid

5 58...417 érett peptid

Szekvencia leírása:

ATG GGA TGG AGC GGG GTC TTT ATC TTC CTC CTC TCA GTA ACT GCA GGT 48
 Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Ile Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 -15 -10 -5
 GTC CAC TCC CAG GTT CAA TTG CAG CAG TCT GCA GCT GAG TTG ATG AAG 96
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
 -1 5 10
 CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATC TCC TGC AAG GCT ACT GGC TAC ACA TTC 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
 AGT AGT TAT TGG ATA GTG TGG ATA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT 192
 Ser Ser Tyr Trp Ile Val Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 30 35 40 45
 GAG TGG ATT GCA GAG ATT TTA CCT GGA ACC GGT AGT ACT AAC TAC AAT 240
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
 50 55 60
 GAG AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTC ACT GCA GAT ACA TCT TCC AAC 288
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75
 ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTC ACA TCT GAG GAC TCT GCC GTC 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90
 TAT TAC TGT GCA AGT CTA GAC AGC TCG GGC TAC TAT GCT ATG GAC TAT 384
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 95 100 105
 TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 417
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

30. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 381

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típica: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás

Klón: p146-k3

Jellemző: 1...60 szignálpeptid

5 61...381 érett peptid

Szekvencia leírása:

ATG GTG TCC ACA CCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG ATC TGT TTT CAA	48
Met Val Ser Thr Pro Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Ile Cys Phe Gln	
-20 -15 -10 -5	
GGT ACC AGA TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT	96
Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser	
-1 5 10	
GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC	144
Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp	
15 20 25	
ATT AGT AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT	192
Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val	
30 35 40	
AAA CTC CTG ATC TAC TAT ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser	
45 50 55 60	
AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser	
65 70 75	
AAC CTG GAG CAA GAA GAT ATT GCC AGT TAC TTT TGC CAA CAG GGT TAT	336
Asn Leu Glu Gln Gln Asp Ile Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr	
80 85 90	
ACG CCT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG TTG GAA ATC AAA	384
Thr Pro Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
95 100 105	

31. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 402

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: cDNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér

Közvetlen forrás:

Klón: p146-h1

Jellemző: 1...51 szignálpeptid

5 52...402 érett peptid

Szekvencia leírása:

ATG CAG CTC GAT CTT TAT CTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT GTC TAC 48
 Met Glu Leu Asp Leu Tyr Leu Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val Tyr
 -15 -10 -5
 TCA CAG GTT CAG CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA CCT GGG 96
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
 -1 5 10 15
 GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AAC 144
 Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
 20 25 30
 TAC TGG GTG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG 192
 Tyr Trp Val Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 ATT GGG TCT ATT TAT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG AAC ACT CAG AAG 240
 Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Asn Thr Gln Lys
 50 55 60
 TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC ATC ACA GCC 288
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala
 65 70 75
 TAC ATG CAA CTC ACC AGC TTG GCA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC 336
 Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 80 85 90 95
 TGT GCA AGA TCG ACT GGT AAC CAC TTT GAC TAC TCG GGC CAA GGC ACC 384
 Cys Ala Arg Ser Thr Gly Asn His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 ACT CTC ACA GTC TCC TCA 402
 Thr Leu Thr Val Ser Ser

32. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 35

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACAAAGCTTC CACCATGGAG TCAGACACAC TCCTG 3 5

33. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 36

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

10 Szekvencia leírása:

GGCTAAGCTT CCACCATGGG ATGGAGCGGG ATCTTT 3 6

34. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 35

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

15 Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

CTTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAGCT TGGTC 3 5

35. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 36

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

25

GTTGGATCCA CTCACCTGCA GAGACAGTTA CCAGAG 3 6

36. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 35

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

30 Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

CTTGGATCCA CTCACGATTT ATTTCCAGCT TGGTC 3 5

37. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 35

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

CTTGGATCCA CTCACGTTTT ATTTCCAGCT TGGTC 3 5

38. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 36

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

45 Szekvencia leírása:

ACAAAGCTTC CACCATGGTG TCCTCAGCTC AGTTCC 3 6

39. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 39

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

50 Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

TGTTAGATCT ACTCACCTGA GGACACAGTG ACTGAGGTT 3 9

40. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 36

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris.

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

GTCTAAGCTT CCACCATGAG AGTGCTGATT CTTTTG 3 6

41. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 17
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 TACGCAAACC GCCTCTC 17

42. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 18
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

ACCGTGTCTG GCTACACCTT CACCAGCGAT CATGCCTGGA GCTGGGTGAG ACAGC 55

44. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 63
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

TGAGTGGATT GGATACATTA GTTATAGTGG AATCACAACC TATAATCCAT 50
 CTCTCAAATC CAG 63

45. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 54
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

TATTATTGTG CAAGATCCCT AGCTCGGACT ACGGCTATGG ACTACTGGGG TCAA 54

46. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 27
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GTGACAATGC TGAGAGACAC CAGCAAG 27

47. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 24
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GGTGTCCACT CCGATGTCCA ACTG 24

48. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 27
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

TGTAGAGCCA GCCAGGACAT CAGCAGTTAC CTGAACTGGT ACCACCAG 48

51. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 42
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

ATCTACTACA CCTCCAGACT GCACTCTGGT GTGCCAAGCA GA 42

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GAGTGCACCA TATGCGGT 18

5 43. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 55
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 10 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

Topológia: lineáris
 25 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GGTCTTGAGT GGATGGGATA CATTAGT 27

35 49. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 29
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 40 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GTGTCTGGCT ACTCAATTAC CAGCATCAT 29

50. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 48
 45 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

50

Topológia: lineáris
 55 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

52. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 50

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACCTACTACT GCCAACAGGG TAACACGCTT CCATACACGT TCGGCCAAGG 50

53. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 27

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

AGCGGTACCG ACTACACCTT CACCATC 27

54. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 706

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér és humán

Közvetlen forrás:

Klón: pUC-RVh-PM1f

Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán
PM1 antitest H lánc V szakasz (f) változatát
kódoló gén

-20—1. aminosav: szignálszekvencia

1-30. aminosav: FR1

31-36. aminosav: CDR1

37-50. aminosav: FR2

51-66. aminosav: CDR2

67-98. aminosav: FR3

99-108. aminosav: CDR3

109-119. aminosav: FR4

1-6. nukleotid: HindIII hely

54-135. nukleotid: intron

258-348. nukleotid: intron/hibás illesztés

505-706. nukleotid: intron

701-706. nukleotid: BamHI hely

Szekvencia leírása:

AAGCTTC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT 49

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala

-15

-10

ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA 103

Thr

-5

CAATGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC CAG GTC CAA 155

Gly Val His Ser Gln Val Gln

1

CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC 203

Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser

5

10

15

CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC TAC TCA ATT ACC AGC GAT CAT GCC TGG 251

Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp His Ala Trp

20

25

30

35

AGC TGG GTG AGA CAG CCA CCT GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC 299

Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr

40

45

50

ATT AGT TAT AGT GGA ATC ACA ACC TAT AAT CCA TCT CTC AAA TCC AGA 347
 Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg
 55 60 65
 GTG ACA ATG CTG AGA GAC ACC AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC 395
 Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu
 70 75 80
 AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC ACC GCG GTT TAT TAT TGT GCA AGA TCC 443
 Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
 85 90 95
 CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC 491
 Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
 100 105 110 115
 ACA GTC TCC TCA G GTGAGTCCTT ACAACCTCTC TCTTCTATTC AGCTTAAATA 544
 Thr Val Ser Ser
 GATTTTACTG CATTGTGTGG GGGGGAAATG TGTGTATCTG AATTTACGGT CATGAAGGAC 604
 TAGGGACACC TTGGGAGTCA GAAAGGGTCA TTGGGAGCCC GGGCTGATCC AGACAGACAT 664
 CCTCAGCTCC CAGACTTCAT GGCCAGAGAT TTATAGGGAT CC 706

55. számú szekvencia	35	1–23. aminosav: FR1
Szekvencia hossza: 506		24–34. aminosav: CDR1
Szekvencia típusa: nukleinsav		35–49. aminosav: FR2
Szál típusa: kettős		50–56. aminosav: CDR2
Topológia: lineáris		57–88. aminosav: FR3
Molekula típusa: szintetikus DNS	40	89–97. aminosav: CDR3
Eredeti forrás:		98–117. aminosav: FR4
Organizmus: egér és humán		1–6. nukleotid: HindIII hely
Közvetlen forrás:		54–135. nukleotid: intron
Klón: pUC–RV1–PM1a		258–376. nukleotid: intron/hibás illesztés
Jellemző: humán IL–6R elleni, átformált humán	45	469–506. nukleotid: intron
PM1 antitest L lánc V szakasz (a) változatát		501–506. nukleotid: BamHI hely
kódoló gén		Szekvencia leírása:
–20—1. aminosav: szignálszekvencia		

AAGCTTC ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT 49
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala
 -15 -10
 ACA G GTAAGGGGCT CACAGTAGCA GGCTTGAGGT CTGGACATAT ATATGGGTGA 103
 Thr

–5

CAATGACATC CACTTTGCCT TTCTCTCCAC AG GT GTC CAC TCC GAC ATC CAG	155
Gly Val His Ser Asp Ile Gln	
1	
ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTC	203
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val	
5 10 15	
ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC CAG GAC ATC AGC AGT TAC CTG AAT TGG	251
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp	
20 25 30 35	
TAC CAG CAG AAG CCA GGT AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACC	299
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr	
40 45 50	
TCC AGA CTG CAC TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC	347
Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	
55 60 65	
GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC	395
Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile	
70 75 80	
GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAG GGT AAC ACG CTT CCA TAC ACG TTC GGC	443
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly	
85 90 95	
CAA GGC ACC AAG GTG GAA ATC AAA C GTGAGTAGAA TTTAACTTT	488
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	
GCTTCCTCAG TTGGATCC	506

56. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 438

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Eredeti forrás:

Organizmus: egér és humán

Közvetlen forrás:

Klón: pUC-RVh-PM1f-4

Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán

PM1 antitest H lánc V szakasz (f) változatát

kódoló gén, intronok nélkül

-20---1. aminosav: szignálszekvencia

1-30. aminosav: FR1

31-36. aminosav: CDR1

37-50. aminosav: FR2

51-66. aminosav: CDR2

67-98. aminosav: FR3

99-108. aminosav: CDR3

109-119. aminosav: FR4

1-6. nukleotid: HindIII hely

432-438. nukleotid: BamHI hely

Szekvencia leírása:

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA	50		
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr			
-15	-10		
GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG GAG AGC GGT CCA GGT	98		
Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly			
-5	1	5	10
CTT GTG AGA CCT AGC CAG ACC CTG AGC CTG ACC TGC ACC GTG TCT GGC	146		
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly			
15	20	25	
TAC TCA ATT ACC AGC GAT CAT GCC TGG AGC TGG GTT CGC CAG CCA CCT	194		
Tyr Ser Ile Thr Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro			
30	35	40	
GGA CGA GGT CTT GAG TGG ATT GGA TAC ATT AGT TAT AGT GGA ATC ACA	242		
Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr			
45	50	55	
ACC TAT AAT CCA TCT CTC AAA TCC AGA GTG ACA ATG CTG AGA GAC ACC	290		
Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr			
60	65	70	
AGC AAG AAC CAG TTC AGC CTG AGA CTC AGC AGC GTG ACA GCC GCC GAC	338		
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp			
75	80	85	90
ACC GCG GTT TAT TAT TGT GCA AGA TCC CTA GCT CGG ACT ACG GCT ATG	386		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met			
95	100	105	
GAC TAC TGG GGT CAA GGC AGC CTC GTC ACA GTC TCC TCA G GTGACTGGAT	436		
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser			
110	115		
CC	438		

57. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 438
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: kettős

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Eredeti forrás:
 60 Organizmus: egér és humán

Közvetlen forrás:

Klón: pUC-RV1-PM1a

Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán
PM1 antitest L lánc V szakasz (a) változatát
kódoló gén, intronok nélkül

-19---1. aminosav: szignálszekvencia

1-23. aminosav: FR1

24-34. aminosav: CDR1

35-49. aminosav: FR2

50-56. aminosav: CDR2

57-88. aminosav: FR3

89-97. aminosav: CDR3

98-107. aminosav: FR4

1-6. nukleotid: HindIII hely

397-402. nukleotid: BamHI hely

Szekvencia leírása:

```

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA    50
      Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr
                        -15                        -10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC    98
Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      -5                        1                        5                        10

CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC    146
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
                        15                        20                        25

CAG GAC ATC AGC AGT TAC CTG AAT TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG    194
Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
                        30                        35                        40

GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACC TCC AGA CTG CAC TCT GGT GTG    242
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
                        45                        50                        55

CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC    290
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
                        60                        65                        70

ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAG    338
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      75                        80                        85                        90

GGT AAC ACG CTT CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC    386
Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
                        95                        100                        105

AAA C GTGAGTGGAT CC    402
Lys

```

58. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 36
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

TAAGGATCCA CTCACCTGAG GAGACTCTGA CGAGGC 36

59. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 32
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 10 Szekvencia leírása:

ATCAAGCTTC CACCATGGGA TGGAGCTGTA TC 32

60. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AATGGATCCA CTCACGTTTC ATTTCCACCT 30

15 61. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 33
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 20 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

CATGCCTGGA GCTGGGTTTCG CCAGCCACCT CGA 33

62. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 33
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

TCCAGGTGGC TGGCGAACCC AGCTCCAGGC ATG 33

63. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 CAGCAGAAGC CAGGAAAGGC TCCAAACCTG 30

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 35 Szekvencia leírása:
 CAGCTTTGGA GCCTTTCCTG GCTTCTGCTG 30

64. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

65. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 66
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

ACCTGTAGAG CCAGCAAGAG TCTTAGTACA TCTGGCTATA GTTATATGCA 50
 CTGGTACCAG CACAAG 66

66. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 15
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GCTGGCTCTA CAGGT 15

67. számú szekvencia
 50 Szekvencia hossza: 48
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 55 Szekvencia leírása:

AAGCTGCTGA TCTACCTTCC ATCCACCCTG GAATCTGGTG TGCCAAGC 48

68. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 15
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GTAGATCAGC AGCTT 15

69. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 48
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 5 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

GCTACCTACT ACTGCCAGCA CAGTAGGGAG ACCCCATACA CGTTCGGC 48

70. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 15
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 CTGGCAGTAG GTAGC 15

71. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 414
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: kettős
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Eredeti forrás:
 Organizmus: egér és humán

Közvetlen forrás:

Klón: pUC-RV1-1220a

Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán
 15 AUK12-20 antitest L lánc V szakasz (a) változatát kódoló gén, intronok nélkül
 -19---1. aminosav: szignálszekvencia

1-23. aminosav: FR1

24-38. aminosav: CDR1

39-53. aminosav: FR2

54-60. aminosav: CDR2

6-92. aminosav: FR3

93-101. aminosav: CDR3

102-111. aminosav: FR4

25 1-6. nukleotid: HindIII hely

408-414. nukleotid: BamHI hely

Szekvencia leírása:

AAGCTTCCAC C ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA 50

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr

-15

-10

GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC 98

Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5

-1

1

5

10

CTG AGC GCC AGC GTG GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT AGA GCC AGC 146

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

15

20

25

AAG AGT GTT AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG TAC CAG CAG 194

Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln

30

35

40

AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG CTG CTG ATC TAC CTT GCA TCC AAC CTG 242

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu

45

50

55

GAA TCT GGT GTG CCA AGC AGA TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC 290

Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

60

65

70

TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC 338
 Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
 75 80 85 90
 TAC TGC CAG CAC AGT AGG GAG AAC CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC 386
 Tyr Cys Gln His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 95 100 105
 AAG GTG GAA ATC AAA CGTCAGTCCA TCC 414
 Lys Val Glu Ile Lys
 110

72. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 45
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 20 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

GGTTATTCAT TCACTAGTTA TTACATACAC TGGGTTAGAC AGGCC 45

73. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 27
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AGTGAATGAA TAACCGCTAG CTTTACA 27

74. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 69
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 30 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

GAGTGGGTGG GCTATATTGA TCCTTTCAAT GGTGGTACTA GCTATAATCA 50
 GAAGTTCAAG GGCAGGGTT 69

75. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 15
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 ATAGCCCACC CACTC 15

76. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 36
 40 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 45

GGGGGTAACC GCTTTGCTTA CTGGGGACAG GGTACC 36

77. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 36
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 50 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

AGCAAAGCGG TTACCCCCTC TGGCGCAGTA GTAGAC 36

78. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 60 CAAGGTTACC ATGACCGTGG ACACCTCTAC 30

79. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 CACGGTCATG GTAACCTTGC CCTTGAACCT 30

80. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GGGCTCGAAT GGATTGGCTA TATTGATCCT 30

81. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AGGATCAATA TAGCCAATCC ATTCGAGCCC 30

82. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 16
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GTAAACGAG GCCAGT 16

83. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 17
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AACAGCTATG ACCATCA 17

84. számú szekvencia

10 Szekvencia hossza: 433
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: kettős
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 15 Eredeti forrás:
 Organizmus: egér és humán
 Közvetlen forrás:
 Klón: pUC-RVh-1220b
 Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán
 20 AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (b) változatát kódoló gén, intronok nélkül
 -19---1. aminosav: szignálszekvencia
 1-30. aminosav: FR1
 31-35. aminosav: CDR1
 36-49. aminosav: FR2
 50-66. aminosav: CDR2
 67-98. aminosav: FR3
 99-105. aminosav: CDR3
 106-116. aminosav: FR4
 30 1-6. nukleotid: HindIII hely
 427-433. nukleotid: BamHI hely
 Szekvencia leírása:

AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC 51

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala

-15

-10

GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC 99

Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

-5

-1 1

5

GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA GCT AGC 147

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

10

15

20

25

GGT TAT TCA TTC ACT AGT TAT TAC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCA 195

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

30

35

40

GGC CAA GGG CTC GAG TGG GTG GGC TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT 243

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly

45

50

55

ACT AGC TAT AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GTT ACC ATG ACC GTG GAC 291
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Val Asp
 60 65 70
 ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG 339
 Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 75 80 85
 GAC ACT GCA GTC TAC TAC TGC GCC AGA GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC 387
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr
 90 95 100 105
 TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA GGTGAGTGA TCC 433
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

85. számú szekvencia
 Szekvencia hossza: 433
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: kettős
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Eredeti forrás:
 Organizmus: egér és humán
 Közvetlen forrás:
 Klón: pUC-RVh-1220d
 Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán
 AUK12-20 antitest H lánc V szakasz (d) vál-
 tozatát kódoló gén, intronok nélkül

25

30

35

-19---1. aminosav: szignálszekvencia
 1-30. aminosav: FR1
 31-35. aminosav: CDR1
 36-49. aminosav: FR2
 50-66. aminosav: CDR2
 67-98. aminosav: FR3
 99-105. aminosav: CDR3
 106-116. aminosav: FR4
 1-6. nukleotid: HindIII hely
 427-433. nukleotid: BamHI hely
 Szekvencia leírása:

AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG CGC GTG TTT TGC CTG CTC GCC 51

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala

-15

-10

GTG GCT CCT GGG GCC CAC AGC CAG GTG CAA CTA GTG CAG TCC GGC GCC 99
 Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

-5

-1 1

5

GAA GTG AAG AAA CCC GGT GCT TCC GTG AAA GTC AGC TGT AAA GCT AGC 147
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

10

15

20

25

GGT TAT TCA TTC ACT AGT TAT TAC ATA CAC TGG GTT AGA CAG GCC CCA 195
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

30

35

40

GGC CAA GGG CTC GAA TGG ATT GGC TAT ATT GAT CCT TTC AAT GGT GGT 243
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly
 45 50 55
 ACT AGC TAT AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GTT ACC ATG ACC GTG GAC 291
 Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Val Thr Met Thr Val Asp
 60 65 70
 ACC TCT ACA AAC ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG 339
 Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 75 80 85
 GAC ACT GCA GTC TAC TAC TGC GCC AGA GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC 387
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr
 90 95 100 105
 TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA GGTGAGTGGG TCC 433
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

86. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 90

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

30 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

GATAAGCTTG CCGCCACCAT GGAAGTGGACC TGGAGGGTCT TCTTCTTGCT 50
 GGCTGTAGCT CCAGGTGCTC ACTCCCAGGT GCAGCTTGTG 90

87. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 90

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 40 Szekvencia leírása:

CACTCCCAGG TGCAGCTTGT GCAGTCTGGA GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG 50
 GGCCTCAGTG AAGGTTTCCT GCAAGGCTTC TGGATACTCA 90

88. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 90

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

TGCAAGGCTT CTGGATACTC ATTCAGTAGT TATTACATAC ACTGGGTGCG 50
 CCAGGCCCCC GGACAAAGGC TTGAGTGGAT GGGATATATT 90

89. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 90

Szekvencia típusa: nukleinsav

Szál típusa: egyes

Topológia: lineáris
 55 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:

CTTGAGTGGG TGGGATATAT TGACCCTTTC AATGGTGGTA CTAGCTATAA 50
 TCAGAGGTTT AAGGGCAGAG TCACCATATC CGTAGACACA 90

90. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 90

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

GTCACCATTA CCGTAGACAC ATCCGCGAGC ACAGCCTACA TGGAGCTGAG 50
 CAGCCTGAGA TCTGAAGACA CGGCTGTGTA TTACTGTGCG 90

91. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 94

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

10 Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

ACGGTGCTGT ATTACTGTGC GAGAGGGGGT AACCGCTTTG CTTACTGGGG 50
 CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCCTCAGG TGAGTGGATC CGAC 94

92. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 15

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

GATAAGCTTG CCGCC 15

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Eredeti forrás:

20 Organizmus: egér és humán

Közvetlen forrás:

Klón: pUC-RV_H-sle 1220Ha

Jellemző: humán IL-6R elleni, átformált humán sleAUK1220 antitest H lánc V szakasz (a)

25 változatát kódoló gén, intronok nélkül

-19—1. aminosav: szignálszekvencia

1-30. aminosav: FR1

31-35. aminosav: CDR1

36-49. aminosav: FR2

30 50-66. aminosav: CDR2

67-98. aminosav: FR3

99-105. aminosav: CDR3

106-116. aminosav: FR4

1-6. nukleotid: HindIII hely

35 427-433. nukleotid: BamHI hely

Szekvencia leírása:

93. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 15

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: egyes

Topológia: lineáris

Molekula típusa: szintetikus DNS

Szekvencia leírása:

GTCGGATCCA CTCAC 15

94. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 433

Szekvencia típusa: nukleinsav

Száll típusa: kettős

AAGCTGCCG CCACC ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT 51

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala

-15

-10

GTA GCT CCA GGT GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTT GTG CAG TCT GGA GCT 99

Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

-5

-1

1

5

GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT 147

Gln Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

10

15

20

25

GGA TAC TCA TTC ACT AGT TAT TAC ATA CAC TGG GTG CGC CAG GCC CCC 195

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro

30

35

40

GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG GGA TAT ATT GAC CCT TTC AAT GGT GGT 243
Gly Gln Arg Leu Gln Trp Met Gly Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly
45 50 55
ACT AGC TAT AAT CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC GTA GAC 291
Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp
60 65 70
ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGT CTG AGA TCT GAA 339
Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Gln
75 80 85
GAC ACG GCT GTC TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGT AAC CGC TTT GCT TAC 387
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr
90 95 100 105
TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGTGAGTCCA TCC 433
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

95. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 27
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AGGCTTGAGT GGATTGGATA TATTGAC 27

96. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 27
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AAGTTCAAGG GCAAGGTCAC CATTACC 27

97. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 GGTGCTTCCG TGAAAGTCAG CTGTAAAGCT 30

98. számú szekvencia

Szekvencia hossza: 30
 Szekvencia típusa: nukleinsav
 Szál típusa: egyes
 Topológia: lineáris
 Molekula típusa: szintetikus DNS
 Szekvencia leírása:
 AGCTTTACAG CTGACTTTCA CGGAAGCACC 30

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

30

1. Humán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni antitest könnyű (L) lánc variábilis (V) szakasz, amelynek szerkezete:

FR1¹-CDR1¹-FR2¹-CDR2¹-FR3¹-CDR3¹-FR4¹, ahol

35

CDR1¹, CDR2¹ és CDR3¹ három komplementaritást meghatározó szakasz (CDR) sorozatát, amelyek aminosavszekvenciája:

CDR1¹ Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

40

CDR2¹ Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

CDR3¹ Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, és

FR1¹, FR2¹, FR3¹ és FR4¹ humán I. alcsoport antitest (HSGI) L lánc V szakaszából származó négy keretrégió (FR) sorozatát vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, ahol a HSGI a REI antitest.

45

2. Az 1. igénypont szerinti L lánc V szakasz, ahol a REI antitestben az FR1¹, FR2¹, FR3¹ és FR4¹ vagy ezek funkcionális ekvivalensei aminosavszekvenciája az alábbi (i) vagy (ii):

50

(i) FR1¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

55

FR2¹ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

FR3¹ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

- FR4¹ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
(ii) FR1¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
Ile Thr Cys
FR2¹ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 5
Lys Leu Leu Ile Tyr
FR3¹ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr
Tyr Cys 10
FR4¹ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
vagy ezek funkcionális ekvivalensei.
3. Az 1. igénypont szerinti L lánc V szakasz, amely-
nek aminosavszekvenciája az 57. számú szekvencia.
4. Humán IL-6 receptor elleni antitest L lánc, 15
amely
(1) egy 1-3. igénypontok bármelyike szerinti hu-
mán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni antitest
könnyű (L) lánc variábilis (V) szakaszt és
(2) humán antitestből származó konstans C szakaszt 20
tartalmaz.
5. A 4. igénypont szerinti L lánc, amelyben a C sza-
kasz a C_κ.
6. Humán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni anti-
test nehéz (H) lánc variábilis (V) szakasza, amelynek 25
szerkezete:
FR1²-CDR1²- FR2²-CDR2²- FR3²-CDR3²- FR4²,
ahol
CDR1², CDR2² és CDR3² három komplementaritást
meghatározó szakasz (CDR) sorozatát, amelyek aminos- 30
avszekvenciája:
CDR1² Ser Asp His Ala Trp Ser
CDR2² Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn
Pro Ser Leu Lys Ser
CDR3² Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr 35
vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, és
FR1², FR2², FR3² és FR4² humán II. alcsoport antitest
(HSGII) H lánc V szakaszából származó négy keret-
régió (FR) sorozatát vagy ezek funkcionális ekvivalen-
sét jelenti, ahol a HSGII a NEW antitest. 40
7. A 6. igénypont szerinti H lánc V szakasz, ahol a
NEW antitestben az FR1¹, FR2¹, FR3¹ és FR4¹ vagy
ezek funkcionális ekvivalensei aminosavszekvenciája
az alábbi (ii)-(viii) szekvenciák egyike:
(iii) FR1² Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly 45
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
FR2² Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
Glu Trp Ile Gly
FR3² Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser 50
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg
FR4² Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser 55
Ser
(iv) FR1² Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
FR2² Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu 60
Glu Trp Ile Gly

- FR3² Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg
FR4² Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser
Ser
(v) FR1² Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
FR2² Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
Glu Trp Ile Gly
FR3² Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg
FR4² Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser
Ser
(vi) FR1² Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
FR2² Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
Glu Trp Met Gly
FR3² Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg
FR4² Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser
Ser
(vii) FR1² Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
FR2² Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
Glu Trp Met Gly
FR3² Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg
FR4² Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser
Ser
(viii) FR1² Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu
Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
FR2² Trp Val Arg Gly Pro Pro Gly Arg Gly Leu
Glu Trp Ile Gly
FR3² Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser
Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg
FR4² Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser
Ser
vagy ezek funkcionális ekvivalensei.
8. A 7. igénypont szerinti H lánc V szakasz, amely-
nek aminosavszekvenciája az 56. számú szekvencia.
9. Humán IL-6 receptor elleni antitest H lánc, amely
(1) egy 6-8. igénypontok bármelyike szerinti hu-
mán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni antitest nehéz
(H) lánc variábilis (V) szakaszt és
(2) humán antitestből származó konstans C szakaszt
tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti H lánc, amelyben a C szakasz a C γ .

11. Humán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni átfarmált humán antitest, amely

(A) a 4. vagy 5. igénypont szerinti humán IL-6 receptor elleni antitest L láncokat és

(B) a 9. vagy 10. igénypont szerinti humán IL-6 receptor elleni antitest H láncokat tartalmaz.

12. Humán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni antitest könnyű (L) lánc variábilis (V) szakasz, amelynek szerkezete:

FR1³-CDR1³-FR2³-CDR2³-FR3³-CDR3³-FR4³, ahol

CDR1³, CDR2³ és CDR3³ három komplementaritást meghatározó szakasz (CDR) sorozatát, amelyek aminosavszekvenciája:

CDR1³ Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His

CDR2³ Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

CDR3³ Gln His Ser Arg Glu Asn Pro Tyr Thr

vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, és FR1³, FR2³, FR3³ és FR4³ humán I. alcsoport antitest (HSGI) L lánc V szakaszából származó négy keretrégió (FR) sorozatát vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, ahol a HSGI a REI antitest.

13. A 12. igénypont szerinti L lánc V szakasz, ahol a REI antitestben az FR1³, FR2³, FR3³ és FR4³ vagy ezek funkcionális ekvivalensei aminosavszekvenciája az alábbi:

FR1³ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

FR2³ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

FR3³ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys

FR4³ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys, vagy ezek funkcionális ekvivalense.

14. A 12. igénypont szerinti L lánc V szakasz, amelynek aminosavszekvenciája a 71. számú szekvencia.

15. Humán IL-6 receptor elleni antitest L lánc, amely

(1) egy 12-14. igénypontok bármelyike szerinti humán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni antitest könnyű (L) lánc variábilis (V) szakaszt és

(2) humán antitestből származó konstans C szakaszt tartalmaz.

16. A 15. igénypont szerinti L lánc, amelyben a C szakasz a C κ .

17. Humán interleukin-6 (IL-6) receptor elleni antitest nehéz (H) lánc variábilis (V) szakasza, amelynek szerkezete:

FR1⁴-CDR1⁴-FR2⁴-CDR2⁴-FR3⁴-CDR3⁴-FR4⁴, ahol

CDR1⁴, CDR2⁴ és CDR3⁴ három komplementaritást meghatározó szakasz (CDR) sorozatát, amelyek aminosavszekvenciája:

CDR1⁴ Ser Tyr Tyr Ile His

CDR2⁴ Tyr Ile Asp Pro Phe Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly

CDR3⁴ Gly Gly Asn Arg Phe Ala Tyr

vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, és FR1⁴, FR2⁴, FR3⁴ és FR4⁴ humán I. alcsoport antitest (HSGI) H lánc V szakaszából származó négy keretrégió (FR) sorozatát vagy ezek funkcionális ekvivalensét jelenti, ahol a HSGI a 425 antitest, vagy a HSGI a HAX antitest.

18. A 17. igénypont szerinti H lánc V szakasz, a HSGI a 425 antitest, és a 425 antitestben az FR1⁴, FR2⁴, FR3⁴ és FR4⁴ vagy ezek funkcionális ekvivalensei aminosavszekvenciája az alábbi (ix)-(xii) aminosavszekvencia-sorozatok egyike:

(ix) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly

FR3⁴ Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

(x) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly

FR3⁴ Lys Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

(xi) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

FR3⁴ Arg Val Thr Met Thr Leu Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

(xii) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr

FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

FR3⁴ Lys Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

vagy ezek funkcionális ekvivalensei.

19. A 17. igénypont szerinti H lánc V szakasz, a HSGI a HAX antitest, és a HAX antitestben az FR1⁴, FR2⁴, FR3⁴ és FR4⁴ vagy ezek funkcionális ekvivalensei aminosavszekvenciája az alábbi (xiii) – (xiv) aminosavszekvencia-sorozatok egyike:

- (xiii) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg
Leu Glu Trp Met Gly
FR3⁴ Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg
FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Ser
- (xiv) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg
Leu Glu Trp Ile Gly
FR3⁴ Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg
FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Ser
- (xv) FR1⁴ Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg
Leu Glu Trp Met Gly
FR3⁴ Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg
FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Ser
- (xvi) FR1⁴ Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
FR2⁴ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg
Leu Glu Trp Ile Gly
FR3⁴ Lys Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg
FR4⁴ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Ser

vagy ezek funkcionális ekvivalensei.

20. A 17. igénypont szerinti H lánc V szakasz, amelynek aminosavszekvenciája a 84. számú szekvencia.

21. A 17. igénypont szerinti H lánc V szakasz, amelynek aminosavszekvenciája a 85. számú szekvencia.

22. Humán IL–6 receptor elleni antitest H lánc, amely

(1) egy 12–21. igénypontok bármelyike szerinti humán interleukin–6 (IL–6) receptor elleni antitest nehéz (H) lánc variábilis (V) szakaszt és

(2) humán antitestből származó konstans C szakaszt tartalmaz.

23. A 22. igénypont szerinti H lánc, amelyben a C szakasz a C_γ.

24. Humán interleukin–6 (IL–6) receptor elleni átfarmált humán antitest, amely

(A) a 15. vagy 16. igénypont szerinti humán IL–6 receptor elleni antitest L láncokat és

(B) a 22. vagy 23. igénypont szerinti humán IL–6 receptor elleni antitest H láncokat tartalmaz.

25. Kiméra L lánc, amely humán L lánc C szakaszt és humán IL–6R elleni egér-monoklonális antitest L lánc V szakaszt tartalmaz, amelyben az L lánc V szakasz aminosavszekvenciája a 24., 26., 28. és 30. számú szekvencia bármelyike.

26. A 25. igénypont szerinti kiméra L lánc, amelyben a humán L lánc C szakasz a humán C_κ szakasz.

27. Kiméra H lánc, amely humán H lánc C szakaszt és humán IL–6R elleni egér-monoklonális antitest H lánc V szakaszt tartalmaz, amelyben a H lánc V szakasz aminosavszekvenciája a 25., 27., 29. és 31. számú szekvencia bármelyike.

28. A 27. igénypont szerinti kiméra H lánc, amelyben a humán L lánc C szakasz a humán C_γ szakasz.

29. Humán interleukin–6 (IL–6) receptor elleni kiméra antitest, amely

(A) a 25. vagy 26. igénypont szerinti kiméra L láncokat és

(B) a 27. vagy 28. igénypont szerinti kiméra H láncokat tartalmaz.

30. DNS, amely az 1–29. igénypontok bármelyike szerinti aminosavszekvenciákat kódolja.

31. A 30. igénypont szerinti DNS, amely az 1–3. és 12–14. igénypontok bármelyike szerinti L lánc V szakaszt kódolja.

32. A 30. igénypont szerinti DNS, amely a 4., 5., 15. és 16. igénypontok bármelyike szerinti L láncot kódolja.

33. A 30. igénypont szerinti DNS, amely a 6–8. és a 17–21. igénypontok bármelyike szerinti H lánc V szakaszt kódolja.

34. A 30. igénypont szerinti DNS, amely a 9., 10., 22. és 23. igénypontok bármelyike szerinti H láncot kódolja.

35. A 30. igénypont szerinti DNS, amely a 25. vagy 26. igénypont szerinti kiméra L láncot kódolja.

36. A 30. igénypont szerinti DNS, amely vagy a 27., vagy 28. igénypont szerinti kiméra H láncot kódolja.

37. Vektor, amely egy 30. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

38. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 31. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

39. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 32. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

40. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 33. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

41. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 34. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

42. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 35. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

43. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 36. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

44. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 5 32. és egy 34. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

45. A 37. igénypont szerinti vektor, amely egy 35. és egy 36. igénypont szerinti DNS-t tartalmaz.

46. Gazdasejt, amely egy 30. igénypont szerinti vektorral van transzformálva.

47. A 46. igénypont szerinti gazdasejt, amely egy 39. és egy 41. igénypont szerinti vektorral van kotranszformálva.

48. A 46. igénypont szerinti gazdasejt, amely egy 44. Igénypont szerinti vektorral van transzformálva.

49. A 46. igénypont szerinti gazdasejt, amely egy 42. és egy 43. igénypont szerinti vektorral van kotranszformálva.

50. A 46. igénypont szerinti gazdasejt, amely egy 5 45. igénypont szerinti vektorral van transzformálva.

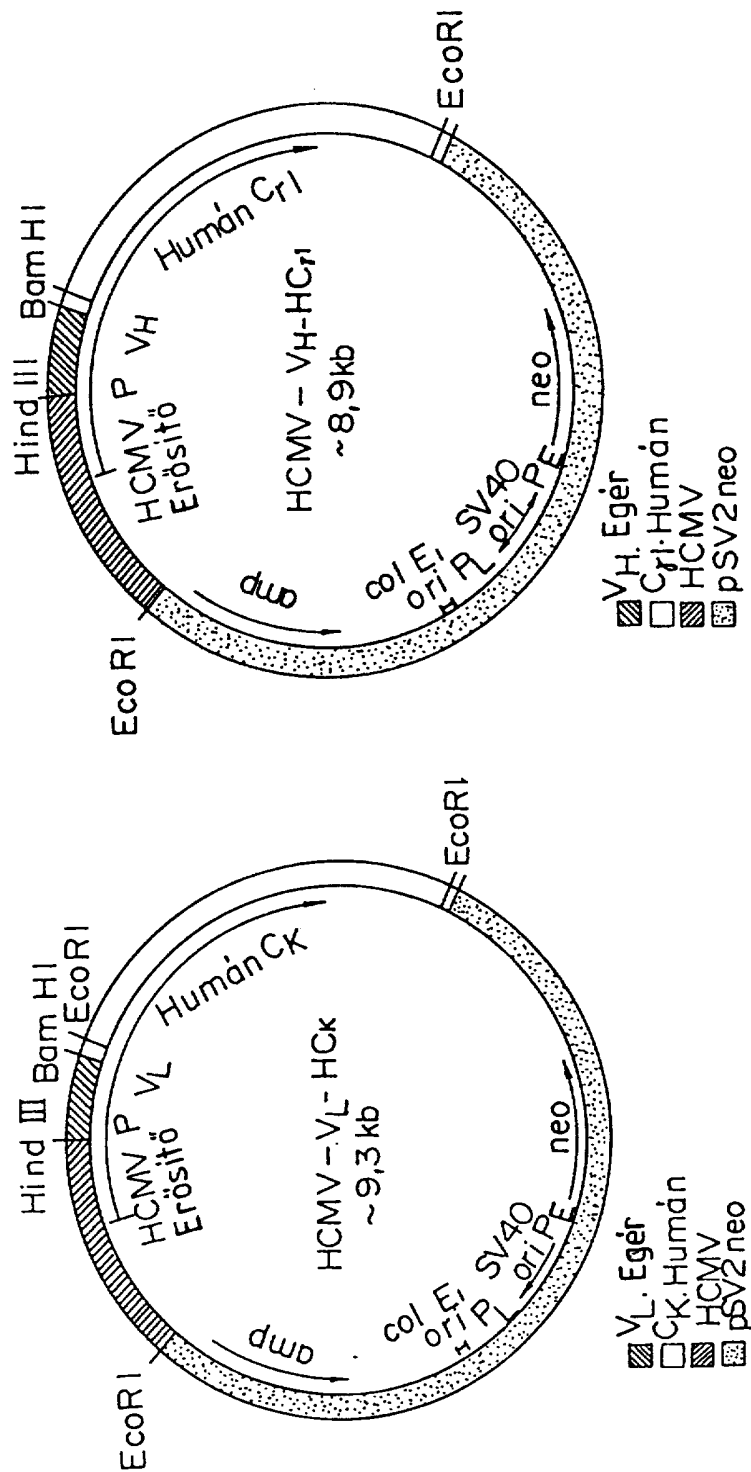
51. Eljárás humán IL-6 receptor elleni átformált humán antitest előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
– a 47. vagy 48. igénypont szerinti gazdasejtet tenyésztjük, és

10 – a tenyészetből kinyerjük az átformált humán antitestet.

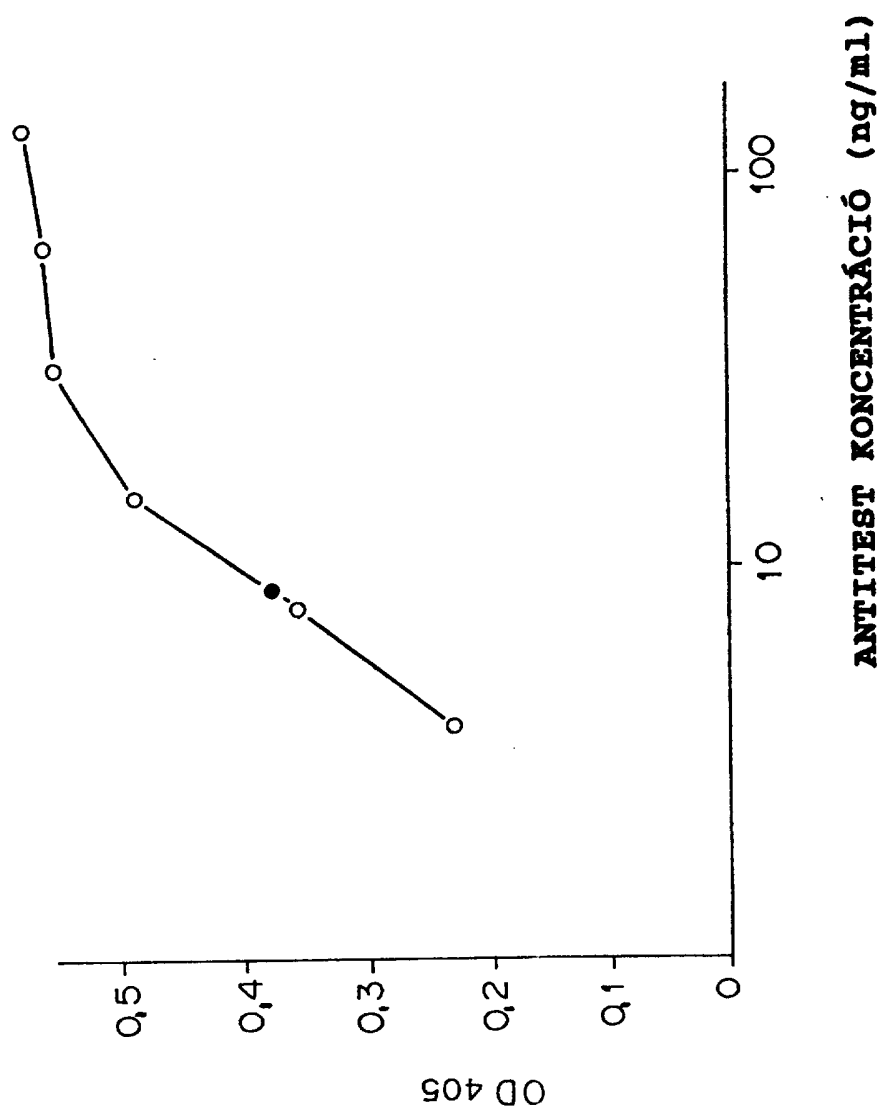
52. Eljárás humán IL-6 receptor elleni kiméra antitest előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

– a 49. vagy 50. igénypont szerinti gazdasejtet tenyésztjük, és

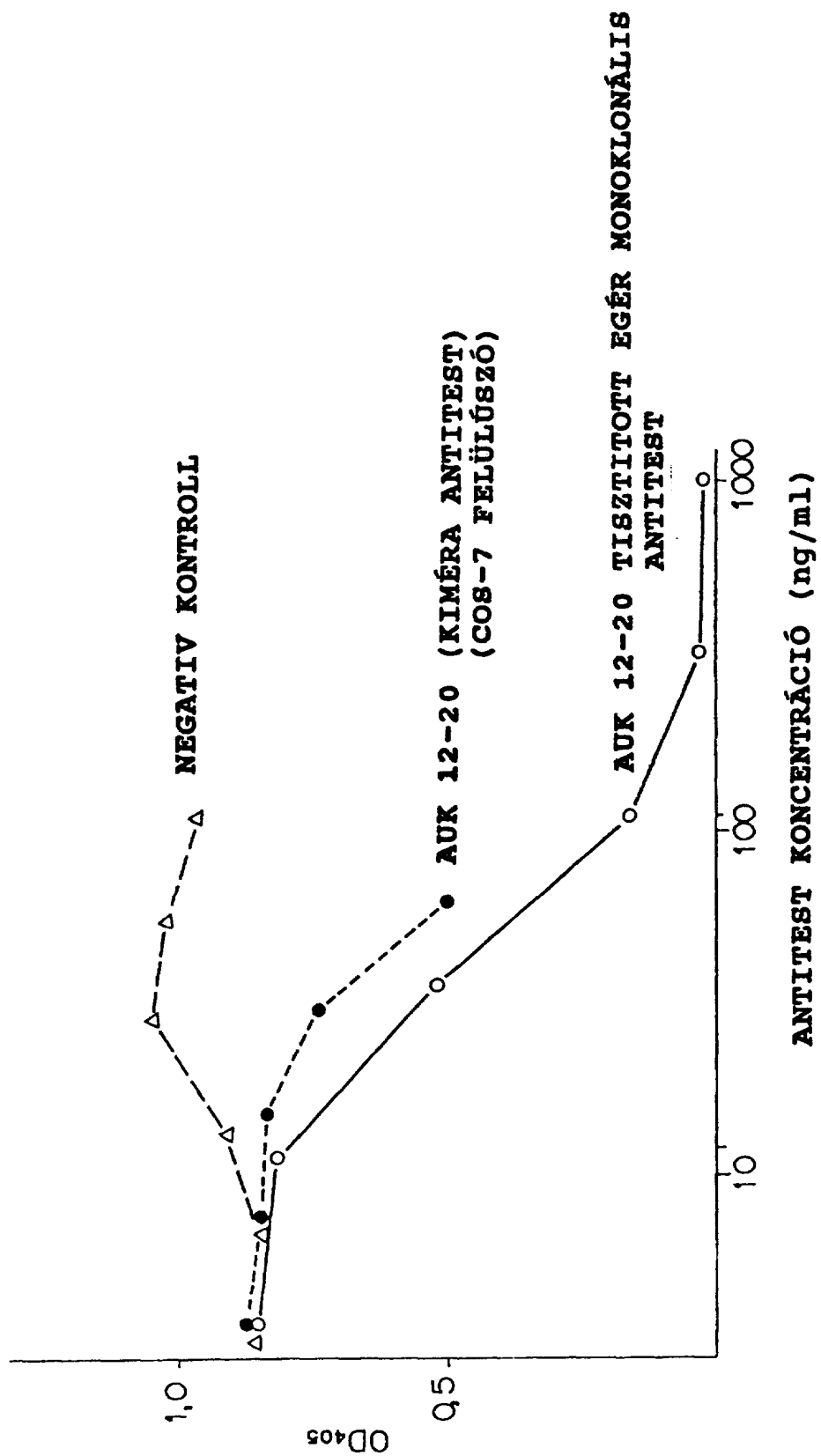
15 – a tenyészetből kinyerjük a kiméra antitestet.



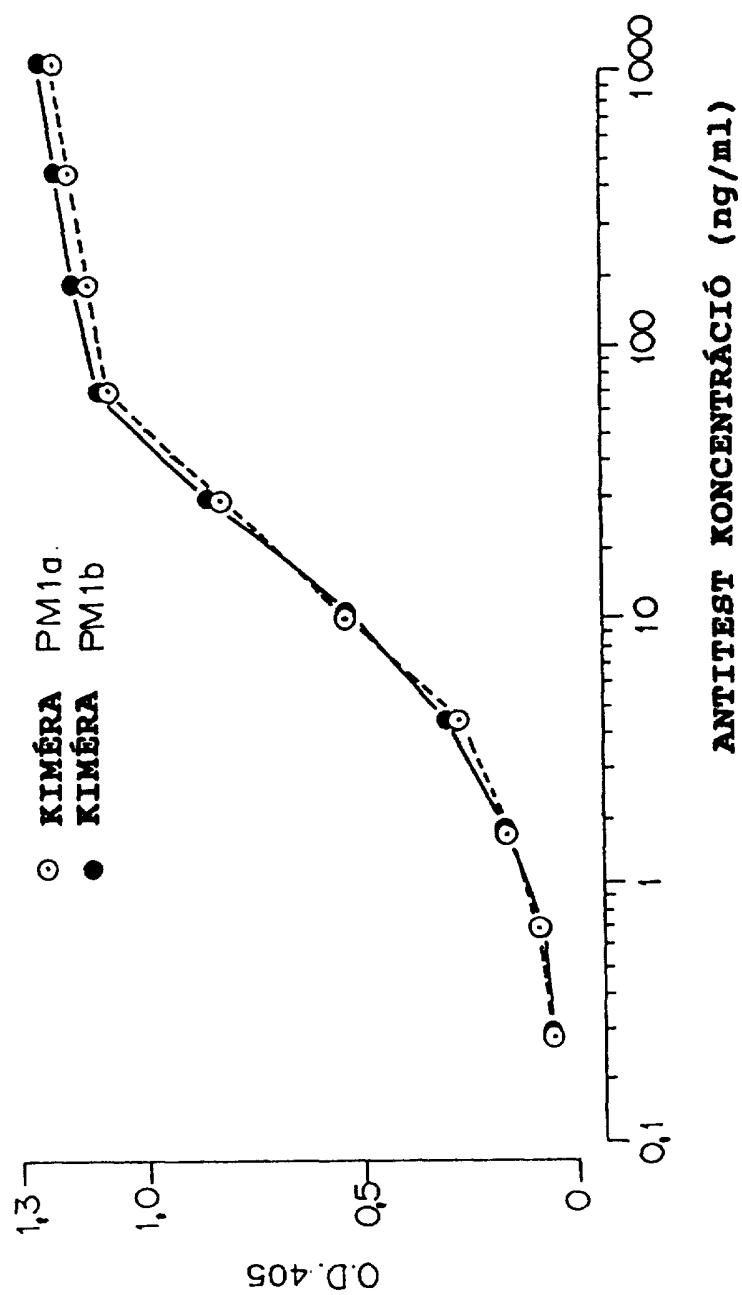
1. ábra



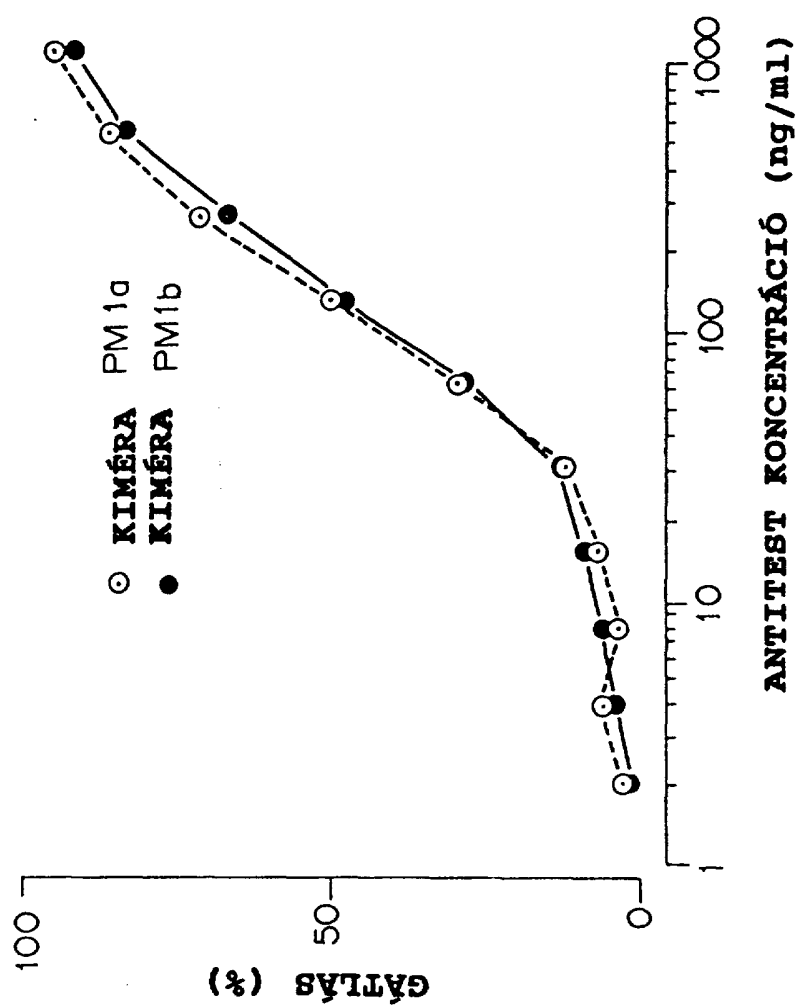
2. ábra



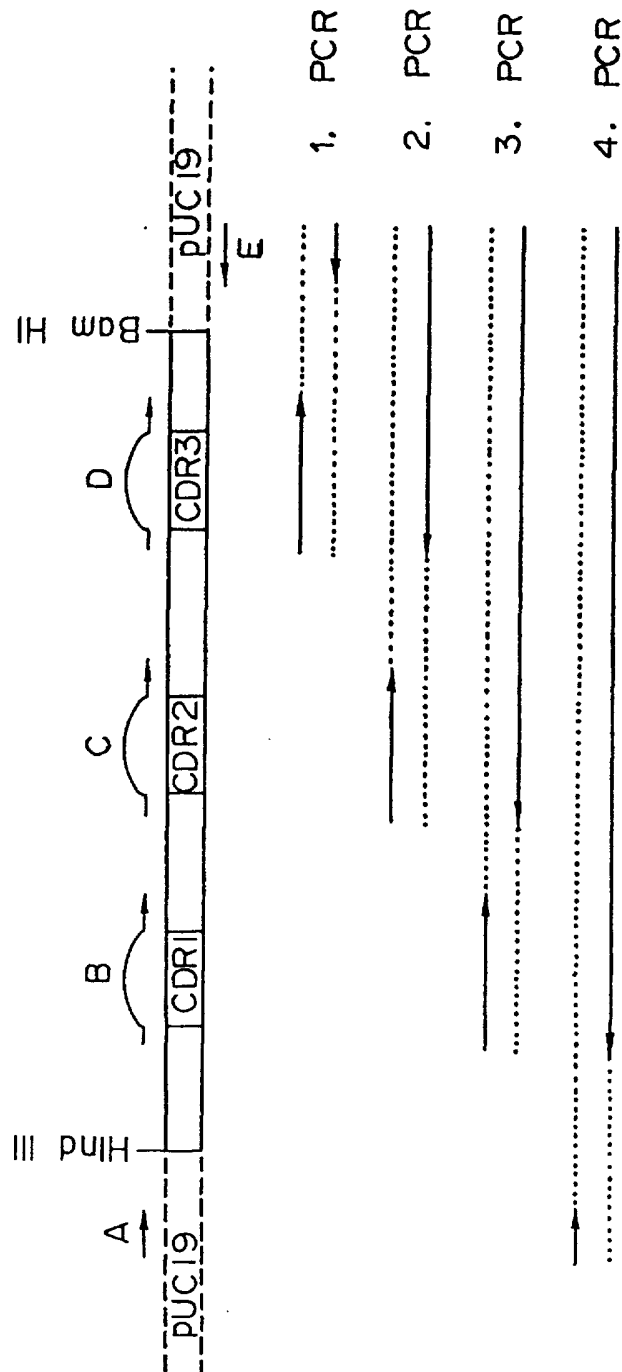
3. ábra



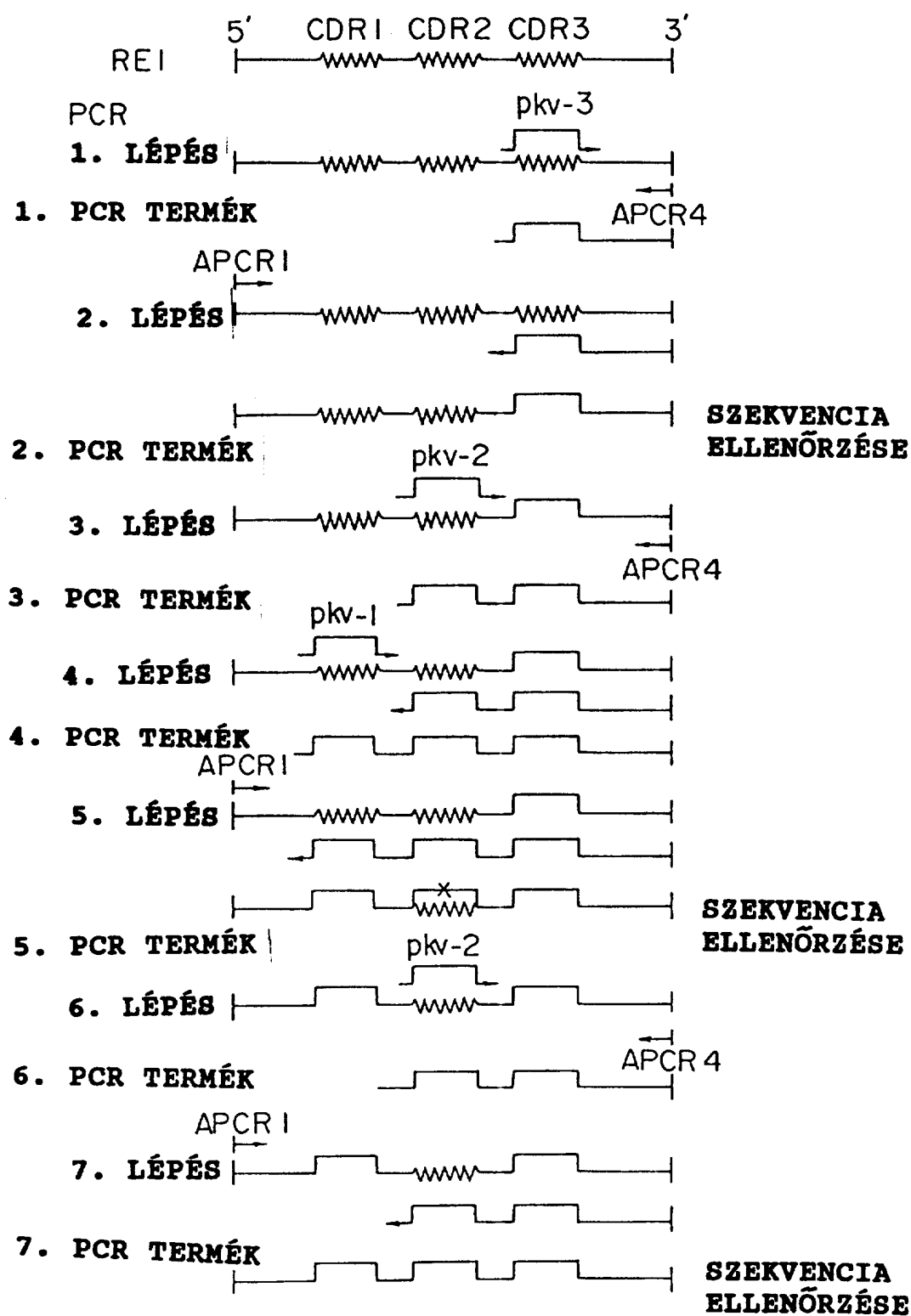
4. ábra



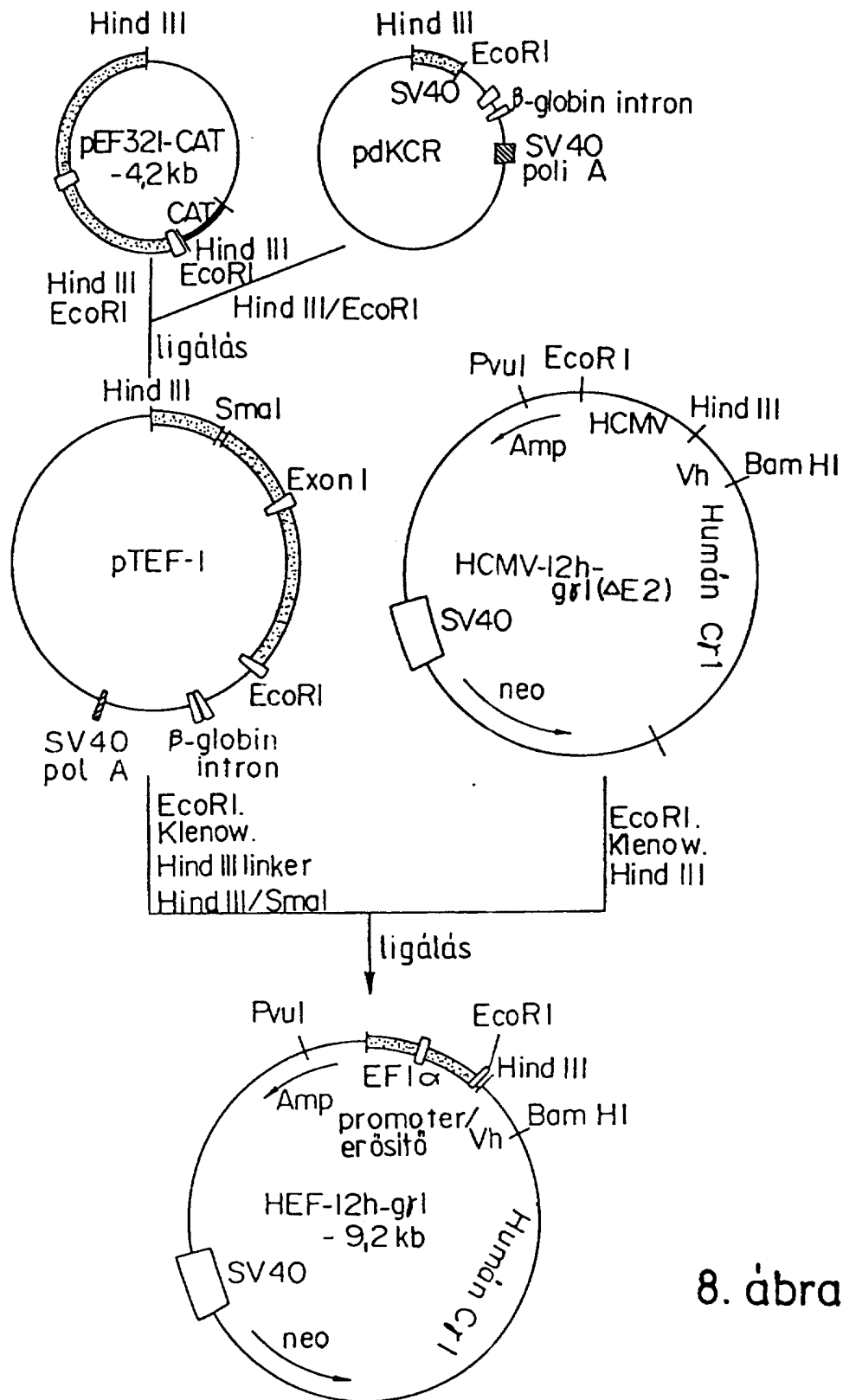
5. ábra



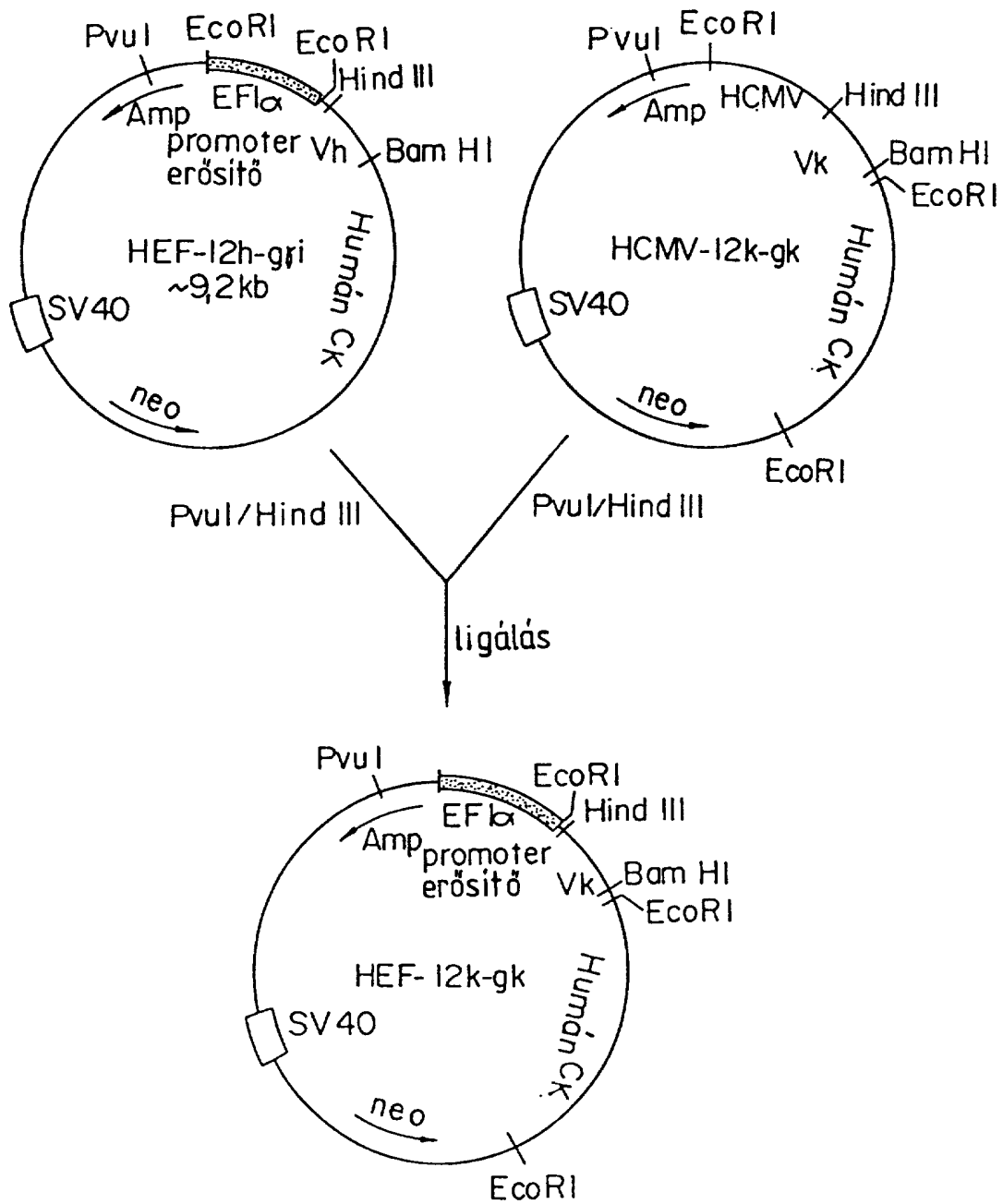
6. ábra



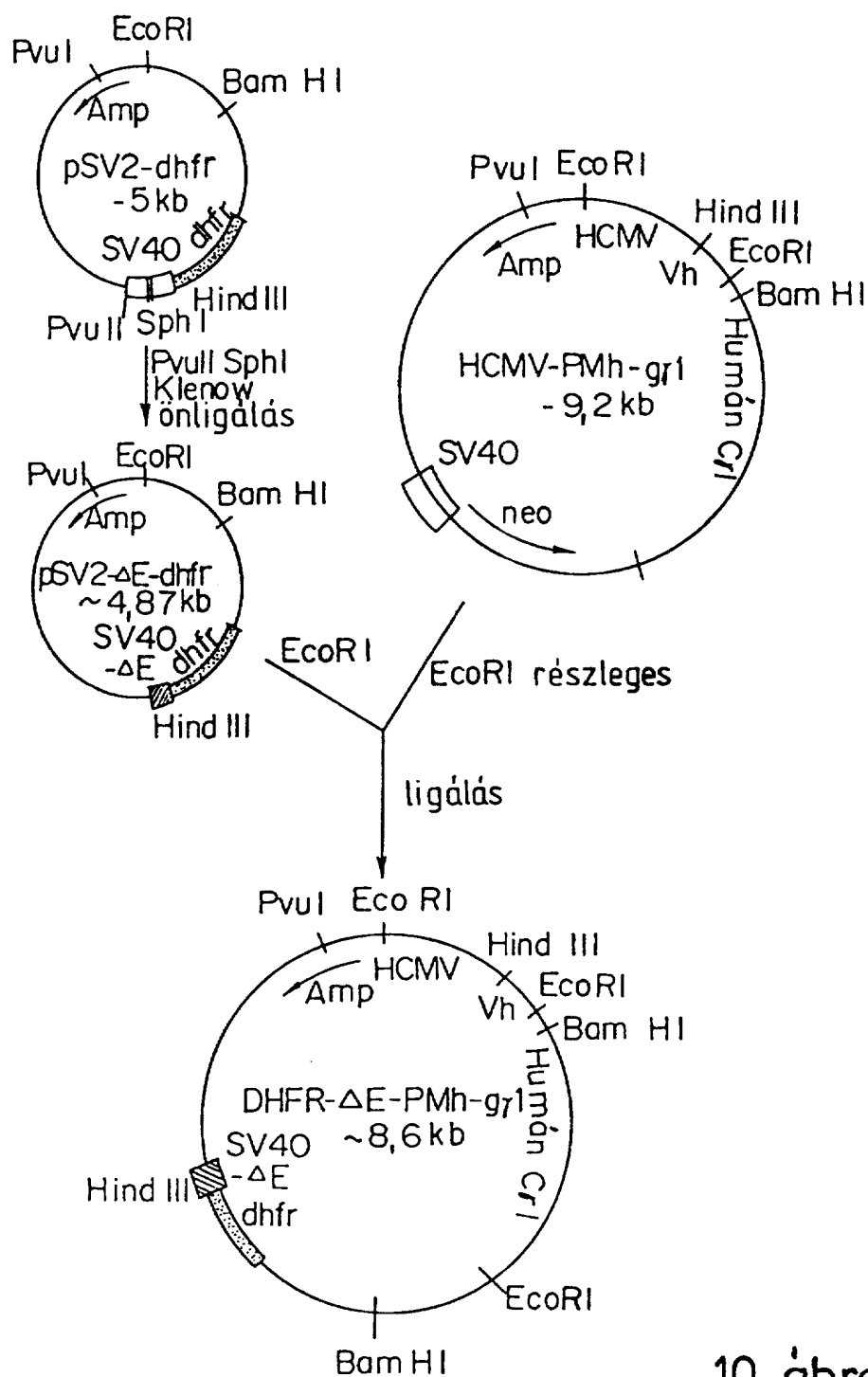
7. ábra



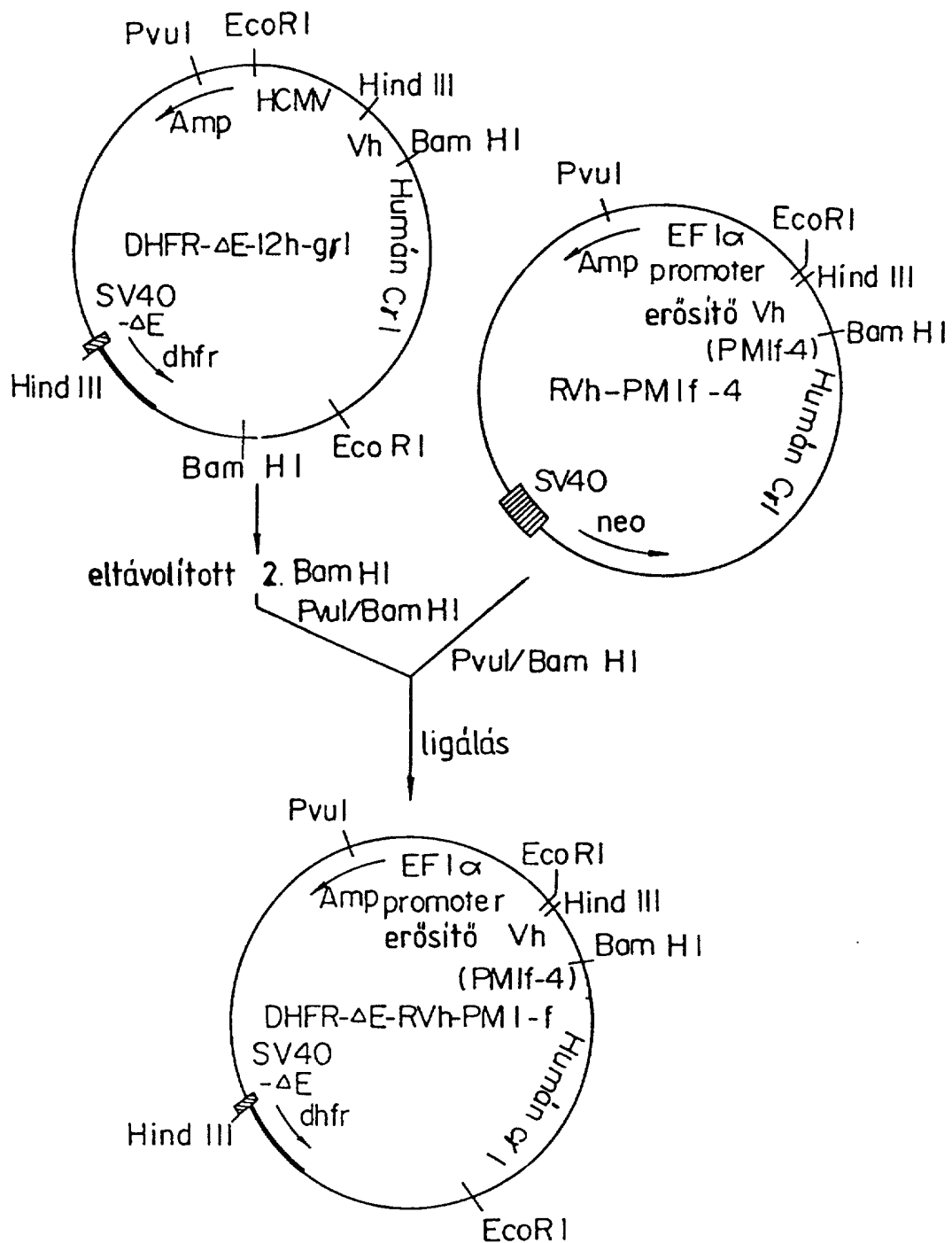
8. ábra



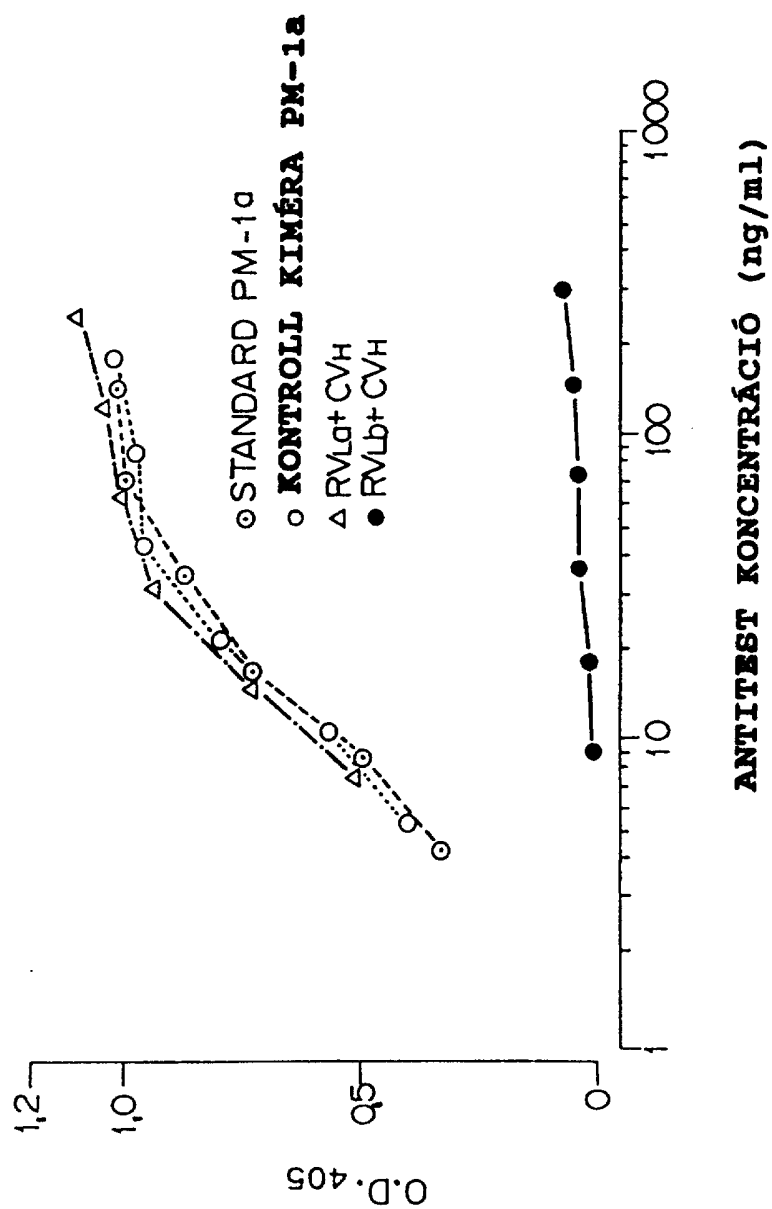
9. ábra



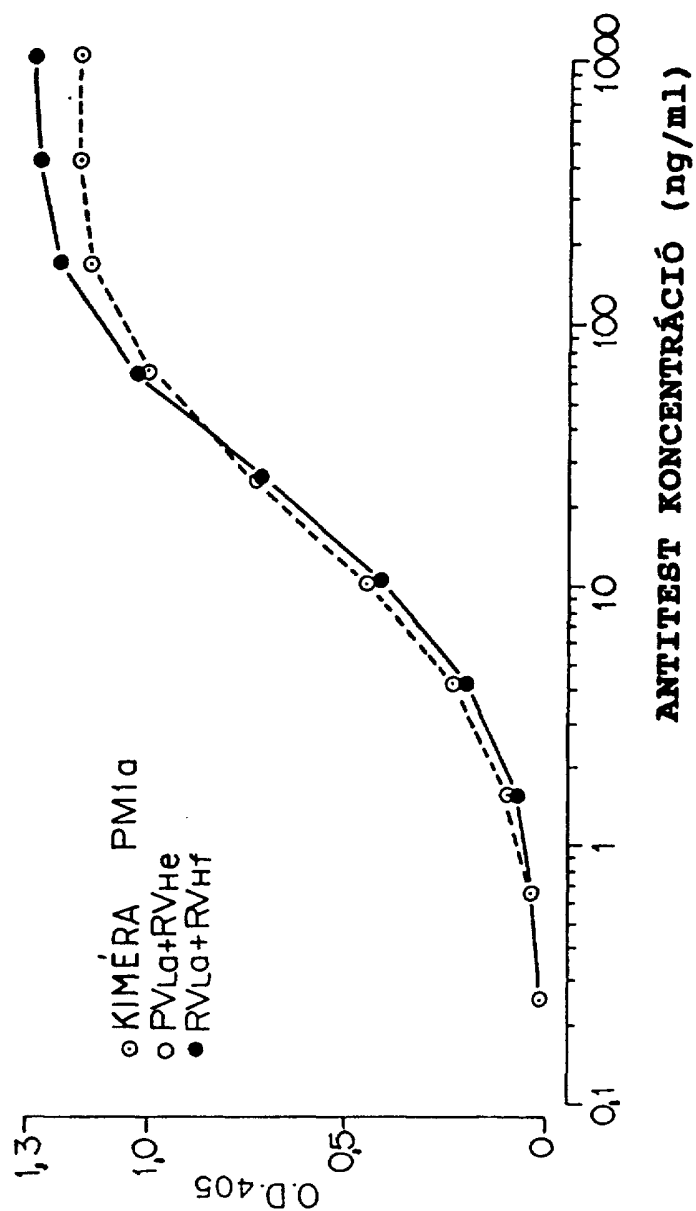
10. ábra



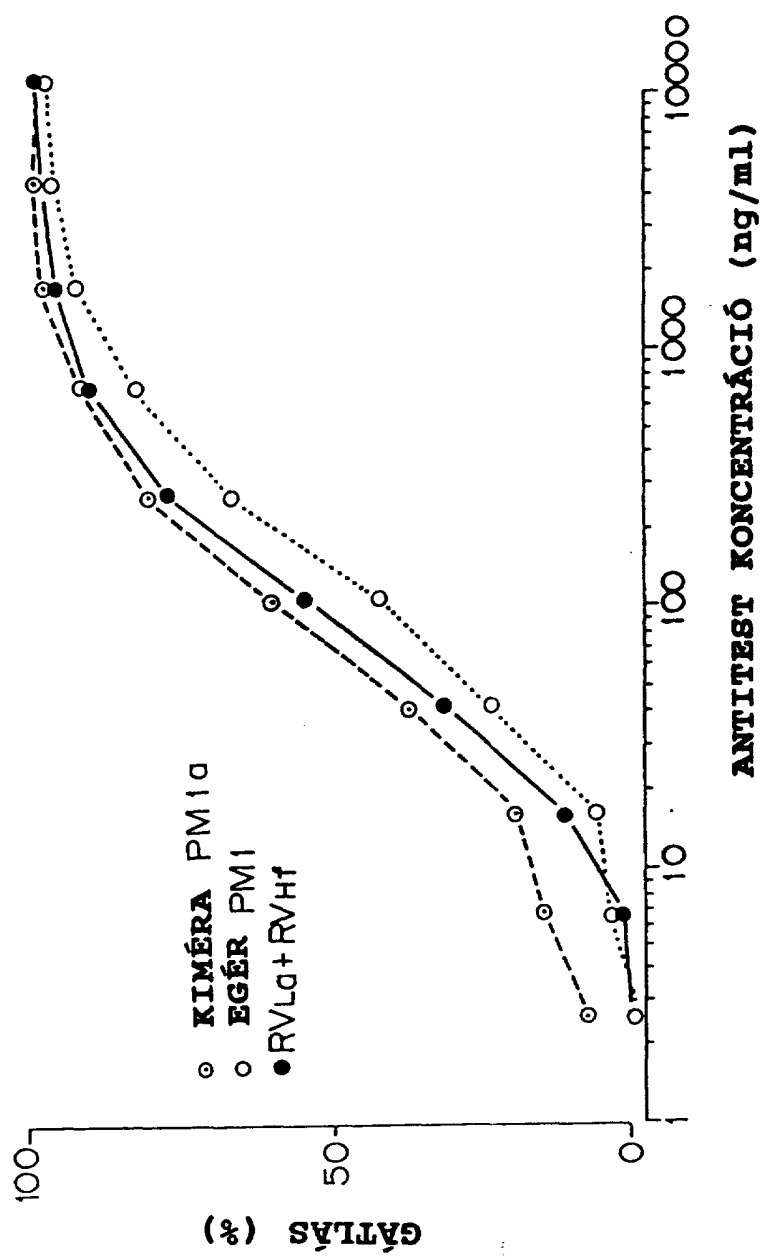
11. ábra



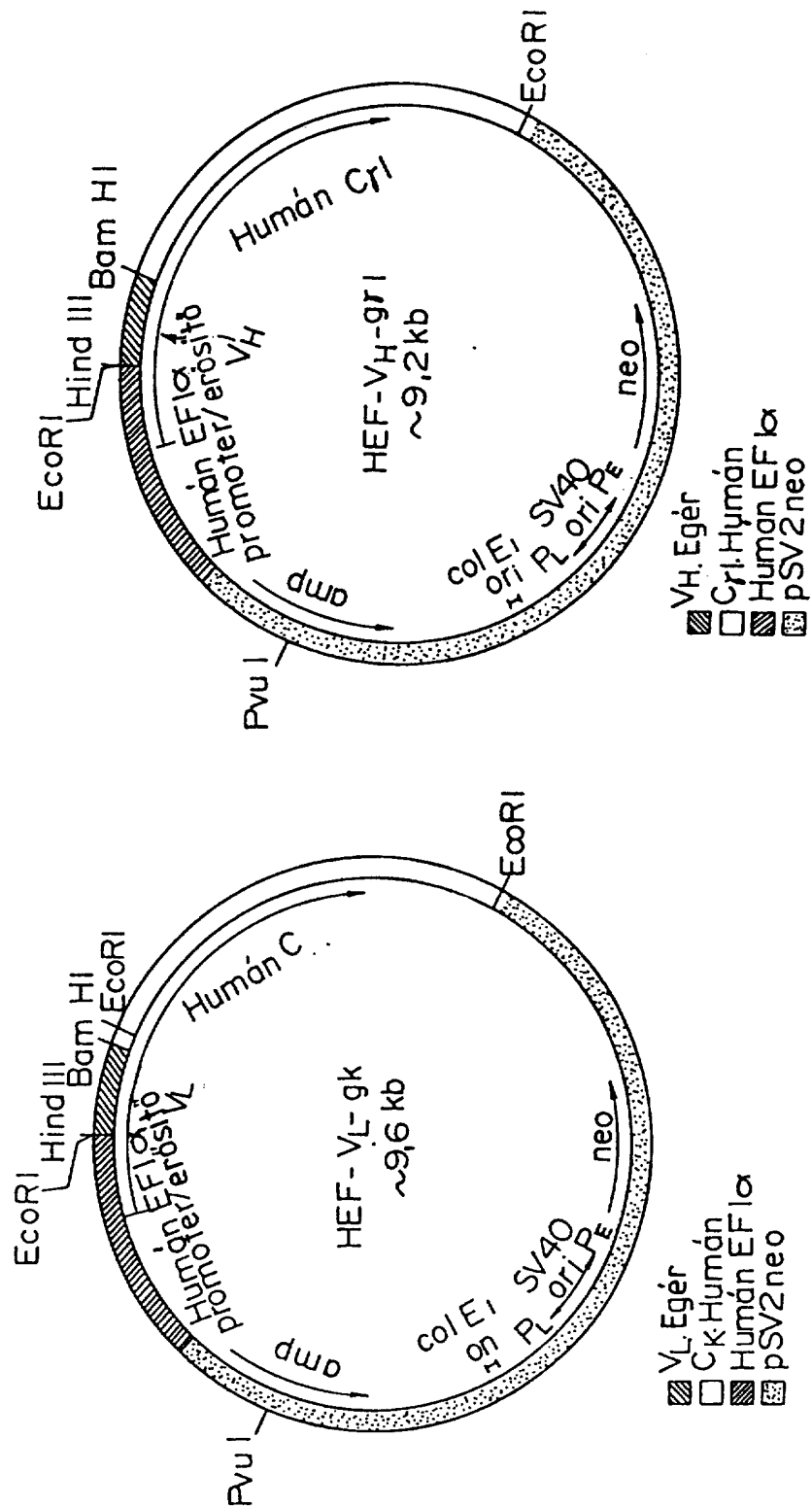
12. ábra



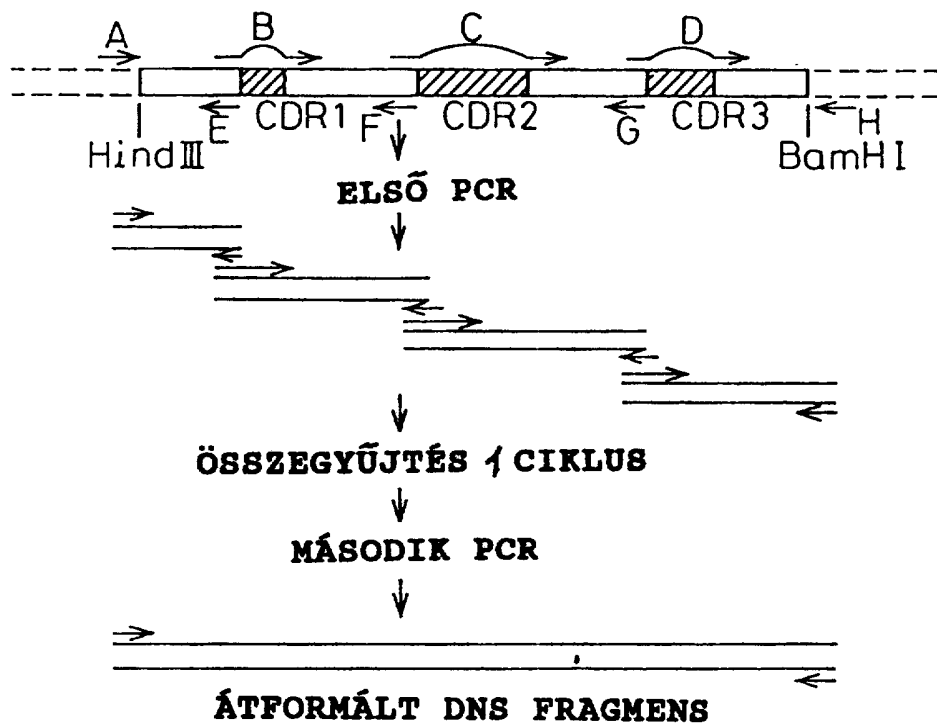
13. ábra



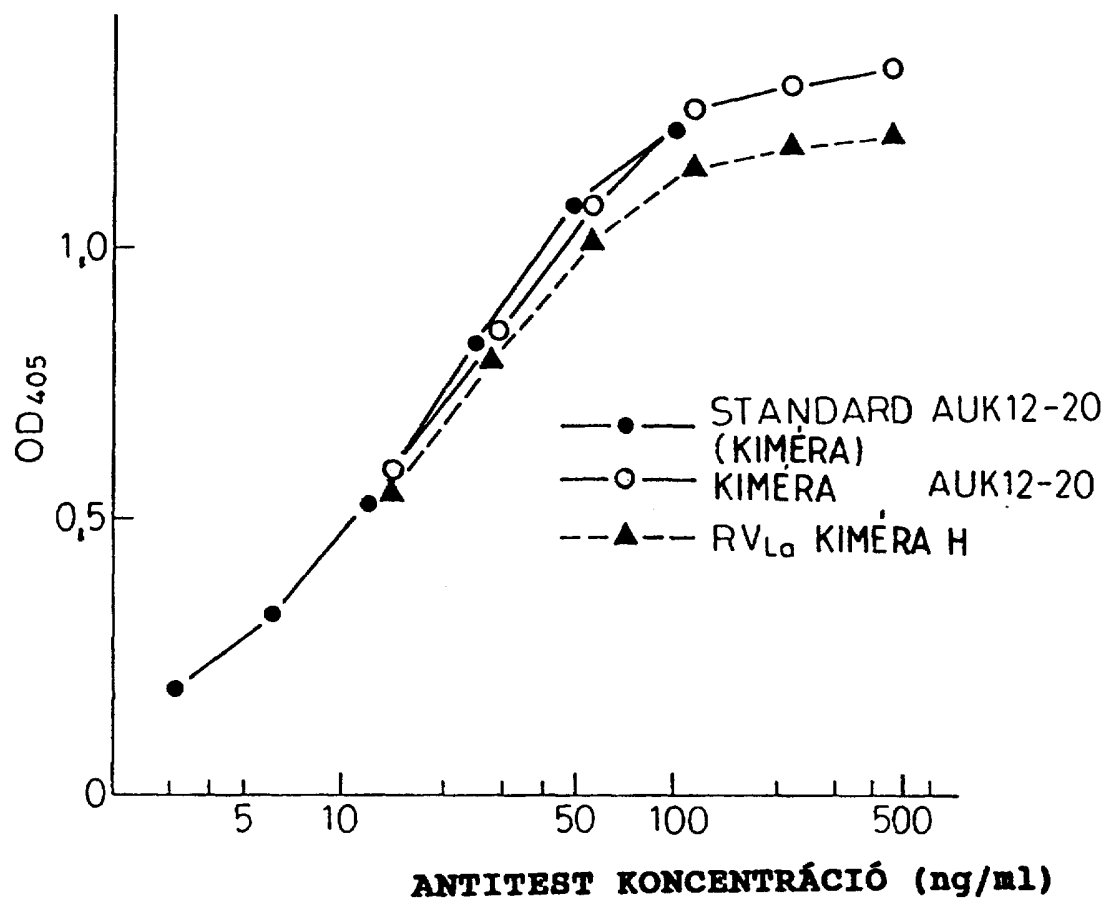
14. ábra



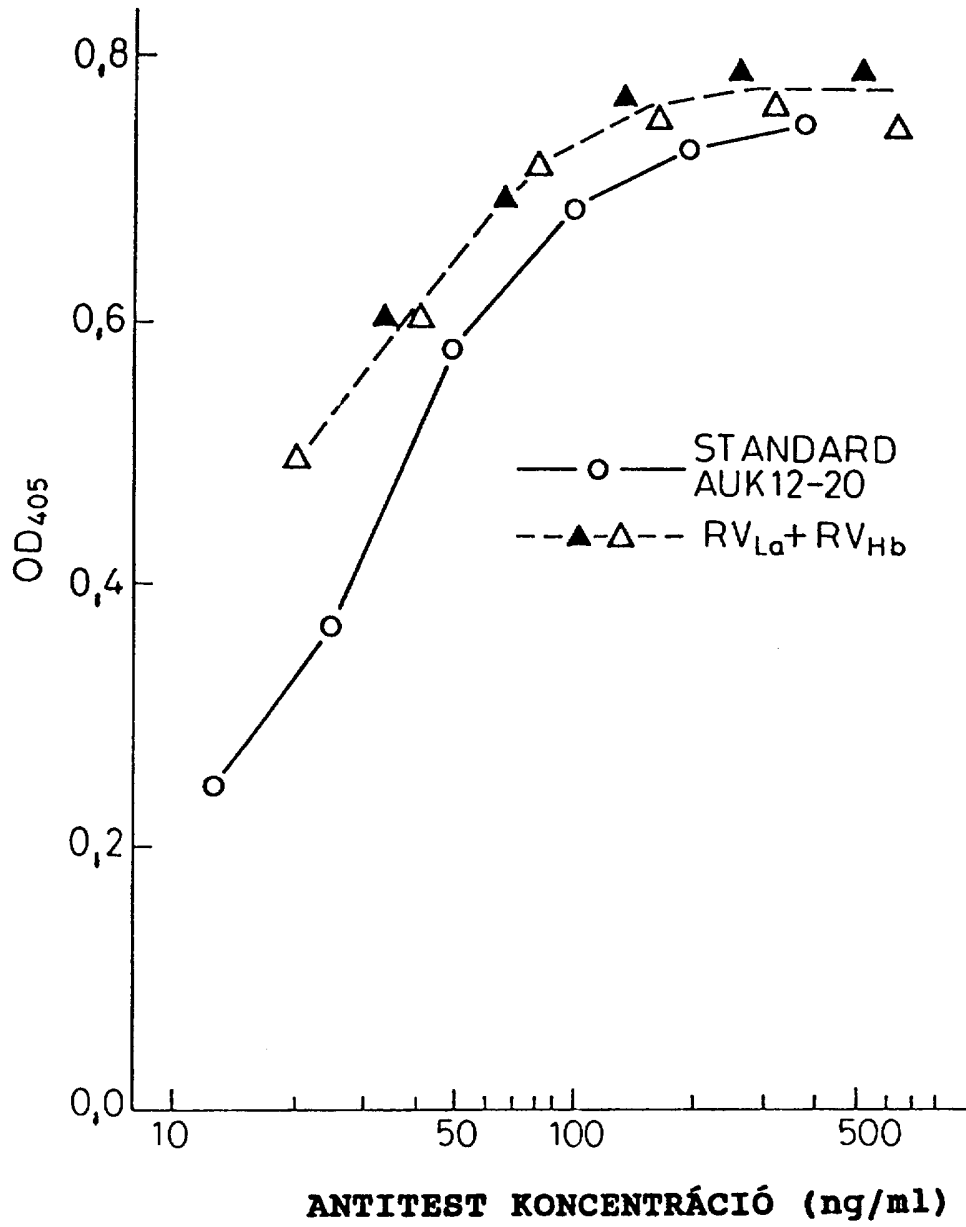
15. ábra



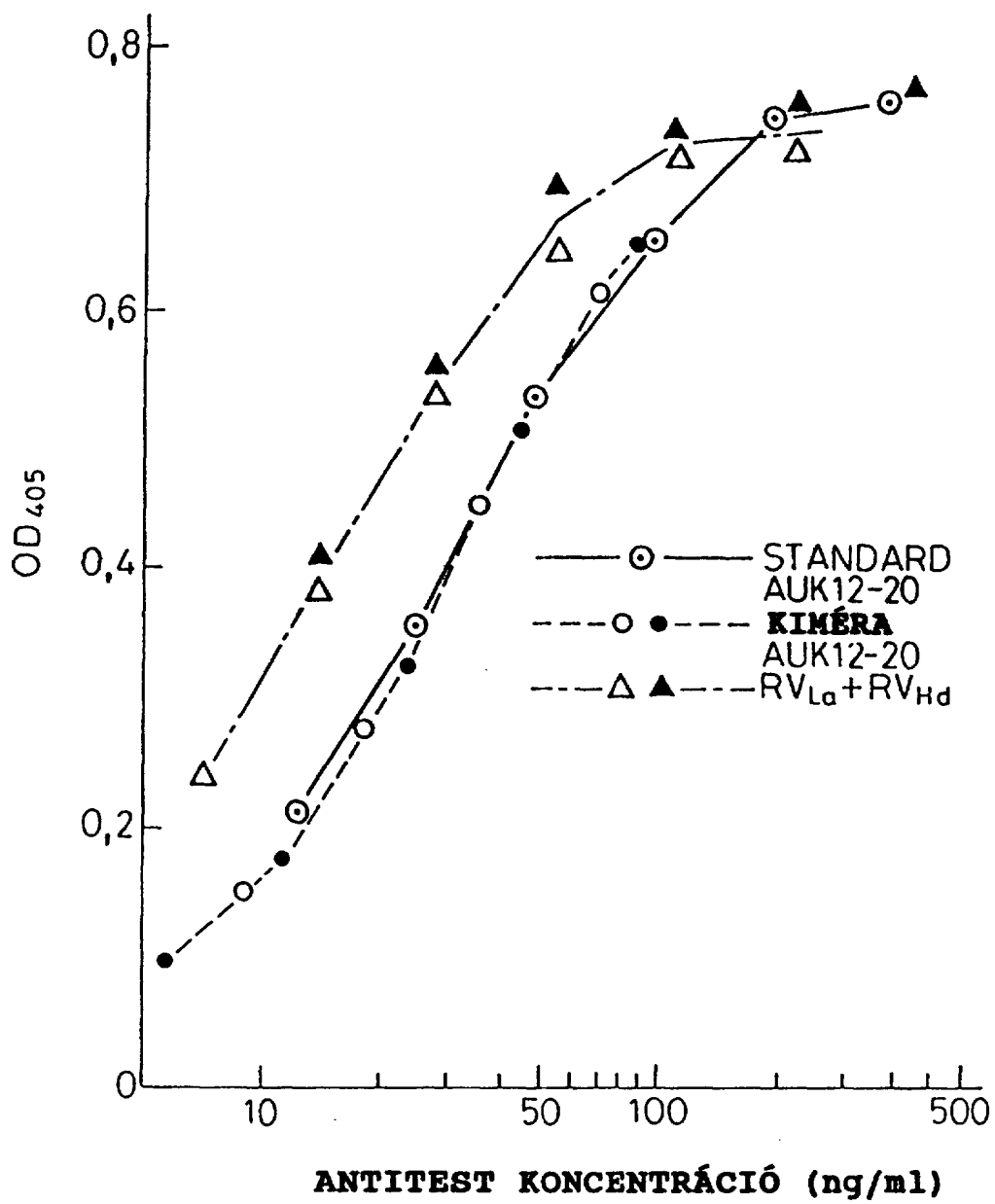
16. ábra



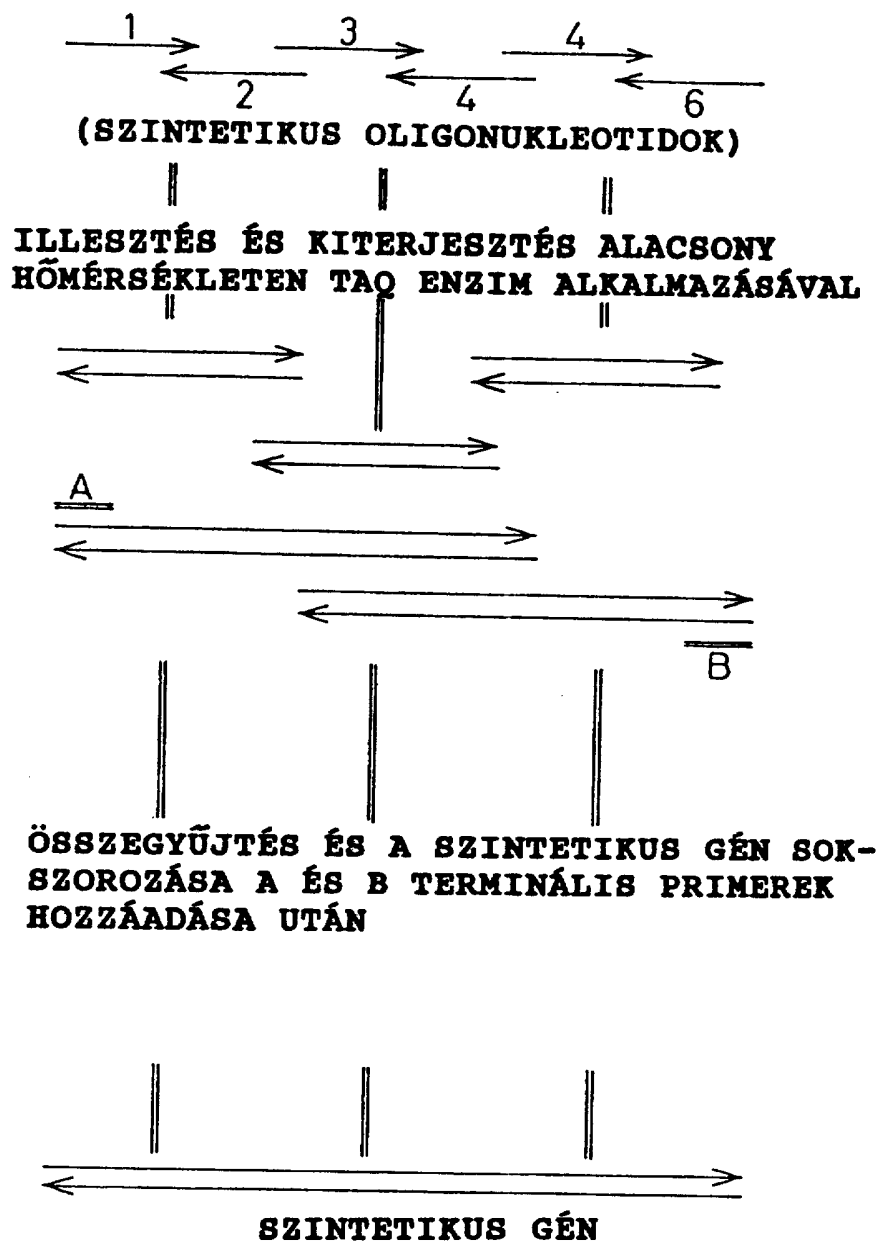
17. ábra



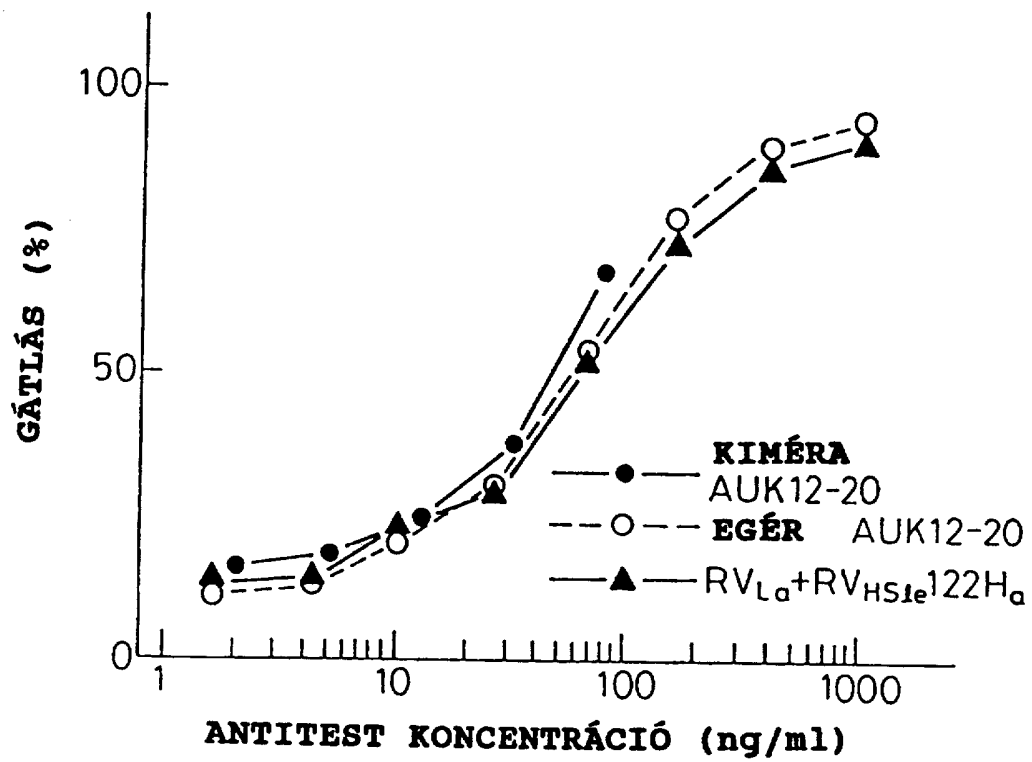
18. ábra



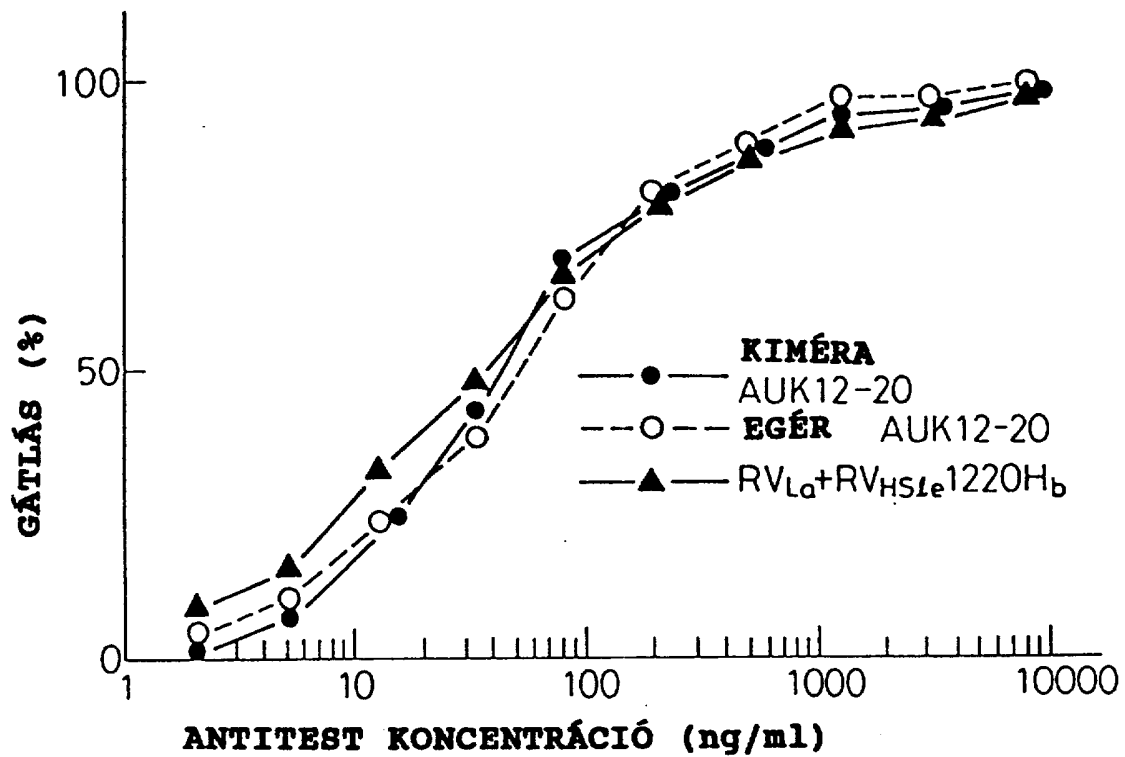
19. ábra



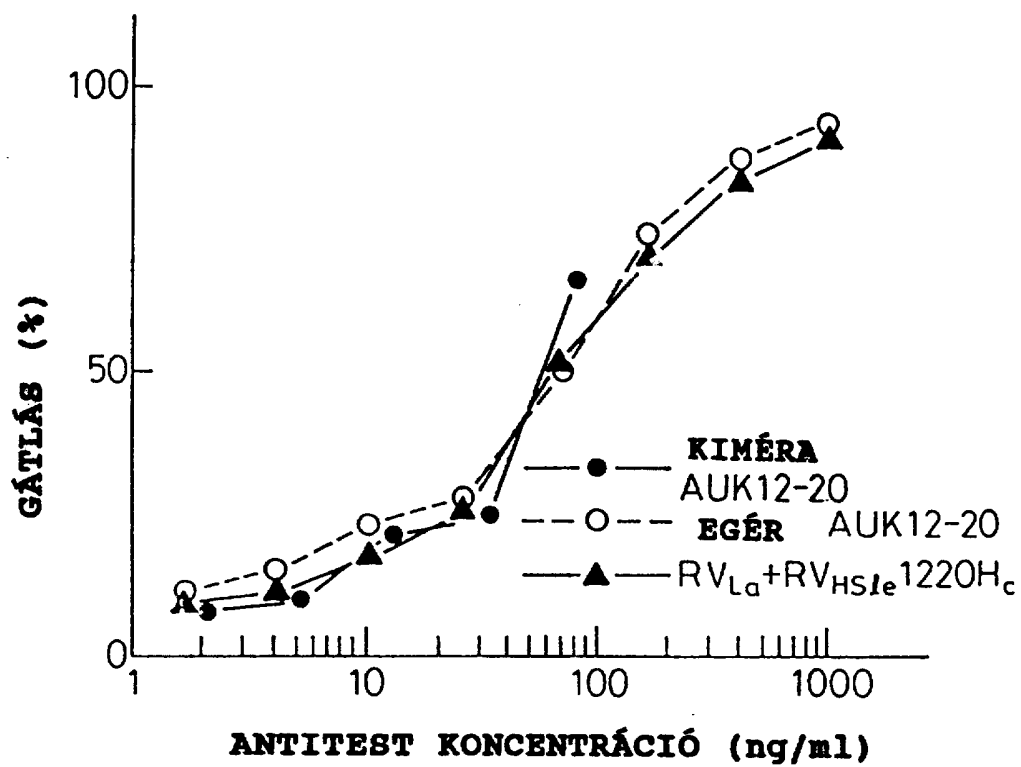
20. ábra



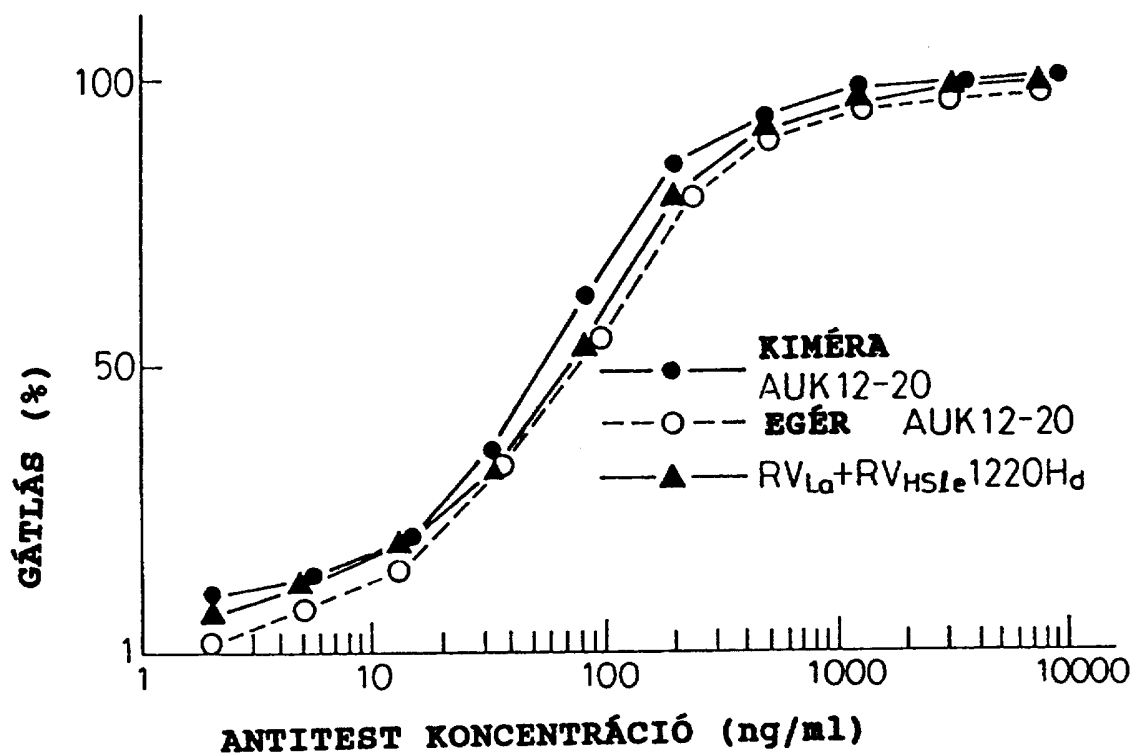
21. ábra



22. ábra



23. ábra



24. ábra