

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

4697/70

A

30000 40

Kivonat

-54408-

Eljárás emberi glikoprotein elleni kiméra-
ellenanyagok előállítására

Bejelentő: Eli Lilly and Company, INDIANAPOLIS, Indiana
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1990. 07. 31.

Elsőbbsége: ^{89.}1990. 07. 31 (07/387,665)

A találmány tárgya, eljárás kiméra ellenanyag-láncok expresszálasára transzfektált vagy transzformált sejtekben. Az eljárás során a CSP-hez kötődő nehéz illetve könnyű láncok variábilis régióit kódoló, a megadott szekvenciával jellemzett géneket tartalmazó expressziós vektorokat juttatjuk be transzfekecióval vagy transzformációval a recipiens sejtbe. A kiméra-ellenanyagokat alkotó fehérjéket külön-külön is kódolhatják az expressziós vektorok, de együtt is kifejeződhetnek egyetlen vektorról. A rekombináns DNS vektorokba beépített gének, az expressziójuk számára megfelelő körülmények között tenyésztett SP2/0 emlős gazdasejtekben fejeződnek ki.

felvett alá írás

felvett alá írás

6697/90

30305/90

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

A 1

52.113/SZE

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

WNO 5 C12015/13
-54408-

Eljárás emberi glikoprotein antigén elleni kiméra-
ellenanyagok előállítására

Eli Lilly and Company, INDIANAPOLIS, Indiana,
AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók:

BEAVERS Lisa Selsam, TRAFALGAR

BUMOL Thomas Frank, CARMEL

GADSKI Robert Alan, INDIANAPOLIS,

Indiana, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1990. 07. 31.

Elsőbbsége: 1989. 07. 31. (07/387,665)

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány új DNS molekularészeket és rekombináns DNS klónozó vektorokat nyújt, amelyek a 9. 2. 27-es monoklonális ellenanyagból származó egér/ emberi ellenanyagokat kódolnak. A vektorok lehetővé teszik az új DNS részek eukarióta sejtekben történő expresszióját. A találmány szintén szolgáltatja ezekkel a klónozó vektorokkal transzformált gazdasejteket. A transzformált gazdasejtek expresszálják a 9. 2. 27.-es kiméra ellenanyagot, vagy annak származékait. A találmányban használt DNS részek közül több olyat is használtunk a 9. 2. 27 származékok előállítására, amelyet ezelőtt sem természetes körülmények között, sem a laboratóriumban még nem szintetizáltak. A találmány szintén tartalmazza ezeket az egyedi molekulákat.

A 9. 2. 27 monoklonális ellenanyag egy murin ellenanyag, amely specifikusan kötődik egy ~250,000 dalton molekulatömegű glükoproteinhez, a kondroitin-szulfát proteoglikán coreproteinjéhez. Ez a fehérje nagy mennyiségben található a melanóma sejteken és más, véredények simaizomsejtjeit tartalmazó szövetekben. Az ellenanyag jól használható a betegség in vitro megállapítására, éppúgy mint a melanóma in vivo diagnosztizálására és kezelésére. A murin ellenanyagok embereknél történő alkalmazásakor fölléphet egy probléma, mégpedig akkor ha a rákos beteg immunrendszere ellenanyagot termel a murin immunglobulinok ellen. Ez az immunválasz nem minden paciensenél fordul elő, de ha igen akkor a kezelés hatékonyságának csökkenését eredményezi fokozott diéta

mellett is. A beteg immunválasza a murin ellenanyagnak a véréből történő gyors kiürülését okozhatja. Egy ilyen válasz komolyabb reakciókhoz is vezethet, mint például az anafilaxia vagy szérumbetegség. Ez az immunogenitás eleve kizárja az ellen-anyag adminisztrálását és ezzel csökkenti a kezelés klinikai értékét.

Emberi monoklonális ellenanyag készítése meglehetősen nehézkes, ezért kiméra ellenanyagokat állítanak elő, hogy megelőzzék az immunológiai problémákat. A kiméra ellenanyagok tartalmaznak egy, az egyik fajból származó, antigénspecifikus vagy variábilis régiót, ami kapcsolódik egy, a másik fajból származó konstans régióhoz. Egy ilyen konstrukciót Oi és Morrison írtak le a BioTechniques 4:214-221 (1986) számában. Amenyiben az immunválasz gyakran irányul a konstans régió ellen a humán és a murin konstans régiók átrendeződése jelentősen csökkenti a beteg immunológiai reakcióját. Ezek alapján a kiméra ellenanyagok nagyon jól tervezhetők a betegség kezelésére.

A kiméra ellenanyagok általános fogalmát már leírták, de egy adott specifitással rendelkező kiméra ellenanyagok fejlesztésére még szükség van. A jelen szabadalmi bejelentés rekombináns DNS molekulákat és azok aminosav szekvenciáit teszi közzé, amelyek tartalmazzák a 9. 2. 27 monoklonális ellenanyag molekula variábilis régióját. Ezeket a szekvenciákat úgy alakítottuk ki, hogy ugyanolyan szövetspecifitással rendelkező kiméra ellenanyagot expresszáljanak, mint a 9. 2. 27, de tartalmazzanak emberi eredetű konstans régiókat is. A találmány ezáltal lehetőséget

biztosít a 9. 2. 27 monoklonális ellenanyaggal azonos specifitású terápiára az immunológiai mellékhatások jelentős csökkenése mellett.

A jelen szabadalmi bejelentésben használt szakkifejezéseket az alábbiakban definiáljuk.

A -- deoxiadenozin

Ala -- alanin származék

Ap^R -- ampicillin rezisztens fenotípus vagy az azt biztosító gén

Arg -- arginin származék

Asp -- aszparaginsav származék

C -- deoxicitozin

Kiméra ellenanyag -- egy olyan ellenanyag, amelynél az egyik fajból, tipikusan az egérből származó, variabilis régiót kapcsolják össze egy eltérő fajból tipikusan az emberből származó konstans régióval

CSP -- kondroitin szulfát proteoglikán

Cys -- cisztein származék

Dhfr -- dihidrofolát reduktáz fenotípus vagy az azt biztosító gén

G -- deoxiguanozin

Gln -- glutamin származék

Glu -- glutaminsav származék

Gly -- glicin származék

G418^R -- G418 rezisztens fenotípus vagy az azt

biztosító gén (Km^R -ként is azonosítható)

His -- hisztidin származék

Hm^R -- higromicin rezisztens fenotípus vagy az azt biztosító gén

Ile -- izoleucin származék

IVS -- intront kódoló DNS szakasz, szokták közbeékelődött szekvenciának is nevezni

Leu -- leucin származék

Lys -- lizin származék

Met -- metionin származék

MoAB -- monoklonális ellenanyag (antibody)

9. 2. 27 antigén -- megközelítőleg 250,000 dalton molekulatömegű glükoprotein, amely a kondroitin szulfát proteoglikán core proteinje és megtalálható úgy az M21 emberi melanoma sejtvonalon, mint más, emberi melanoma sejtvonalakon és melanoma tumor szöveten

9. 2. 27 -- egy hibridóma sejtvonalból származó murin monoklonális ellenanyag, amely a megközelítőleg 250,000 dalton molekulatömegű glükoproteint ismeri fel, amely a kondroitin szulfát proteoglikán core glükoproteinje és megtalálható az M21 emberi melanóma sejtvonalon

Naszcents fehérje -- a messenger RNS transzlációs termékeként termelődött fehérje mindenféle poszt-

transzlációs módosítás előtt

Phe -- fenilalanin származék

Pro -- prolin származék

Promóter -- egy olyan DNS szekvencia, amely irányítja
DNS átírását RNS-sé

Rekombináns DNS klónozó vektor -- bármilyen önállóan
replikálódó egység, beleértve, de nem korlátozva
csak rájuk, a plazmidokat és fágokat, amelyek o-
lyan DNS molekulát tartalmaznak amihez egy vagy
több DNS darabot kapcsolhatnak vagy kapcsoltak

Rekombináns DNS expressziós vektor -- bármilyen re-
kombináns DNS klónozó vektor, amelybe egy promó-
tert építettek be

Replikon -- egy olyan DNS szekvencia, amely szabályozza
és lehetővé teszi egy plazmidnak vagy egyéb más
vektornak az önálló replikációját

Restrikciós fragment -- egy vagy több restrikciós endo-
nukleáz hatására keletkezett lineáris DNS szekven-
cia

Érzékeny gazdasejt -- olyan gazdasejt, amely nem képes
növekedni egy adott antibiotikum vagy más, számára
mérgező komponens jelenlétében a velük szembeni
rezisztenciát biztosító DNS szakasz nélkül

Ser -- szerin származék

Struktúrgén -- egy olyan DNS szekvencia, amely műkö-

dőképes polipeptidet kódol és tartalmazza a
transzlációt elindító és leállító jeleket is

T -- deoxitimidin

Tc^R -- tetraciklin rezisztens fenotípus vagy az azt
biztosító gén

Thr -- threonin származék

Trp -- triptofán származék

Tyr -- tirozin származék

Val -- valin származék

1. ábra -- a pMLCE-10 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép. A találmány jelen sza-
badalmi bejelentését szolgáló 1. és azt követő áb-
rák nem pontos méretek szerint készültek
2. ábra -- a pHKF-1 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép
3. ábra -- a pHKCE-10 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép
4. ábra -- a pGCEMK plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép
5. ábra -- a pMHCE-30 plazmid restrikciós helyeit és

funkcióit bemutató térkép

6. ábra -- a pHG1Z plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép

7. ábra -- a pHGCEM-30 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép

8. ábra -- a pNCEMG1 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép

9. ábra -- a pTKZK910 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép

10. ábra -- a pG9. 2. 27K plazmid restrikciós helyeit
és funkcióit bemutató térkép

11. ábra -- a pG4G21 plazmid restrikciós helyeit és
funkcióit bemutató térkép

12. ábra -- a pN9. 2. 27G1 plazmid restrikciós helyeit
és funkcióit bemutató térkép

A jelen szabadalmi bejelentés tárgya egy rekombináns DNS konstrukció, amely tartalmazza egy kiméra ellenanyag könnyű láncát, ami az egyik emlős fajból származik és egy másik fajból származó konstans régiót. A könnyű lánc variábilis régiója az alábbi aminosav szekvenciát tartalmazza:

Asn-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser
Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Arg-Ala-Thr
Ile-Ser-Cys-Arg-Ala-Ser-Glu-Ser-Val-Asp
Ser-Tyr-Gly-Asn-Ser-Phe-Met-His-Trp-Tyr
Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Lys-Leu
Leu-Ile-Tyr-Leu-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser
Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly
Ser-Arg-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Thr-Ile-Asp
Pro-Val-Glu-Ala-Asp-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr
Tyr-Cys-Gln-Gln-Asn-Asn-Glu-Asp-Pro-Leu
Thr-Phe-Gly-Ser-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile
Lys-Arg

Mivel a DNS bázispárok egymással komplementerek elegendő meghatározni a dupla szálú DNS egyik szálának a szekvenciáját, mivel ezzel már meghatározzuk a másik szálát is. A 9. 2. 27-es monoklonális ellenanyag variábilis régiójának a következő a nukleinsav szekvenciája:

AAC-ATT-GTG-CTG-ACC-CAA-TCT-CCA-GCT-TCT
TTC-GCT-GTG-TCT-CTA-GGG-CAG-AGG-GCC-ACC
ATA-TCC-TGC-AGA-GCC-AGT-GAA-AGT-GTT-GAT
AGT-TAT-GGC-AAT-AGT-TTT-ATG-CAC-TGG-TAC
CAG-GAG-AAA-CCA-GGA-CAG-CCA-CCC-AAA-CTC
CTC-ATC-TAT-CTT-GCA-TCC-AAC-CTA-GAA-TCT
GGG-GTC-CCT-GCC-AGG-TTC-AGT-GGC-AGT-GGA
TCT-AGG-ACA-GAC-TTC-ACC-CTC-ACC-ATT-GAT
CCT-GTG-GAG-GCT-GAT-GAT-GCT-GCA-ACC-TAT
TAC-TGT-CAA-CAA-AAT-AAT-GAG-GAT-CCT-CTC
ACG-TTC-GGC-TCG-GGG-ACA-AAG-TTG-GAA-ATA
AAA-CGG.

Továbbá a találmány szintén magában foglalja azt rekombináns DNS konstrukciót, amely tartalmazza egy kiméra ellenanyag egyik emlős fajból származó variábilis régiót hordozó nehéz láncát és egy másik emlős fajból származó konstans régiót. A nehéz lánc variábilis régiójának fehérje részét az alábbi aminosav sorrend jellemzi.

Gln-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Ser-Gly-Pro-Glu
 Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Ile
 Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Ala-Phe-Ser
 Arg-Ser-Trp-Met-Asn-Trp-Val-Lys-Gln-Arg
 Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Arg
 Ile-Tyr-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Thr-Asn-Tyr
 Asn-Gly-Lys-Phe-Lys-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu
 Thr-Ala-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr
 Met-Gln-Val-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Val-Asp
 Ser-Ala-Val-Tyr-Phe-Cys-Ala-Arg-Gly-Asn
 Thr-Val-Val-Val-Pro-Tyr-Thr-Met-Asp-Tyr
 Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Ser-Val-Thr-Val-Ser
 Ser

A 9. 2. 27 ellenanyag nehéz láncának variábilis régiója az alábbi nukleinsav sorrendből épül fel:

CAG-GTC-CAG-CTG-CAG-CAG-TCT-GGA-CCT-GAG
 CTG-GTG-AAG-CCT-GGG-GCC-TCA-GTG-AAG-ATT
 TCC-TGC-AAA-GCT-TCT-GGC-TAC-GCA-TTC-AGT
 AGG-TCT-TGG-ATG-AAC-TGG-GTG-AAG-CAG-AGG
 CCT-GGA-CAG-GGT-CTT-GAG-TGG-ATT-GGA-CGG
 ATT-TAT-CCT-GGA-GAT-GGA-GAT-ACT-AAC-TAC
 AAT-GGG-AAG-TTC-AAG-GGC-AAG-GCC-ACA-CTG
 ACT-GCA-GAC-AAA-TCC-TCC-AGC-ACA-GCC-TAC
 ATG-CAG-GTC-AGC-AGC-CTG-ACC-TCT-GTG-GAC
 TCT-GCG-GTC-TAT-TTC-TGT-GCA-AGA-GGG-AAT
 ACG-GTA-GTA-GTT-CCC-TAT-ACT-ATG-GAC-TAC
 TGG-GGT-CAA-GGA-ACC-TCA-GTC-ACC-GTC-TCC
 TCA.

A találmány szerinti nehéz és könnyű láncok molekuláit külön szignálpeptidekkel kapcsoltuk össze. A könnyű lánc szignálpeptidjének az aminosav sorrendje:

Met-Glu-Thr-Asp-Thr-Leu-Leu-Leu-Trp-Val

Leu-Leu-Leu-Trp-Val-Pro-Gly-Ser-Thr-Gly.

A fenti könnyű lánc szignálpeptidjét kódoló DNS nukleinsav szekvenciája a következő:

ATG-GAG-ACA-GAC-ACA-CTC-CTG-CTA-TGG-GTG

CTG-CTG-CTC-TGG-GTT-CCA-GGT-TCC-ACA-GGT.

A nehéz lánc szignálpeptidjének aminosav sorrendje:

Met-Gly-Trp-Ser-Arg-Ile-Phe-Leu-Phe-Leu

Leu-Ser-Ile-Thr-Ala-Gly-Val-His-Cys.

A fenti nehéz lánc szignálpeptidjét kódoló DNS nukleinsav szekvenciája a következő:

ATG-GGA-TGG-AGC-CGG-ATC-TTT-CTC-TTC-CTC

CTG-TCA-ATA-ACT-GCA-GGT-GTC-CAT-TGC

A találmány új DNS összetétele 9. 2. 27. monoklonális ellenanyagot termelő hibridóma sejtekből tisztított mRNS-ből nyert cDNS klónokból származik. A pTZK910 plazmid tartalmazza a 9. 2. 27 monoklonális ellenanyag könnyű láncának belső kódoló szekvenciáját, a könnyű lánchoz kapcsolt szignálpeptid kódoló szekvenciáját, valamint a molekula 5' és 3' nem transzlálódó régióit. A 5' nem transzlálódó rész szekvenciája a következő:

5'-AGTTCCAGGACAGCTAGGGCTATACAGAGAAACCCTGTCTCGAAAAACCAAAAA
AAAAAAAACCAGCTCTCAGAG-3'

A pTZK910 plazmid a szokásos módon izolálható az E. coli K12/pTZK910 törzsből, melyet 1989. április 7.-én letétbe helyeztünk a Norther Regional Research Laboratory-nál (NRRL), Peoria, Illionis, és megtalálható az NRRL B-18478 raktári szám alatt. A pTZK910 plazmid restrikciós helyeit és funkcióinak térképét a csatolt rajzok közül a 9. ábrán mutatjuk be.

plazmidokból készítettük, amint azt Beidler és munkatársai az Eljárás emberi karcinoembrionális antigén elleni kiméra ellenanyagok előállítására című, EP 0332424 lajstomszámú európai szabadalmi leírásban leírják.

A pMLCE-10 hordozza az emberi karcinoembrionális antigént fölismerő CEM monoklonális ellenanyag könnyű láncának variábilis régióját kódoló genomi szekvenciáját. A pMLCE-10 plazmidot letétbe helyeztük az American Type Culture Collection-nél 1988. március 1.-én és ott megtalálható az ATCC 67639 raktári szám alatt. A pHKF-1 plazmid hordozza a humán ellenanyag könnyű lánc konstans régiójának genomi szekvenciáját. A pHKF-1 plazmidot letétbe helyeztük az American Culture Collection-nél 1988. március 1.-én és ott megtalálható az ATCC 67637 raktári szám alatt. A pMLCE-10 és pHKF-1 plazmidok restriktációs helyeit és funkcióinak térképét a csatolt rajzok közül az 1. és 2. ábrán mutatjuk be.

A pHKCE-10 plazmidot a következőképpen készítettük: a pMLCE-10-ból izoláltuk a CEM könnyű lánc variábilis régióját tartalmazó, megközelítőleg 3.8kb nagyságú HindIII fragmentet és ezt ligáltuk a HindIII-mal emésztett pHKF-1 plazmidba. A pSV2gpt plazmidot megemésztettük EcoRI restriktációs enzimmal és miután a ClaI linkert (a szekvenciája: dCATCCGATG) ligáltuk erre az EcoRI helyre, megkaptuk a pSV2gpt-Cla plazmidot. A következő lépésben a pHKCE-10 plazmidot emésztettük ClaI és BamHI restriktációs enzimekkel és izoláltuk a ~9.0kb méretű ClaI/BamHI restriktációs frag-

mentet, amely az emberi könnyű lánc konstans régiójának génjéhez kapcsolt CEM könnyű lánc variábilis régióinak a génjét tartalmazza. A pSV2gpt-Cla plazmidot szintén megemésztettük a ClaI és BamHI restrikciós enzimekkel majd izoláltuk a körülbelül 4.5kb nagyságú ClaI/BamHI fragmentet. A pHKCE-10 plazmidból származó ~9.0kb méretű fragmentet ligáltuk a pSV2gpt-Cla plazmid ~4.5kb-nyi vektor fragmentjébe és megkaptuk a pGCEMK expressziós plazmidot. A pHKCE-10 és pGCEMK restrikciós helyeit és funkcióját be-mutató térképeket a csatolt rajzok közül a 3. és 4. ábrán mutat-juk be.

Azt követően a pTZK910 plazmidot a DdeI és BamHI rest-rikciós enzimekkel megemésztettük, majd izoláltuk a körülbelül 357bp-nyi DdeI/BamHI fragmentet, amely tartalmazza a 9. 2. 27 kappa variábilis régiójának nagy részét kódoló gént. Ezután szin-tetizáltuk az alábbi BglII-DdeI linkert:

5'-GATCTGAATTCC -3'
3'- ACTTAAGGAGT-5'

Szintén szintetizáltuk a BamHI-SstII linkert, amely a 9. 2. 27 kappa variábilis régiójának NH₂ terminális végéről 15 aminosavat kódoló szakaszt, plusz egy eukarióta splicing-helyet tartalmaz. A linker szekvenciája a következő:

5'-GATCCTCTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTAAGTACCGC -3'
3'- GAGAGTGCAAGCCGAGCCCTGTTTCAACCTTTATTTTGCATTCATGGCGCC-5'
BamHI SstII

A következő lépés ennek a két linkernek a pTZK910 plazmid ~357bp-nyi fragmentjéhez történő ligálása. BglII és SstII restriktációs enzimekkel való emésztés után izoláltuk és tisztítottuk ezt körülbelül 420bp-nyi fragmentet. A pGCEMK plazmidot megemésztettük BglII és SstII enzimekkel, hogy eltávolítsuk az anti-CEA ellenanyag könnyű láncának variábilis régióját kódoló gént. A pTZK910 plazmid ~420bp méretű BglII/SstII restriktációs fragmentjét ligáltuk a pGCEMK plazmid BglII és SstII enzimekkel kivágott nagy vektor-fragmentjébe és így jutottunk a pG9. 2. 27K plazmidhoz, amely a pGCEMK plazmid kappa promóterét, a 9. 2. 27. ellenanyag könnyű láncának variábilis régióját kódoló gént, az emberi kappa lánc konstans régióját kódoló gént és a gpt rezisztenciát biztosító gént tartalmazza. A pG9. 2. 27K plazmid restriktációs helyeit és funkcióit bemutató térképet a csatolt rajzok közül a 10. ábrán mutatjuk be.

Hasonló módon készítettük el a 9. 2. 27 nehéz lánc variábilis régióját eukariótában expresszáló vektort. A 9. 2. 27 nehéz lánc variábilis régiójának a génjét egy olyan vektorba építettük be, amely hordoz egy eukarióta promótert és egy emberi nehéz lánc (gamma 1) konstans régiót kódoló gént. A murin variábilis régiót - amely fölismeri az emberi CEA-t kódoló gént - tartalmazó pNCEMG1 plazmidot hozzákapcsoltuk egy eukarióta promóterhez és az emberi nehéz lánc konstans régiójának a génjéhez. A pNCEMG1 plazmid nehéz lánc variábilis régió génjének fölcserélése a 9. 2. 27 ellenanyag nehéz lánc variábilis régió génjével a pN9.

2. 27G1 expressziós vektort eredményezi. A pNCEMG1 plazmidot a pMHCE-30, pHG1Z és a pSV2neo plazmidokból készítettük, ahogyan azt Beidler és munkatársai az EP 0332424 lajstromszámú európai szabadalmi leírásban közzé teszik.

A pMHCE-30 plazmid hordozza a CEM monoklonális ellenanyag nehéz lánc variábilis régiójának genomi szekvenciáját, amely fölismeri az emberi karcinoembrionális antigént. A pMHCE-30 plazmidot letétbe helyeztük az ATCC törzsgyűjteményben 1988. március 1.-én és ott hozzáférhető az ATCC 67640 raktári szám alatt. A pHG1Z plazmid a humán ellenanyag nehéz lánc variábilis régiójának genomi szekvenciáját tartalmazza. A pHG1Z plazmidot is elhelyeztük az ATCC-nél 1988. március 1.-én az ATCC 67638 raktári szám alatt. A pMHCE-30 és pHG1Z plazmidok restrikciós helyeit és funkcióinak térképét a csatolt rajzok közül az 5. és 6. ábrán mutatjuk be. A pHGCEM-30 plazmidot úgy készítettük, hogy a pMHCE-30-ból izoláltuk a körülbelül 5.3kb nagyságú ClaI/HindIII fragmentet, amely a CEM nehéz lánc variábilis régióinak a génjét tartalmazza, majd ezt a fragmentet ligáltuk a ClaI/HindIII emésztett pHG1Z vektorba. Mivelhogy a pMHCE-30 plazmid több mint egy BamHI helyet tartalmaz, a pMHCE-30 plazmid 5.3kb méretű ClaI/HindIII restrikciós fragmentje nagyon könnyen izolálható egy ClaI teljes emésztést követő részleges BamHI emésztés után. A pSV2neo plazmidot (ATCC 37149) EcoRI enzimmel emésztettük, ClaI linkereket (dCATCCGATG) ligáltunk az EcoRI helyre és így kaptuk a pSV2neo-Cla plazmidot. Ezután teljesen megemésztettük a pSV2neo-Cla plaz-

midot BamHI és ClaI restriktációs enzimekkel és izoláltuk a körülbelül 4.5kb méretű vektor-fragmentet. A pHGCEM-30 plazmidot teljesen megemésztettük ClaI, majd részlegesen BamHI restriktációs enzimekkel és izoláltuk az emberi nehéz lánc konstans régiót kódoló génhez kapcsolt CEM nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó ~12.7kb nagyságú restriktációs fragmentet. A pHGCEM-30 plazmid körülbelül 12.7kb-nyi ClaI/BamHI restriktációs fragmentjét ligáltuk a pSV2neo-Cla plazmid ~4.5kb méretű ClaI/BamHI vektor-fragmentjébe és megkaptuk a pNCEMG1 expressziós vektort. A pHGCEM-30 és pNCEMG1 plazmidok restriktációs helyeit és funkcióinak térképét a csatolt rajzok közül a 7. és 8. ábrán mutatjuk be.

A pNCEMG1 plazmidot oly módon kezeltük, hogy bizonyos helyek kiessenek belőle. Először megemésztettük NotI restriktációs enzimmal, Klenow enzimmal kezeltük, önmagával ligáltuk, hogy kiejtsük a NotI helyet és így megkaptuk a pNCEMG1 Δ N plazmidot. Azután ezt a plazmidot részlegesen emésztettük BamHI restriktációs enzimmal, Klenow-val kezeltük, önmagával ligáltuk, hogy a három BamHI hely közül kettőt kiejtsünk és így módon megkaptuk a pNCEMG1 Δ B2 plazmidot. A kiejtett két BamHI hely közül az egyik közvetlenül a CEM struktúrgén 5' végénél a másik pedig az emberi gamma 1 gén és a neomicin rezisztenciát biztosító gén között található. A CEM struktúrgén 3' végénél található BamHI hely megmaradt. A pNCEMG1 Δ N Δ B2 plazmidot ezután SalI restriktációs enzimmal megemésztettük, Klenow-val kezeltük, önmagával ligáltuk, hogy kiejtsük a két SalI helyet, amelyek az emberi gamma 1 géntől 5'

irányban találhatóak. Így módon hozzájutottunk egy újabb plazmidhoz, a pNCEMG1ΔNΔB2ΔS2-höz.

Ezt követően a pG4G21 plazmidot EcoRI és MaeIII restriktációs enzimekkel emésztettük és izoláltuk belőle a megközelítőleg 421bp méretű EcoRI/MaeIII restriktációs fragmentet, amely tartalmazza a 9. 2. 27 gamma variábilis régióját kódoló gén nagy részét. Szintetizáltuk a BclI/EcoRI linkert, melynek a következő a szekvenciája:

5'-GATCAGGGTCCG -3'
3'-TCCCAGGGCTTAA-5'
BclI EcoRI

Ezután szintetizáltuk a MaeIII-BamHI linkert, amely tartalmazza a 9. 2. 27 gamma variábilis régió NH₂-terminális végén levő öt aminosavat kódoló szekvenciát plusz egy eukarióta splicing-he-lyet.

A szekvenciája a következő:

5'-GTCACCGTCTCCTCAGGTAAG -3'
3'-GCAGAGGAGTCCATTCCTAG-5'
MaeIII BamHI

A két linkert ezután a pG4G21 plazmid, körülbelül 421bp-os EcoRI-MaeIII restriktációs fragmentjéhez ligáltuk. BclI és BamHI restriktációs enzimekkel történt emésztés után izoláltuk és tisztítottuk ezt a kb. 462bp hosszúságú fragmentet. A pNCEMG1ΔNΔB2ΔS2 plazmidot az anti-CEA ellenanyag gamma lánc variábilis régióját kódoló gén eltávolítása céljából megemésztettük BclI és BamHI enzimekkel. A BclI/BamHI emésztett pNCEMG1ΔNΔB2ΔS2 plazmid vektor-fragmentjébe ligáltuk a körülbelül 462bp-nyi BclI/BamHI fragmentet

és így megkaptuk a pN9. 2. 27 plazmidot, amely hordozza a pNCEMG1 plazmid gamma promóterét, a 9. 2. 27 ellenanyag nehéz lánc variábilis régióját kódoló gént, az emberi gamma lánc konstans régióját kódoló gént és a neomicin rezisztenciát biztosító gént. A pN9. 2. 27G1 plazmid restrikciós helyeit és funkcióinak térképét a csatolt rajzok közül a 12. ábrán mutatjuk be. A bemutatott DNS konstrukciók, amelyek a rekombináns 9. 2. 27 immunglobulinokat és azok származékait kódolják, elsősorban olyan vektorok előállítására alkalmasak, amelyek emlős vagy egyéb eukarióta sejtekbe transzformálva, ott expresszálnak a különböző ellenanyagláncokat. Számos emlős gazdasejt rendelkezik a találmányban leírt különböző ellenanyag láncok végein található szignálpeptidek felismeréséhez és megfelelő kezeléséhez szükséges sejten belüli mechanizmusokkal. Néhány emlős gazdasejt az ellenanyag molekuláknál megfigyelt olyan poszt-transzlációs módosításokra is képes, mint például a glikozilálás. Az eukarióta gazdasejtek transzformálására szolgáló, és az alábbi példákban bemutatandó vektorok széles körével nem kívánjuk korlátozni a jelen szabadalmi leírás körét.

A találmány különböző expressziós vektorai transzformálhatók a különböző eukarióta, különösen az emlős gazdasejtekbe és ott expresszálnak is. Az expressziós vektorok hordozzák azokat a szekvenciákat is, amelyek lehetővé teszik a replikációjukat E. coli-ban is. Az ellenanyagok expressziója azokban a gazdasejtekben valósul meg, ahol az ellenanyag struktúrgénjével összekapcsolt promóter működik. A szakemberek számára nyilvánvaló, hogy

a találmány különböző ellenanyag láncainak expresszáltatására az eukarióta gazdasejtek széles köre használható. Az SP2/0-Ag14 sejtvonal egy mieloma sejtvonal, amely rendes körülmények között nem választ ki ellenanyagot.

Az SP2/0 sejtvonal a pG9. 2. 27K és pN9. 2. 27G1 vektorokkal történt transzfektálást követően 9. 2. 27 kiméra ellenanyagot választ ki a tápközegbe. Részkísérletek, melyekben a szekretáló sejtek konverzióját követtük nyomon a szérummentes táptalajban, mutatták, hogy az ellenanyagok még a $15\mu\text{g/ml}/10^6$ sejt szinten is expresszáldhatnak. Mialatt az SP2/0 gazdasejtek a leginkább használatosak a találmány vektorainak expresszáltatására, a szakemberek jól tudják, hogy a sejteknek ezen kívül még széles választéka használható a jelen szabadalmi leírás bifunkcionális kiméra ellenanyagainak és származékaiknak expressziójára. A találmányban használt gazdasejtek transzformálhatók a szakterületen jól ismert, különböző standard transzfekciós eljárásokkal. Az alkalmazható, standard transzfekciós eljárások közé tartoznak az elektroporációs módszerek, a protoplaszt fúzió és a kalcium-foszfátos kicsapási technikák. Ezeket a technikákat már leírták Toneguzzo, F. és munkatársai a Mol. and Cell. Biol., 6:703-706 (1986); Chu, G. és munkatársai a Nucleic Acid Res., 15:1311-1325 (1986); Rice, D. és munkatársai a Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7862-7865 (1979); és Oi, V. és munkatársai a Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:826-829 (1983) megjelent közleményekben.

A találmány szerinti kiméra konstrukciókat tartalmazó rekombináns expressziós vektorokat egymás után transzfektáltuk a gazdasejtekbe. Először a kappa lánc konstrukcióit tartalmazó expressziós vektort transzfektáltuk a gazdasejtekbe és a kappa láncot expresszáló transzformált gazdasejteket a szakterületen jól ismert eljárásokkal kiválogattuk. A nehéz lánc génjeinek konstrukcióit tartalmazó vektorokat ezt követően transzfektáltuk a kiválogatott gazdasejtekbe. Az is látható azonban, hogy a nehéz és könnyű láncok konstrukciói egyszerre és fordított sorrendben is bevihetők a gazdasejtekbe. Egy másik lehetőség, hogy a nehéz és könnyű láncok kombinációját egyetlen expressziós vektor tartalmazza, vagy a két DNS linearizálható és együtt ligálható közvetlenül a transzformálás előtt. A transzfekciót és a szelekciót követően vizsgálatokat végeztünk a CEP elleni ellenanyag kimutatására és a találmány 9. 2. 27 kiméra ellenanyagát expresszáló, transzformált sejtek azonosítására. Ilyen vizsgálatokat Bumol és munkatársai közöltek a Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:1245-1249 és a J. Biol. Chem., 259:12733-12741 közleményeikben amelyekre a leírásunkban hivatkozunk.

A gének expressziója után a transzfektált gazdából az érett 9. 2. 27 ellenanyagok a sejtek felülűszójába kerülnek. Mivel több, rekombináns DNS technikával előállított ellenanyag nem kívánatos heterogenitást mutat (az idegen amino savakból, vagy néhány gamma lánc C-terminális régióján megjelenő aminosavakból eredően) a tápfolyadékot összegyűjtöttük és karboxipeptidáz ol-

dattal kezeltük. A 9. 2. 27 kiméra ellenanyag ezután a szakterületen jól ismert technikák szerint tisztítható.

A szabadalmi leírásban bemutatott DNS szekvenciáknak és plazmidoknak számos variációja és módosított formája létezhet. Például a genetikai kód degeneráltsága lehetővé teszi nukleotidok kicserélődését a polipeptidet kódoló régió teljes hosszában. Ilyen szekvenciák levezethetők a 9. 2. 27 ellenanyag jelenleg ismert aminosav vagy DNS szekvenciájából és előállíthatók a hagyományos szintetizálási eljárásokat követve. Ilyen szintetizálási módszer alkalmazható Itakura és munkatársai, Science, 198:1056 (1977) valamint Crea és munkatársai Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978) közleményeiben leírt eljárások következetes megvalósításával. Továbbá a szintetikus gének és linkerek szintetizálhatók akár a Systec 1450A (Systec. Inc., 3826 Chandler Drive, Minneapolis, MN) akár az ABS 380A (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) DNS-szintetizátor segítségével. Több más DNS szintetizáló készülék is ismert a szakterületen és azok is használhatók a szintetikus fragmentek előállítására.

Ezért a találmány semmiképpen sem korlátozódik a példákban specifikusan megadott DNS szekvenciákra és plazmidokra.

A szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a találmány expressziós vektorait eukarióta gazdasejtek transzformálására használjuk és a kapott transzformánsok a különböző könnyű és nehéz láncokat alkotó polipeptideket a gazdasejtek expresszálják.

Amennyiben a gazdasejtet egy olyan vektorral transzformáljuk, amely tartalmaz egy, a gazdasejtben működő és az immunglobulin struktúrgének transzkripcióját irányító promótert, és ha a gazdasejt rendelkezik a szignálpeptidek fölismeréséhez szükséges sejtmechanizmusokkal, akkor az így lérehozott sejtek kiválasztják az érett ellenanyagokat vagy ellenanyag láncokat. Más körülmények között, amikor az immunglobulinoknak csak a könnyű láncait expresszálja a gazdasejt, ezeket a könnyű láncokat magából a gazdasejtből kell izolálni.

Amint azt fõntebb állítjuk a találmány szerinti vektorok, módszerek, transzformánsok és ellenanyagok jelentős hatással vannak a rák elleni küzdelemre. A 9. 2. 27 monoklonális ellenanyag egy hatásos szer az emberi melanóma felismerésében prognosztizálásában és a kezelésében. Biokémiai és immunológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a 9. 2. 27 ellenanyag rekombináns, kiméra molekulái ugyanolyan antigén elleni aktivitással rendelkeznek, mint a hibridóma sejtekből származó 9. 2. 27 molekulák.

Bár a murin ellenanyagok használatánál van egy probléma, mégpedig az, hogy ezek az ellenanyagok emberben gyakran meg nem engedett immunológiai válaszokat váltanak ki. Ez a probléma megkerülhetõ ezen találmány kiméra ellenanyagainak alkalmazásával. Ha a 9. 2. 27 ellenanyag konstans régióját egy emberi eredetű konstans régióra cseréljük föl akkor a kezelt beteg immunrendszere a kiméra ellenanyagot sajátjaként ismeri fel. Továbbá az emberi konstans régió használata segítséget nyújt a komplement

rendszer és egyéb sejtmechanizmusok aktiválásához.

Szakemberek számára nyilvánvaló, hogy a 9. 2. 27 ezidáig ismeretlen aminosav és DNS szekvenciái használhatóak új alacsonyabb vagy magasabb affinitású származékok előállítására. Az ellenanyag különböző részei kiejthetők vagy mutáltathatók új ellenanyagok készítése érdekében vagy az egyik lánc bármely darabja fölcserélhető egy másik láncból származó darabbal. Röntgen kristallográfiás vizsgálatok ki fogják mutatni, hogy az ellenanyagnak mely aminosav származékai jelennek meg azon antigén epitópjainak közvetlen közelében, amelyhez a 9. 2. 27 kötődik. Fehérje tervezési módszerek alkalmazásával a 9. 2. 27 módosítható olyan "tervezett" ellenanyaggá, amely a rákos betegek szervezetében megváltozott affinitást mutat a sejtfelszíni antigénnel szemben.

A következő példák részletesen ismertetik a találmányt. A példákban leírjuk a találmány konstrukcióit eredményező eljárásokat és az eljárásokhoz kapcsolódó magyarázatokat a megfelelő helyeken közöljük. Mivel az itt közzétett aminosav és nukleinsav szekvenciák tartalmazzák a 9. 2. 27 kiméra ellenanyag összeállított alkotórészeit érthető, hogy a szekvenciák csekély változtatásai az antigén kötőhely változatlanul hagyását eredményezhetik a variábilis régió belül.

1. Példa

A pMLCE-10 plazmid izolálása

A E. coli K12 HB101/pMLCE-10 törzs liofolizált tenyészetét az American Type Culture Collection-től kaptuk (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852), raktári száma ATCC 67639 (a letétbe helyezés időpontja: 1988 március 1). A liofilizált tenyészetet 10ml folyékony LB táptalajt (10g Bacto-tripton, 5g Bacto élesztő kivonat és 10g NaCl literenként, pH=7.5) tartalmazó csövekbe öntöttük és két órán át inkubáltuk 37°C-on, majd 50 µg/ml ampicillint tartalmazó táptalajban éjszakán át folytattuk az inkubálást ugyancsak 37°C-on. A pMLCE-10 plazmid tartalmazza az emberi karcinoembrionális antigént felismerő CEM231. 6. 7 monoklonális ellenanyag könnyű láncának variábilis régióját kódoló gént.

A reggelre fölnőtt baktérium tenyészetből egy keveset 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB-lemezre (LB-folyadék plusz 15 g/l Bacto-agar) kentünk és a szokásos módon izoláltuk az E. coli K12 HB101/pMLCE-10 különálló telepeit. Egy ilyen telepet 10 ml, 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajba inokuláltunk és erős rázatás mellett éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Az így kapott tenyészetet 500 ml LB táptalajba (plusz 50 µg/ml ampicillin) tovább oltottuk és 37°C-on folytattuk az inkubálást mindaddig amíg a tenyészet el nem érte a stacionári növekedési fázist.

A következő eljárást Maniatis és munkatársai által 1982-ben a Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory) című kézikönyvben leírt módszer szerint végeztük. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (4000 g, 10 perc, 4°C) és a felülúszót leöntöttük. A leülepitett sejteket 100 ml jéghideg STE-pufferben (0.1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH=7.8; és 1 mM EDTA) mostuk. A mosás után a sejteket 10 ml 5 mg/ml lizozimot tartalmazó 1-es oldatban (50 mM glükóz; 25 mM Tris-HCl, pH=8.0; és 10 mM EDTA) szuszpendáltuk fel és szobahőmérsékleten hagytuk 10 percig. Húsz ml 2-es oldatot adtunk a lizozimmal kezelt sejtekhez és óvatos forgatással összekevertük az elegyet. Ezt a keveréket 10 percig inkubáltuk jégen.

Ötven ml jéghideg 5 M kálium acetátot, pH=4.8 adtunk a lizált sejteket tartalmazó elegyhez és forgatással összekevertük majd 10 percig jégen inkubáltuk. Az 5 M kálium acetát oldatot 60 ml kálium acetát, 28.5 ml víz és 11.5 ml jégcet összekeverésével állítottuk elő; az így keletkezett oldat 3 M-os volt a káliumra és 5 M-os az acetátra nézve.

A föltárt sejteket lecentrifugáltuk Beckmann SW27 (vagy ezzel ekvivalens) rotorban 20000 ford./perc sebességgel, 10 percig, 4°C-on. A kromoszómális DNS-t és a sejttörmelékét tartalmazó csapadék a cső falára tapadt. A felülúszó 36 ml-éhez 0.6 térfogatnyi izopropanolt adtunk, jól összekevertük és szobahőmérsékleten hagytuk 15 percig. A plazmid DNS-t centrifugálással gyűjtöttük össze (12000 g, 30 perc, szobahőmérsékleten). A felülúszót

előntöttük és a csapadékot 70%-os etanollal mostuk szobahőmérsékleten. A mosó alkohol leöntése után a csapadékot vákum-exikkátorban szárítottuk. Ezután a csapadékot 8 ml TE-pufferben (10 mM Tris-HCl, pH=8.0; 1 mM EDTA) fölszuszpendáltuk.

Nyolc gram CsCl-ot adtunk a DNS-oldathoz. Körülbelül 0.8 ml 10 mg/ml koncentrációjú etídium-bromid oldatot tettünk a CsCl-DNS oldat minden 10 ml-éhez. Az oldat végső sűrűsége körülbelül 1.55 g/ml, az etídium-bromid koncentrációja pedig 600 μ g/ml volt. Ezt az oldatot átöntöttük Beckman Type 50 típusú ultracentrifuga csőbe, tetejéig töltöttük parafin olajjal, lezártuk és 450000 ford./perc sebességgel 20°C-on centrifugáltuk 24 órán át. A centrifugálás után két DNS csík volt látható normál fényben. A cső tetejének eltávolítása után az alsó DNS csíkot leszívattuk a cső falán átszűrt injekciós tű és fecskendő segítségével.

Az etídium bromidot néhányszor ismételt vízzel telített 1-butanollal végzett extrakcióval távolítottuk el. A CsCl sőt TE-pufferben, dialízissel távolítottuk el. Fenollal majd kloroformmal végzett extrahálás után a DNS-t kicsaptuk, 70%-os etanollal mostuk és szárítottuk. Körülbelül 1 mg pMLCE-10 plazmid DNS-t kaptunk, melyet 4 °C-on tároltunk TE-pufferben ~1 μ g/ μ l koncentrációjú oldat formájában. A pMLCE-10 plazmid funkcióit és restrikciós helyeit bemutató térképet a csatolt rajzok közül az 1. ábrán mutatjuk be.

2. Példa

A pMLCE-10 plazmid készítése

Körülbelül 10 μ l, az első példában preparált pMLCE-10 plazmid DNS-t összekevertünk 20 μ l 10 X HindIII restrikciós pufferrel (500 mM NaCl; 500 mM Tris-HCl, pH=8.0; 100 mM MgCl₂; és 10 mM DTT), 20 μ l 1 mg/ml BSA oldattal, 5 μ l HindIII restrikciós enzimmal (~50 Unit, ahogyan azt a Bethesda Research Laboratories (BRL) meghatározta, egyébként valamennyi a találmányban használt restrikciós enzim innen származik), és 145 μ l vízzel és a kapott reakció elegyet 37°C-on inkubáltuk két órán keresztül. Az enzim reakciót rutinszerűen fenol majd kloroformos extrahálással állítottuk le, amit a DNS kicsapása, alkoholos mosása és felszuszpendálása TE-pufferben követett. A HindIII emésztés fenti módon leírt leállítása után a HindIII-emésztett pMLCE-10 plazmid DNS-t kicsaptuk és 5 μ l TE-pufferben folszuszpendáltuk.

A pMLCE-10 plazmid megközelítően 3.8kb méretű HindIII fragmentjét, amely tartalmazza a CEM 231. 6. 7 belső variábilis kappa régióját izoláltuk a pMLCE-10 plazmid HindIII-mal emésztett DNS-ének elektroforézise után. Az elektroforézist 0.75% agarózt és 0.5 μ g/ml etídium bromidot tartalmazó TBE gélen 30 V feszültséggel egy éjszakán át végeztük. UV-fényben történt fényképezést követően a ~3.8kb-nyi HindIII fragmentet DEAE 81 papírra (Schleicher és Schuell, Keene, New Hampshire) futtattuk, amit 1 M NaCl-

dal végzett eluálás és alkoholos kicsapás követett. Az eluált fragmentet ezután 5 μ l TE-ben fölszuszpendáltuk.

A liofilizált E. coli K12 HB101/pHKF-1 az ATCC-től származik, ahol az ATCC 67637 raktári szám alatt található (a letétbe helyezés napja 1988. március 1.). A pHKF-1 plazmidot, amely tartalmazza az emberi kappa konstans régiót kódoló gént az 1. Példá-ban leírt módszer következetes alkalmazásával izoláltuk az E. coli K12 HB101/pHKF-1 tenyészetéből. A pHKF-1 plazmid funkciót és restrikciós helyeit bemutató térképet a csatolt rajzok közül a 2. ábrán mutatjuk be.

Egy mikrogram pHKF-1 plazmid DNS-t megemésztettünk HindIII restrikciós enzimmel és a linearizált plazmidot agaróz gélből visszaizoláltuk és tisztítottuk, ahogyan azt föntebb tanítottuk.

Körülbelül 1 μ g (2 μ l) ~3.8kb méretű, pMLCE-10-ből izolált HindIII restrikciós fragmentet ligáltunk körülbelül 600 ng (0.5 μ l) HindIII-mal emésztett pHKF-1 plazmidba 2.5 μ l 10X ligáz puffer (300 mM Tris-HCl, pH=7.6; 100 mM MgCl₂ és 50 mM DTT), 2.5 μ l 1 mg/ml BSA oldat, 7 μ l 5 mM ATP, 2.5 μ l (kb. 2.5 egység a P-L Biochemicals alapján) T4 DNS-ligáz és 18 μ l víz keverékében. Ezt az elegyet 12°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A ligált DNS képezte a tervezett pHKCE-10 plazmidot.

3. Példa

Az *E. coli* K12 HB101/pHKCE-10 törzs előállítása

Az *E. coli* K12 HB101 törzs liofilizált formában megkapható a Northern Regional Research Laboratories-től Peoria, Illinois, raktári száma NRRL B-15626 (a letétbe helyezés időpontja 1983 szeptember 28.). A liofilizált kultúrát fölélesztettük, különálló telepeket izoláltunk és egy éjszakán át növesztett 10 ml-nyi HB101 tenyészetet készítettünk az 1. Példában leírt módon, azzal a különbséggel, hogy a tápfolyadékban nem használtunk ampicillint.

Ötven μ l tenyészetet használtunk arra, hogy inokuláljunk 5 ml LB folyadékot, ami 10 mM MgSO_4 -ot és 10 mM MgCl_2 -ot is tartalmazott. Egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on erősen rázatva. A következő reggelen 200 ml-re hígítottuk a tenyészetet 10 mM MgSO_4 -ot és 10 mM MgCl_2 -ot tartalmazó LB tápfolyadékkal. A hígított kultúrát 37°C-on rázattuk amíg az 550 nm-en mért abszorban-
cia (A_{550}) el nem érte a 0.5 körüli értéket, ami 1×10^8 sejt/ml sejtsűrűséget jelentett. Ekkor 10 percig hűtöttük a tenyészetet jeges vízfürdőben, majd centrifugálással (4000 g, 10 perc, 4°C-on) összegyűjtöttük a sejteket. A sejtekből álló csapadékot felszuszpendáltuk hideg, 10 mM MgSO_4 oldatban és azonnal újra lecentrifugáltuk. Ezután újra felszuszpendáltuk 100 ml hideg, 30 mM CaCl_2 oldatban és jégen inkubáltuk 20 percig.

A sejteket centrifugálással ismét összegyűjtöttük, majd főluszuspendáltuk 10 ml 30 mM CaCl_2 -ban. Ebből a sejt szuszpenzióból másfél ml-t adtunk a 2. Példában készített ligált DNS-hez, amelyet előzőleg szintén 30 mM-os CaCl_2 -ban vettünk fel. A sejt-DNS keveréket jégen inkubáltuk fél óráig, 90 másodpercig hűsokkoltuk 42°C-on és ismét jégre tettük kb. két percre. Ezt a keveréket 10 ml LB-ben hígítottuk egy 125 ml-es palackban és egy óráig inkubáltuk 37°C-on. Egy század μl -nyi egységet ampicillint tartalmazó LB-agar lemezre kentünk és 37°-on inkubáltuk a telepek megjelenéséig. Egy másik lehetőség, hogy a DNS-t a kereskedelem-ben kapható (BRL, P.O.Box 6009, Gaithersburg, MD 20877) E. coli K12 HB101 kompetens sejtekbe transzformáljuk.

A telepeket külön fölnövesztettük és a különálló telepek plazmid DNS-eit restrikciós enzim analízissel és gélelektroforézissel vizsgáltuk. A plazmid DNS-t az 1. Példában leírt módon izoláltuk, de kisebb léptékben és a CsCL-grádiens lépést elhagytuk amíg a keresett E. coli K12 HB101/pHKCE-10 transzformánst meg nem találtuk. A pHKCE-10 plazmid funkciót és restrikciós helyeit tartalmazó térképet a csatolt rajzok közül a 3. ábrán mutatjuk be.

4. Példa

A pGCEMK plazmid készítése

Az emberi kappa konstans régió génjéhez kapcsolt murin kappa lánc variábilis régióját kódoló gént tartalmazó eukarióta expressziós vektort a pSV2gpt vektor fölhasználásával készítettük. A pSV2gpt bárki számára hozzáférhető az ATCC-től az ATCC-37145 raktári szám alatt. Körülbelül 1 μ g pSVgpt plazmid DNS-t a 2. Példa tanítása szerint megemésztettünk EcoRI restrikciós enzimmel, azzal a különbséggel, hogy 10X EcoRI puffert (500 mM NaCl; 1 M Tris-HCl, pH=7.5; 50 mM MgCl₂) használtunk emésztő pufferként. Etanolos kicsapás és tisztítás után az EcoRI végeket feltöltöttük 10 μ l, a dezoxiribonukleotidokat (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) 5 mM-os koncentrációban tartalmazó oldat, 2 egység Klenow enzim és 5 μ l 10X Klenow puffer (500 mM Tris-HCl, pH=7.5; 100 mM MgCl₂ és 10 mM DTT) hozzáadásával 50 μ l végtérfogatban. A reakciót 30 percig hagytuk lejátszódni szobahőmérsékleten, majd a keveréket fenol/kloroformmal extraháltuk, etanollal kicsaptuk a DNS-t és végül 5 μ l vízben újra feloldottuk.

Ezután a feltöltött vektorhoz hozzáadtuk a linkereket. A ClaI linkerek a d(pCATCCGATG) szekvenciát tartalmazzák és a NEB-től vásároltuk (Beverly, Massachusetts). Alternatív megoldásként a linkereket szintetizálhatjuk is a kereskedelemben megvásárolható készülékekkel, mint például az Applied Biosystems (850

Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) által forgalmazott foszforamidok kémiaját fölhasználó 380A DNS szintetizátor. DNS szintetizálásra szolgáló egyéb eljárások is ismertek a szakterületen. A hagyományos, foszfotriésztert módosító, egyszálú DNS szintézisére szolgáló módszert Itakura és munkatársai 1977-ben a Science 198:1056 valamint Crea és munkatársai 1978-ban a Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:5765 számában írtak le. További, különösen kedvelt DNS szintetizáló eljárás olvasható a Hsiung és munkatársai, 1983, Nukleic Acid Research 11:3227 valamint Narang és munkatársai, 1980, Methods in Enzimology 68:90 által írt publikációkban.

Körülbelül 2 μ g ClaI linkert kapcsoltunk egy 10 μ l 5X Kináz puffert (300 mM Tris-HCl, pH=7.8; 50 mM MgCl₂; 25 mM DTT), 5 μ l 5 mM ATP-t, 24 μ l H₂O-t, 0.5 μ l T4 polinukleotid kinázt (~2.5 egység a P-L Bichemicals meghatározása szerint), 5 μ l 1 mg/ml BSA-t, és 5 μ l 10 mM spermidint tartalmazó keverékben 30 perces 37°C-on végzett inkubálással. Körülbelül 12.5 μ l kapcsolt ClaI linkert adtunk kb. 500 ng EcoRI-gyel vágott és feltöltött pSV2gpt vektorhoz és a ligálási reakciót a 2. Példa tanításának megfelelően végeztük. A vektort elektroforizáltuk, DEAE 81 papírról visszaizoláltuk és tisztítottuk, majd önmagával ligáltuk és transzformáltuk E. coli HB101 sejtekbe a 3. Példa tanításának megfelelően. Az ampicillin rezisztens telepekből izolált plazmidokat ellenőriztük és a megfelelő ClaI restrikciós helyet tartalmazóak voltak a kívánt pSV2gpt-Cla plazmidok.

Körülbelül 1 μ g pSV2gpt-Cla plazmidot megemésztettünk a 2. Példába tanítása alapján, azzal a különbséggel, hogy ClaI és BamHI enzimeket használtunk, majd a megközelítőleg 4.5kb BamHI-ClaI restrikciós fragmentet agaróz gélből DEAE 81 papíron visszaizoláltuk és tisztítottuk. A pHKCE-10 plazmidot azonos módon megemésztettük, a 9kb BamHI-ClaI fragmentet visszaizoláltuk és tisztítottuk. Ezt a ~9kb méretű restrikciós fragmentet, amely tartalmazza az emberi kappa lánc konstans régiót kódoló génhez kapcsolt CEM 231. 6.7 ellenanyag murin kappa lánc variábilis régiónak a génjét, ligáltuk a pSV2gpt-Cla vektor körülbelül 4.5kb méretű ClaI-BamHI fragmentjébe. A ligált keveréket E. coli HB101-be transzformáltuk és az ampicillin rezisztens telepekből izolált plazmidokon ellenőriztük a megfelelő restrikciós hely meglétét. A megfelelő helyet tartalmazó plazmid volt a keresett pGCEMK. A pGCEMK plazmid funkcióit és restrikciós helyeit bemutató térképet a csatolt rajzok közül a 4. ábrán mutatjuk be.

5. Példa

A pHGCEM-30 plazmid készítése

A CEM 231. 6. 7 murin ellenanyag gamma variábilis régióját kódoló gént hordozó pMHCE-30 plazmid az E. coli K12 HB101/pMHCE-30 törzsből izolálható, amelyet az ATCC-nél 1988 március 1.-én helyeztünk letétbe és bárki számára hozzáférhető a ATCC 67640 raktári szám alatt. Az emberi gamma lánc konstans régióját kódoló gént hordozó pHG1Z plazmid az E. coli K12 HB101/pHG1Z törzsből izolálható, amelyet szintén letétbe helyeztünk 1988 március 1.-én az ATCC-nél és hozzáférhető az ATCC 67638 raktári szám alatt. A pMHCE-30 és pHG1Z plazmidok funkciót és restrikciós helyeit tartalmazó térképeket a csatolt rajzok közül az 5. és 6. ábrán mutatjuk be.

A murin variábilis nehéz lánc gént a következő módon kapcsoltuk az emberi gamma-1 génhez. Körülbelül 10 μ g pMHCE-30 plazmidot megemésztettünk ClaI restrikciós enzimmal (1 egység/ μ g DNS) majd ezután HindIII-mal részleges emésztést végeztünk, hogy megkapjuk a megközelítőleg 5.3kb méretű ClaI-HindIII restrikciós fragmentet, amely a nehéz lánc variábilis régió génjét hordozza. A részleges emésztést 0.1 egység/ μ g DNS adásával és mindössze 1 óra 37°C-on való inkubálással végeztük. Körülbelül 1 μ g, emberi gamma-1 gént tartalmazó pHG1Z plazmidot szintén megemésztettünk ClaI és HindIII enzimekkel. A pMHCE-30 plazmid 5.3kb

körüli restrikciós fragmentjét gélből és DEAE 81 papírról visszaizoláltuk a 2. Példában leírt módon. Az így kapott fragmentet ligáltuk a pHG1Z vektor ClaI-HindIII helyére 500 ng inszert és 200 ng emésztett vektor DNS fölhasználásával 10 μ l végtérfogatú ligáló elegyben a 2. Példa tanításának megfelelő módon. A kapott E. coli K12 HB101 transzformánsokból a plazmidok restrikciós térképeinek segítségével azonosítottuk a humán gamma-1 konstans régió génjéhez kapcsolt murin nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént tartalmazó plazmidokat, amelyek a kívánt pHGCEM-30 plazmidok voltak. A pHGCEM-30 plazmid funkciót és restrikciós helyeit tartalmazó térképet a csatolt rajzok közül a 7. ábrán mutatjuk be.

6. Példa

A pNCEMG1 plazmid készítése

A kiméra Ig gént beépítettük egy eukarióta expressziós vektorba a 4. Példában részletezett módon. Az alkalmazott vektor a pSV2neo plazmid volt, amely bárki számára hozzáférhető az ATCC-től az ATCC 37149 raktári szám alatt. Ehhez a vektorhoz a 4. Példa tanításának megfelelő módon kapcsoltuk a ClaI helyet és így jutottunk a pSV2neo-Cla plazmidhoz. 1 μ g körüli pSV2neo-Cla plaz-

mid DNS-t megemésztettünk ClaI és BamHI restriktációs enzimekkel 1 egység/ μ g DNS-t használva belőlük. A pHGCEM-30 plazmidot szintén teljesen megemésztettük ClaI restriktációs enzimmel BamHI enzimmel (0.1 egység/ μ g DNS) pedig részlegesen, hogy hozzájussunk a megközelítőleg 12.7kb méretű ClaI-BamHI restriktációs fragmenthez, amely tartalmazta a kiméra variábilis és gamma-1 régiókat kódoló géneket. Ezt a fragmentet DEAE 81 papíron izoláltuk és 10 μ l TE pufferben eluáltuk. A ligálást 50 ng vektor DNS és 400 ng ~12.7kb méretű inszert DNS felhasználásával végeztük 10X ligációs puffer, 10 mM ATP és T4 DNS ligáz enzim hozzájuk adásával 12°C-on egy éjszakán át a 2. Példa tanításának megfelelő módon. E. coli K12 HB101 sejteket transzformáltuk és restriktációs térképezéssel azonosítottuk a kívánt pNCEMG1 plazmidot. A pNCEMG1 plamid funkciót és restriktációs helyeit tartalmazó térképet a csatolt rajzok közül a 8. ábrán mutatjuk be.

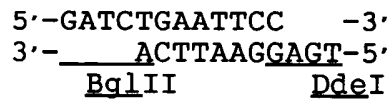
7. Példa

A pG9. 2. 27K plazmid készítése

A pTZK910 plazmid hordozza a 9. 2. 27 kappa variábilis régiót kódoló gént a pTZ18U plazmidba építve. A pTZK910 plazmid izolálható az E. coli K12 JM109/pTZK910 az NRRL-nél 1989. április 7.-én letétbe helyezett törzsből, amely az NRRL B-18478-as rak-tári számon bárki számára hozzáférhető. A pTZK910 plazmid funkci-óit és restrikciós helyeit tartalmazó térképet a csatolt rajzok közül a 9. ábrán mutatjuk be. A pTZK910 plazmidot az 1. Példa ta-nításában leírt módon tisztítottuk, azután ebből izoláltuk a 9. 2. 27 kappa variábilis régiót kódoló gént , hozzákapcsoltuk a linkereket és így beépítettük a pGCEMK expressziós vektorba.

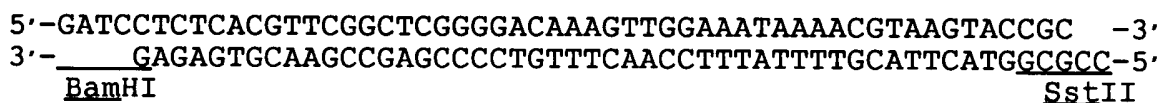
Körülbelül 2 μ g pTZK910 plazmid DNS-t a 2. Példában le-írt módon megemésztettünk azzal az eltéréssel, hogy a DdeI rest-rikciós enzimet és a hozzá való 10X DdeI puffert (1.5 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH=7.5; 60 mM MgCl₂) használtuk. A következő lé-pésben a DdeI-gyel emésztett plazmidot tisztítottuk és BamHI restrikciós enzimmal megemésztettük 10X BamHI puffert (1.5 M NaCl; 60 mM Tris-HCl, pH=7.5; 60 mM MgCl₂) használva. A plazmidot ezután elektroforézis gélen mgfuttattuk, DEAE 81 papírt használva izoláltuk és tisztítottuk a megközelítőleg 357bp hosszú DdeI-BamHI restrikciós fragmentet, amely tartalmazza a 9. 2. 27 kappa variábilis régióját kódoló gén többségét.

A pTZK910 plazmid DdeI-BamHI fragmentjének expressziós vektorba történő ligálásának megkönnyítése érdekében egy linker-készletet készítettünk. Az oligonukleotidokat a tudományterületen jól ismert eljárásokkal állítottuk elő és a 4. Példában ezt le is írtuk. Először elkészítettünk egy olyan linkert, amely az egyik végén BglII felismerő helyet, a másik végén DdeI felismerő helyet tartalmaz és a következő nukleotid szekvenciából áll:



A két szálát külön szintetizáltuk majd mindkettőből körülbelül 100 pmólt összekevertünk 5 μ l TE pufferben, fölmelegítettük 70°C-ra és egy éjszakán át hagytuk lassan lehűlni 12°C-ra, hogy a szálak önmaguktól összekapcsolódjanak.

Hasonló módon szintetizáltunk egy másik linkert is ami az 5' végén BamHI hellyel a 3' végén pedig egy SstII hellyel rendelkezik. Ez a linker tartalmazza a 9. 2. 27 kappa variábilis régió NH₂ terminális végének 15 aminosavát kódoló szekvenciát plusz egy eukarióta splicing-helyet. A linker szekvenciája:



Mindkét szálból körülbelül 100 pmólt összekapcsoltunk, azután ezt a BamHI-SstII linkert, az összekapcsolt BglII-DdeI linkert és kb. 0.5 μ g-ot a pTZK910 plazmid DdeI-BamHI fragmentjéből összeligáltunk a 4. Példa tanításának megfelelő módon. A ligálást követően az elegyet BglII és BamHI enzimekkel kezeltük. Az ily módon ka-

pott 420bp-nyi BglII-SstII restrikciós fragmentet, amely a 9. 2. 27 kappa variábilis régiót kódoló szekvenciát hordozza, a 2. Példa tanításának megfelelően gélből tisztítottuk.

Körülbelül 1 μ g pGCEMK plazmidot megemésztettünk BglII és SstII restrikciós enzimekkel és a nagy vektor-fragmentet gélből tisztítottuk. Ez a vektor tartalmazza a humán kappa lánc konstans régiójának a génjét és a gpt rezisztencia gént, de nincs rajta a CEM kappa variábilis régióinak a génje. A 9. 2. 27 variábilis régiót hordozó ~420bp méretű BglII-SstII restrikciós fragmentet beligáltuk a BglII/SstII emésztett pGCEMK plazmidba. A transzformálást és a visszaizolálást követően azok a plazmidok, amelyek a megfelelő restrikciós helyeket tartalmazták a kívánt pG9. 2. 27K plazmidok voltak. A pG9. 2. 27K plazmid funkciót és restrikciós helyeit tartalmazó térképet a csatolt rajzok közül a 10. ábrán mutatjuk be.

8. Példa

A pN9. 2. 27G1 plazmid készítése

A. A pNCEMG1ANAB2AS2 plazmid készítése

Annak érdekében, hogy megvalósítsuk a 9. 2. 27 kiméra gamma-1 gén expresszióját eukariótában először egy NotI helyet, kettő BamHI helyet és kettő SalI helyet kellett eltávolítanunk a pNCEMG1 plazmidból. Körülbelül 1 µg pNCEMG1 plazmid DNS-t megemésztettünk NotI restrikciós enzimmal 10X NotI puffert (1.5 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH=7.9; 100 mM MgCl₂) használva. Etanolos kicsapás után a NotI végeket föltöltöttük 10 µl a dTTP, dGTP, dCTP és dATP nukleotidokat 5 mM koncentrációban tartalmazó elegy, két egység Klenow enzim és 5 µl 10X Klenow puffer (0.5 M Tris-HCl, pH=7.5; 0.1 M MgCl₂ és 10 mM DTT) hozzáadásával 50 µl reakció térfogatban. 30 perc után a reakciót fenol/kloroform extrakcióval leállítottuk, és ligált DNS-t E. coli K12 HB101-be transzformáltuk. A plazmidok, amelyek a NotI hely, ami tulajdonképpen a struktúrgén 5'vége, delécióját mutatták a pNCEMG1AN plazmidok voltak.

A fentiekhez hasonló módon, a pNCEMG1AN plazmidot részlegesen megemésztettük BamHI restrikciós enzimmal, azután Klenowval kezeltük, hogy kiejtsük a plazmidon található két BamHI helyet. A random plazmidok transzformációja és visszaizolálás után

a CEM struktúrgén 5' végén levő egyik BamHI hely és a humán kappa-1 gén és a neomicin rezisztenciát biztosító gén között lévő másik BamHI hely delécióját mutató plazmidok a kívánt pNCEMG1 Δ N Δ B2 plazmidok. Meg kell jegyeznünk, hogy a pNCEMG1 Δ N Δ B2 plazmidon még maradt egy BamHI hely közvetlenül a CEM variábilis réginak a 3' végénél.

Végül a pNCEMG1 Δ N Δ B2 plazmidon közvetlenül az emberi gamma 1 gén 5' végénél található két SalI helyet távolítottuk el. Körülbelül egy mikrogram pNCEMG1 Δ N Δ B2 plazmidot emésztettünk SalI restrikciós enzimmal, aután Klenow-val kezeltük, hogy kiejtsük a SalI helyeket. A plazmidok transzformálása és visszaizolálás után azok, amelyek a két SalI hely delécióját mutatták a kívánt pNCEMG1 Δ N Δ B2 Δ S2 plazmidok voltak.

B. A pN9. 2. 27G1 plazmid készítése

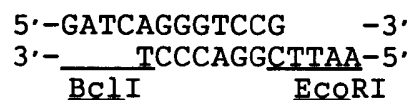
A pG4G21 plazmid a pGEM4 plazmidba beépített 9. 2. 27 gamma variábilis régiót kódoló gént hordozza. A pG4G21 izolálható az E. coli K12 DH5/pG4G21, 1989. április 7.-én letétbe helyezett törzsből, amely bárki számára hozzáférhető az NRRL B-18479 rak-tári szám alatt. A pG4G21 plazmid funkcióit és restrikciós helyeit bemutató térképet a csatolt rajzok közül a 11. ábrán szemléltetjük. Az 1. Példa tanítása szerint izoláltuk a pG4G21 plazmi-

dot, azután ebből a 9. 2. 27 gamma variábilis régiót kódoló gént izoláltuk, hozzáadtuk a linkereket és beépítettük a pNCEMG1ANAB2AS2 expressziós vektorba.

Körülbelül 2 µg pG4G21 plazmidot emésztettünk a 2. Példa tanításának megfelelő módon azzal az eltéréssel, hogy EcoRI restriktációs enzimet és 10X EcoRI puffert használtunk. A következő lépésben az EcoRI-gyel emésztett plazmidot tisztítottuk és MaeIII restriktációs enzimmel megemésztettük 10X MaeIII puffert használva. A plazmidból elektrofézis után DEAE 81 papírral izoláltuk a megközelítőleg 421bp méretű EcoRI-MaeIII restriktációs fragmentet, amely tartalmazta a 9. 2. 27 gamma variábilis régiót kódoló gén többségét.

Hogy megkönnyítsük a pG4G21 plazmid EcoRI/MaeIII fragmentjének expressziós vektorba történő klónozását néhány linkert készítettünk. A egyik végén BclI helyet a másik végén EcoRI helyet tartalmazó linkert szintetizáltunk, a szálait összekapcsoltuk és az EcoRI/MaeIII restriktációs fragmenthez ligáltuk a 7. Példa tanítása szerint.

A linker szekvenciája:



Hasonló módon szintetizáltunk egy másik linkert, amelyik az 5' végén egy MaeIII, a 3' végén egy BamHI hellyel rendelkezik. Ez a linker tartalmazta a 9. 2. 27 gamma variábilis régió NH₂ terminális végének 5 aminosavát plusz egy eukarióta splicing-helyet.

A szekvenciája a következő:

```

5'-GTCACCGTCTCCTCAGGTAAG      -3'
3'-_____GCAGAGGAGTCCATTCTAG-5'
      MaeIII                      BamHI

```

A linker szálait összekapcsoltuk, azután ezt a MaeIII-BamHI linkert, az összekapcsolt EcoRI-MaeIII linkert és a körülbelül 0.5 μ g pG4G21-ből származó EcoRI-MaeIII restrikciós fragmentet összeligáltuk 4. Példa tanításának megfelelően. A ligálást követően az elegyet BclI és BamHI restrikciós enzimekkel kezeltük, azután a megközelítőleg 462bp-nyi BclI-BamHI restrikciós fragmentet gélből tisztítottuk a 2. Példa tanításának megfelelően. Ez a restrikciós fragment tartalmazta a 9. 2. 27 gamma variábilis régiót kódoló szekvenciát.

BclI és BamHI enzimekkel megemésztettünk körülbelül 1 μ g pNCEMG1 Δ N Δ B2 Δ S2 plazmid DNS-t és a vektort gélből tisztítottuk. Ez a vektor tartalmazta a neomicin rezisztenciát biztosító gént és az emberi gamma 1 konstans régió génjét, de nincs rajta a CEM gamma variábilis régió génje. A körülbelül 462bp nagyságú 9. 2. 27 gamma variábilis régió génjét tartalmazó BclI-BamHI restrikciós fragmentet beligáltuk a BclI/BamHI emésztett pNCEMG1 Δ N Δ B2 Δ S2 plazmidba. A transzformálást és visszaizolálást követően a megfelelő restrikciós helyeket mutató plazmidok a kívánt pN9. 2. 27G1 plazmidok. A pN9. 2. 27G1 plazmid funkciót és restrikciós helyeit tartalmazó térképet a csatolt rajzok közül a 12. ábrán mutatjuk be.

9. Példa

A kiméra 9. 2. 27 ellenanyag expressziója eukarióta sejtekben

A kiméra könnyű lánc gén transzfektálálása a pG9. 2. 27K kiméra konstrukcióval

A transzfektálásra használt könnyű lánc immunglobulin plazmid, amint azt a 7. Példában leírtuk, a pG9. 2. 27 plazmid. A kiméra variábilis könnyű lánc (V_k) génjét a humán kappa génhez kapcsolva hordozó pG9. 2. 27 plazmidot először az SP2/0 hibridóma sejtekbe transzfektáltuk elektroporációs technikákkal, úgy ahogyan azt Toneguzzo és munkatársai, (1986) Molecular and Cellular Biology 6:703, Chu és munkatársai, (1987) Nucleic Acid Research 15:1311 leírták. A kiméra gének recipiense az SP2/0-Ag14 hibridóma sejt. Az SP2/0-Ag14 sejtek bárki számára hozzáférhetőek az ATCC-től az ATCC CRL 1581 raktári szám alatt. Az SP2/0-Ag14 sejtek 5% FCS-t tartalmazó táptalajban nőnek és három napig a logaritmus növekedési fázisban tartva végrahajtható az elektroporáció. Húsz mikrogram pG9. 2. 27 plazmid vektort PvuI (1 egység/ μ g DNS) restriktációs enzimmel linearizáltunk PvuI puffert használva (Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland). A transzfekció előtt az SP2/0 sejteket összegyűjtöttük IEC klinikai centrifugán végzett centrifugálással (10 perc szobahőmérsékleten). Ezután a sejteket

háromszor mostuk 6 mM dextróz tartalmú Hanks féle pufferelt sóoldatban (Gibco Laboratories, Grand Island, New York) és újra szuszpendáltuk az egészet, úgy hogy a sejtsűrűség 3.0×10^7 sejt/ml legyen. 0.3 ml-es egységeket (1×10^7 sejt) kiveszünk és a küvétában hozzáadjuk a linearizált DNS-t. Ezt a keveréket 10 percig jégen tartjuk. Az elektroporációt 0.8 mm-es elektróddal (P/N 472) és a BTX 100 Transzfektorral (BTX, Inc. San Diego, CA.) végeztük 3 impulzus, 100 μ sec. 300 V feszültség beállítása mellett. Az elektroporált sejteket táptalajban szuszpendáltuk 2×10^5 sejt/ml sűrűségekre és így tartottuk 72 órán át 37°C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett T75-ös csövekben. Ezután a sejteket 24 helyes lemezre szétraktuk 4×10^4 sejt/ml-es sűrűséggel; a pG9. 2. 27 plazmidot tartalmazó SP2/0 sejteket a Sigmától (St. Luis, Missouri) beszerezhető 1 μ g/ml-es HMAX 1.0 médiumba (50 ng/ml Hipoxantin; 250 ng/ml mikofenol sav; 50 μ g/ml Xantin) tettük át. 200 μ l felülúszót összegyűjtöttünk minden HMAX rezisztens kolóniát tartalmazó mintahelyből. Ezt a felülúszót megvizsgáltuk az emberi kappa konstans régió génjének a jelenlétére, ami jelzi a pG9. 2. 27 plazmidon lévő gének expresszióját.

B. A kiméra 9. 2. 27-et kiválasztó SP2/0 sejtek azonosítása

A humán kappa gént expresszáló, transzfektált SP2/0 sejteket a standard ELISA-teszttel (ezyme-linked immunosorbent assay) azonosítottuk ahogyan azt Engvall, E. és Perlmann, P., Immunochemistry, 8:871-874 (1971) közleményükben az emberi kappa láncra leírták.

A tesztnek az volt a célja, hogy azonosítsuk vele azokat a sejteket, amelyek szekretálják az emberi kappa 1 génhez kapcsolt, és a 9. 2. 27 murin hibridóma sejtekből izolált murin variábilis régióból összeállított pG9. 2. 27 plazmid által kódolt polipeptidet. Tíz mM nátrium foszfát oldatból (pH=7-8) készítettünk 5 µg/ml koncentrációjú, kecskéből izolált humán kappa lánc ellenanyag (Tago # 4106) oldatot. A 96 helyet tartalmazó lemez valamennyi helyére tettünk 50 µl-t ebből az oldatból. Azután a lemezt 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd átöblítettük vízzel és PBS+0.1% Tween (w/v) oldattal. A felülúszóból ötven µl-t adtunk valamennyi mintahelyre és két órát inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ismét átöblítettük a lemezt a fentebb részletezett módon. A kecske emberi kappa lánc elleni ellenanyag alkalikus foszfatáz konjugátumát (Tago # 2496) 1:1000-re hígítottuk ugyanabban a felülúszóban. Mintahelyenként 100 µl-t adtunk és egyóráig hagytuk állni szobahőmérsékleten. Az alkalikus foszfatáz szubsztrátját a csomagon levő útmutatás alapján készítettük; egy tabletát oldottunk 3 ml desztillált vízben és ennek a szubsztrátnak

150 μ l-ét tettük a mintahelyekre, majd 30 percig inkubáltuk 37°C-on. A reakciót 50 μ l 300 mM EDTA hozzáadásával állítottuk le és 405 nm-en megmértük az abszorpciókat. A kappa expresszió legmagasabb értékeit mutató felülűszókat azonosítottuk és a sejteket a megfelelő helyekről tovább vittük, hogy bejuttassuk a pN9. 2. 27G1 kiméra konstrukciót.

C. A kiméra kappa láncot termelő sejtek transzfekciója a pN9. 2. 27 kiméra nehéz lánc konstrukcióval

A 8. Példában részletezett konstrukcióból származó pN9. 2. 27 nehéz lánc immunglobulint kódoló plazmidot használtuk az SP2/0 sejtek transzfektálására. A kiméra 9. 2. 27-humán kappa láncot expresszáló sejtek populációját elektroporáltuk a kiméra 9. 2. 27 nehéz lánc gént hordozó plazmid konstrukcióval. A kiméra kappa láncot termelő SP2/0 sejtek (SP2/0-K) elektroporációjához a logaritmikus növekedési fázisban tartottuk a sejteket három napig és úgy végeztük az elektroporációt. Húsz mikrogram pN9. 2. 27G1 plazmid DNS-t linearizáltunk PvuI enzimmel megfelelő pufferben. Összegyűjtöttük a sejteket, mostuk, újra szuszpendáltuk 3×10^7 sejt/ml sűrűségűre, amint azt a 9A. Példában részleteztük. Hozzáadtuk a DNS-t és elektroporálás alatt 10 percig jégen tartottuk. Az elektroporálást 250 V-tal 5 msec.-ig tartó impulzusokkal végeztük. A sejteket 2.5×10^7 sejt/ml koncentrációban emlős szövettenyésztő folyadékba, például HH2 (vagy ehhez hasonló DMEM

illetve RPMI) plusz 5% FCS, plusz HMAX 1.0 tettük 72 órára 37°C-ra és 5% CO₂-ba. A következő lépésben ezeket a sejteket raktuk át 5 x 10⁴/ml koncentrációban HMAX 1.0 és G418 antibiotikumot (Geneticin, Gibco-BRL, Gaithersburg, Maryland) 500 µg/ml koncentrációban tartalmazó 24 mintahelyes lemezre. A szelekciót 14 napig tartottuk fenn mialatt azonosítottuk a HMAX/G418 rezisztens telepeket további elemzések céljára.

A tudományterületen járatosak előtt nyilvánvaló, hogy a találmány módosítása és változtatása lehetséges anélkül, hogy eltérnénk a találmány lényegi aspektusától. Szándékaink szerint a következő szabadalmi igénypontok magukban foglalják az összes módosítást és változtatást.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás kiméra ellenanyag láncok expresszáálására transzfektált és transzformált sejtekben azzal jellemezve, hogy az ellenanyag láncok a CSP-hez kötődő a variábilis régiókat tartalmaznak és

a, olyan rekombináns DNS vektort készítünk, amely a következő aminosav szekvenciával rendelkező könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént hordozza:

Asn-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser
 Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Arg-Ala-Thr
 Ile-Ser-Cys-Arg-Ala-Ser-Glu-Ser-Val-Asp
 Ser-Tyr-Gly-Asn-Ser-Phe-Met-His-Trp-Tyr
 Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Lys-Leu
 Leu-Ile-Tyr-Leu-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser
 Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly
 Ser-Arg-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Thr-Ile-Asp
 Pro-Val-Glu-Ala-Asp-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr
 Tyr-Cys-Gln-Gln-Asn-Asn-Glu-Asp-Pro-Leu
 Thr-Phe-Gly-Ser-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile
 Lys-Arg

és

b, a vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk

és

c, a gazdasejtet a könnyű lánc gén expressziójának megfelelő körülmények között történő tenyésztjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a rekombináns DNS vektorként a 10. ábrán bemutatott pG9. 2. 27K plazmidot alkalmazzuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a transzfektált vagy transzformált sejtként az SP2/0 sejtet alkalmazzuk.

4. Eljárás kiméra ellenanyag láncok expresszáálására transzfektált vagy transzformált sejtekben, azzal jellemezve, hogy az ellenanyag láncok CSP-hez kötődő variábilis régiókat tartalmaznak

és

a, olyan rekombináns DNS vektort készítünk, amely a következő aminosav szekvenciával rendelkező nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént hordozza:

és

és

27G1

hogy
sejten

7. Eljárás kiméra ellenanyagok expressziójára transzfektált vagy transzformált sejtekben, azzal jellemezve, hogy az ellenanyagok a CSP-hez kötődő variábilis régiókat tartalmazzák és

a, olyan rekombináns DNS vektort készítünk, amely a következő aminosav szekvenciával rendelkező könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént hordozza:

Asn-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser
 Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Arg-Ala-Thr
 Ile-Ser-Cys-Arg-Ala-Ser-Glu-Ser-Val-Asp
 Ser-Tyr-Gly-Asn-Ser-Phe-Met-His-Trp-Tyr
 Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Lys-Leu
 Leu-Ile-Tyr-Leu-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser
 Gly-Val-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly
 Ser-Arg-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Thr-Ile-Asp
 Pro-Val-Glu-Ala-Asp-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr
 Tyr-Cys-Gln-Gln-Asn-Asn-Glu-Asp-Pro-Leu
 Thr-Phe-Gly-Ser-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile
 Lys-Arg

és

b, olyan rekombináns DNS vektort készítünk, amely a következő aminosav szekvenciával rendelkező nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént hordozza:

Gln-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Ser-Gly-Pro-Glu
 Leu-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Ile
 Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Ala-Phe-Ser
 Arg-Ser-Trp-Met-Asn-Trp-Val-Lys-Gln-Arg
 Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Arg
 Ile-Tyr-Pro-Gly-Asp-Gly-Asp-Thr-Asn-Tyr
 Asn-Gly-Lys-Phe-Lys-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu
 Thr-Ala-Asp-Lys-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Tyr
 Met-Gln-Val-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Val-Asp
 Ser-Ala-Val-Tyr-Phe-Cys-Ala-Arg-Gly-Asn
 Thr-Val-Val-Val-Pro-Tyr-Thr-Met-Asp-Tyr
 Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Ser-Val-Thr-Val-Ser
 Ser

vagy

c, olyan rekombináns DNS vektort készítünk, amely a könnyű lánc variábilis régiót kódoló gént és a nehéz lánc variábilis régiót kódoló gént hordozza

és

d, az a, és b, vagy a c, vektort emlős gazdasejtbe transzfektáljuk vagy transzformáljuk

és

e, az emlős gazdasejteket a variábilis régiók génjeinek expressziójának megfelelő körülmények között növesztjük.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az a, pG9. 2. 27K plazmidot és a b, pN9. 2.27G1 plazmidot alkalmazzuk.

9. A 7. és 8. igénypontok szerinti valamennyi eljárás azzal jellemezve, hogy a transzfektált vagy transzformált sejt-ként az SP2/0 sejtet alkalmazzuk.

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 163-2733

57 oldal + 12 ábrával

6697/90
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

33035

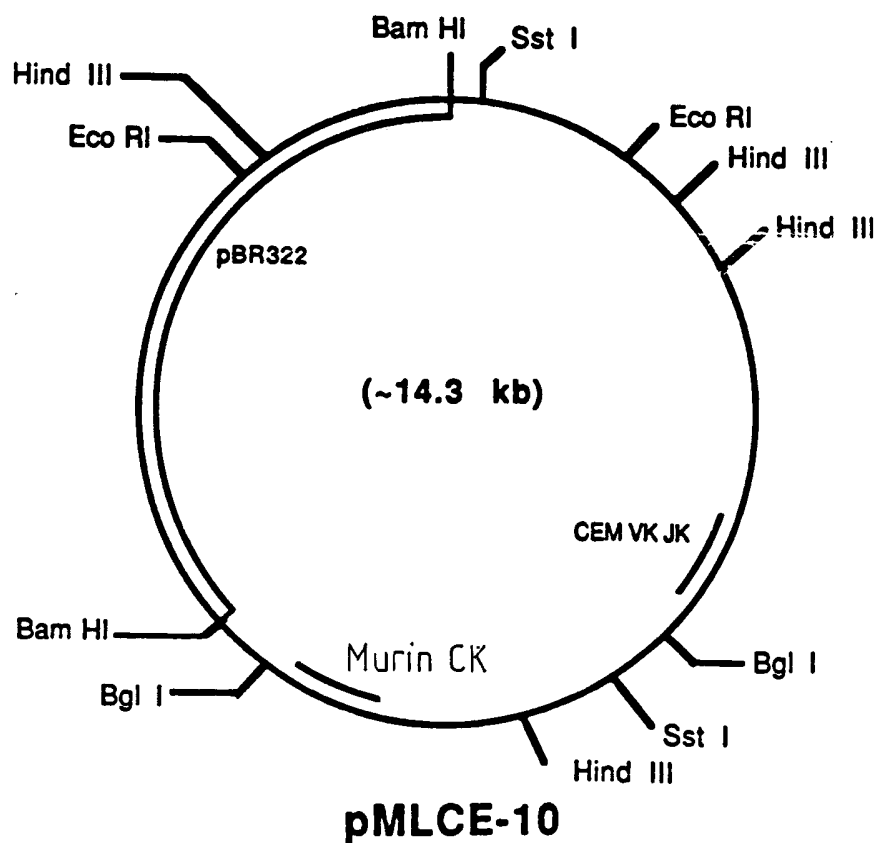
90

12/1

-54408-

1. ábra

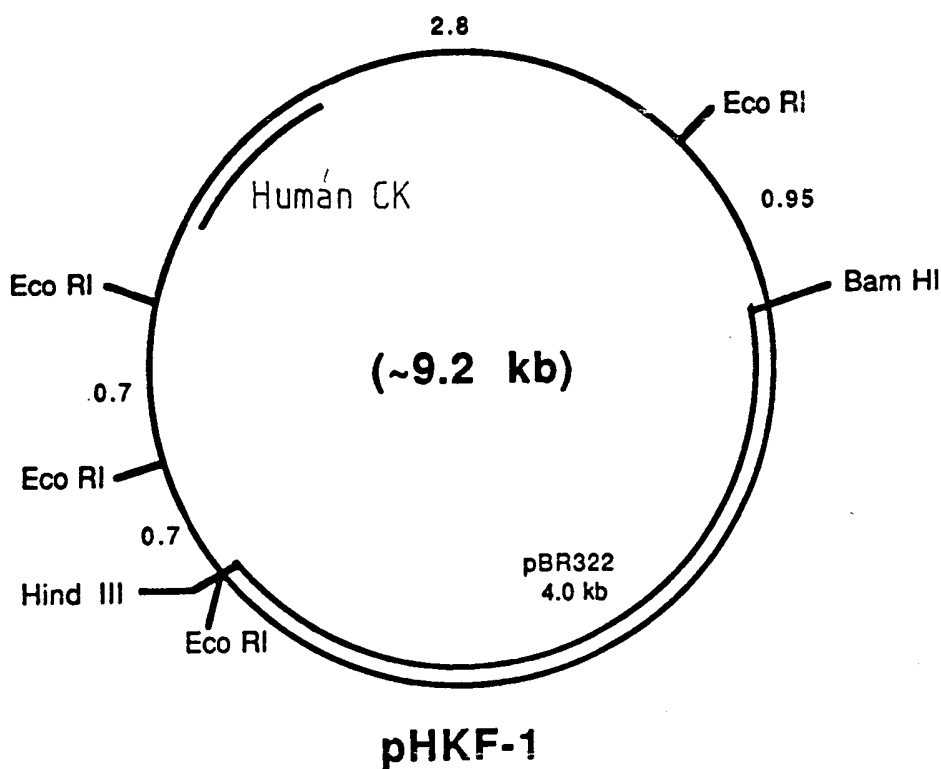
A pMLCE-10 plazmid restrikciós
helyei és funkciós térképe



S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÓKÁZ U. 14.
TELEFON: 153-3733

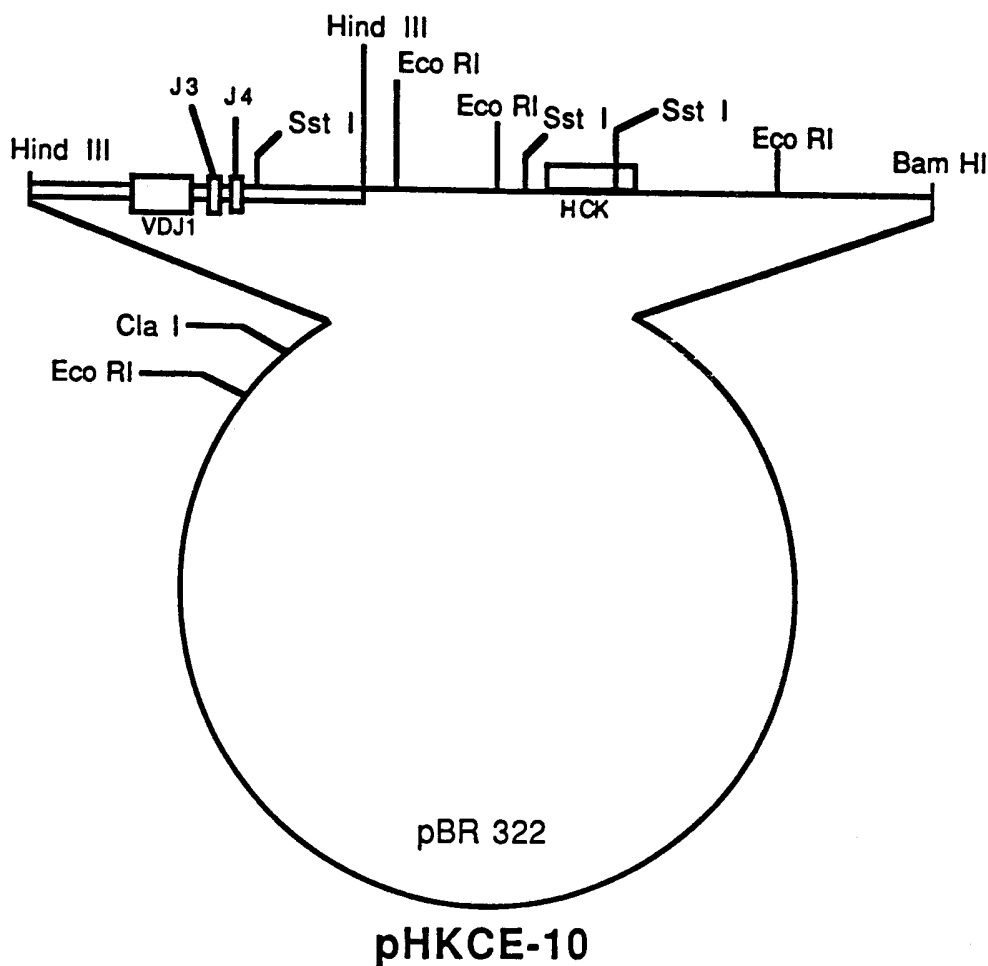
2 ábra

A pHKF 1 plazmid restrikciós
helyei és funkciós térképe



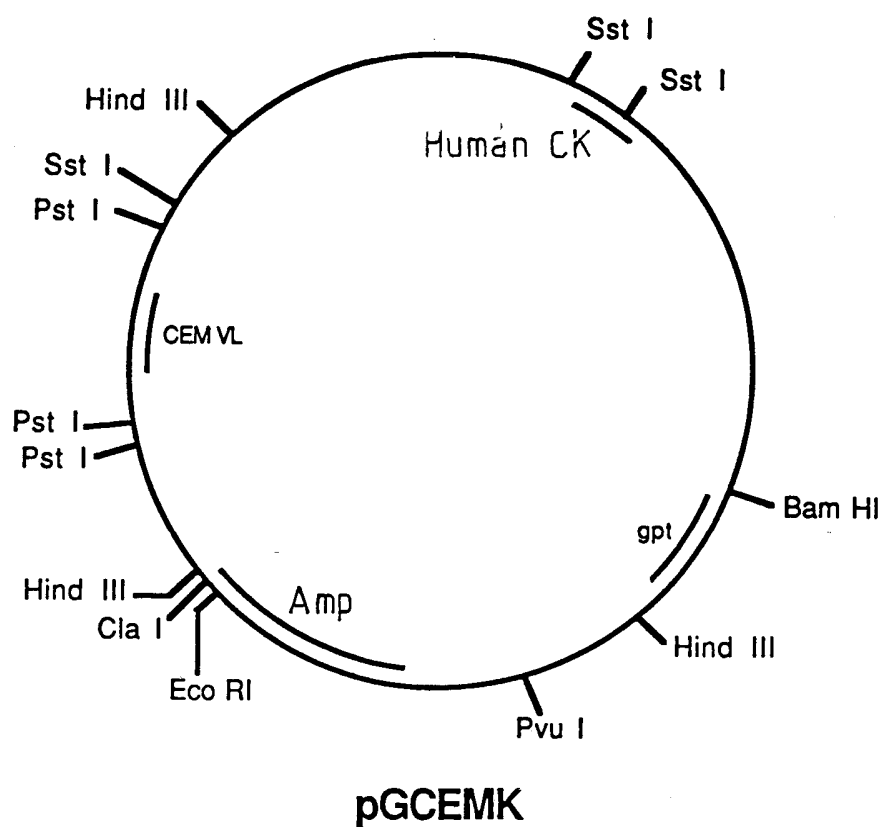
3 ábra

A pHKCE 10 plazmid restrekciós
helyei és funkciók térképe



4 ábra

A pGCEMK plazmid restrek-
ciós helyei és funkciók térképe



KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

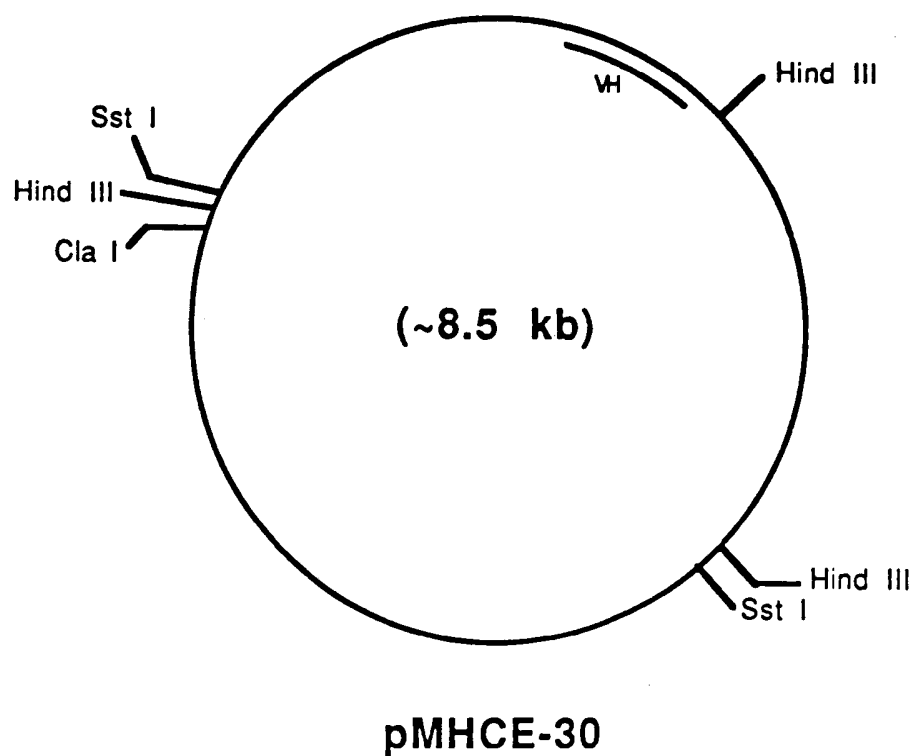
4697/90

33303

90
12/5

5 ábra

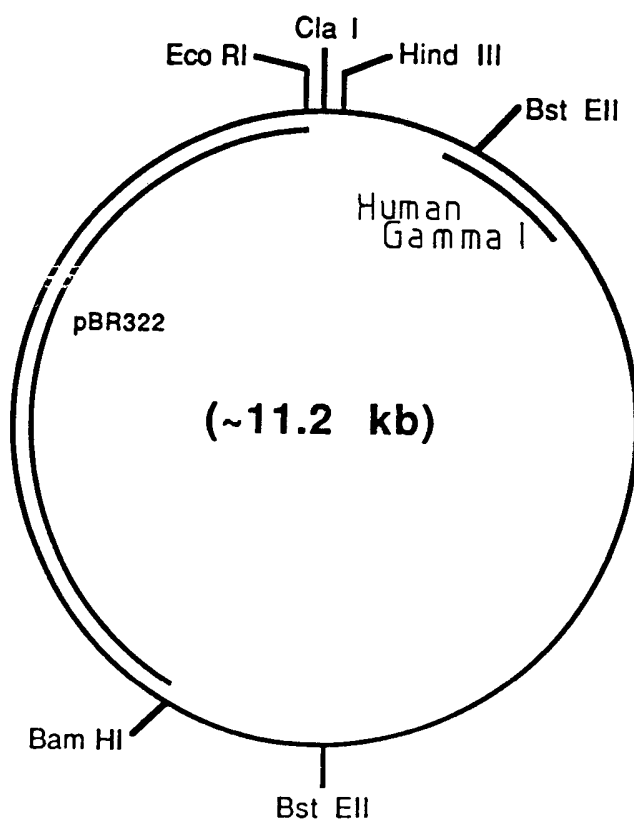
A pMHCE 30 plazmid restrekciós
helyei és funkciós térképe



S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

6 ábra

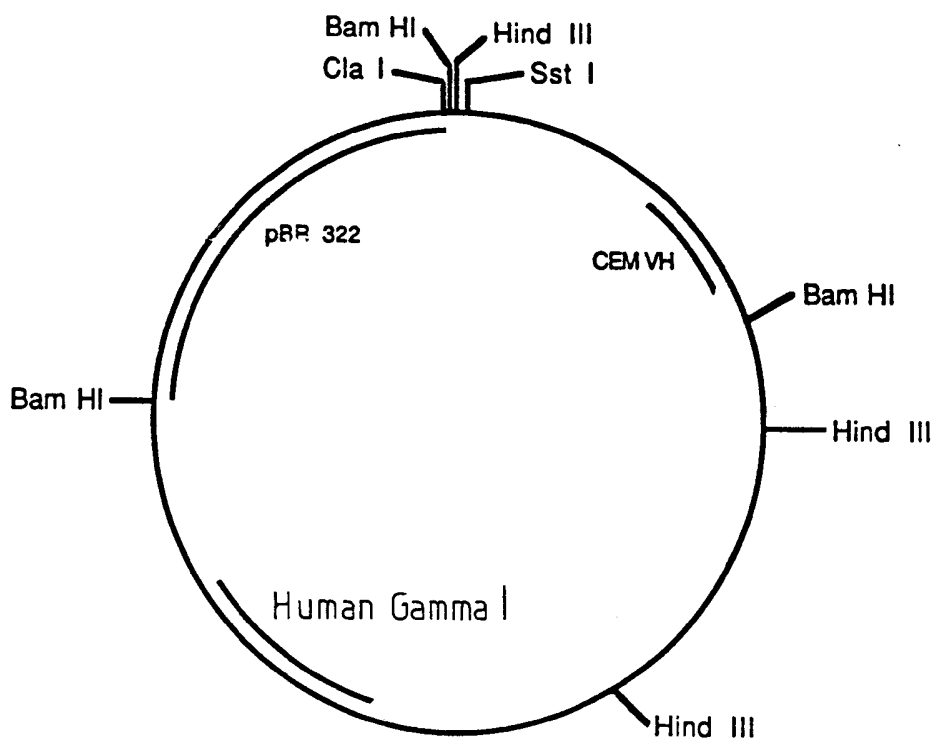
A pHG1Z plazmid restrekciós
helyei és funkciós térképe



pHG1Z

7 ábra

A pHGCEM-30 plazmid restrekciós
helyei és funkciós térképe



pHGCEM-30

4697/90

A

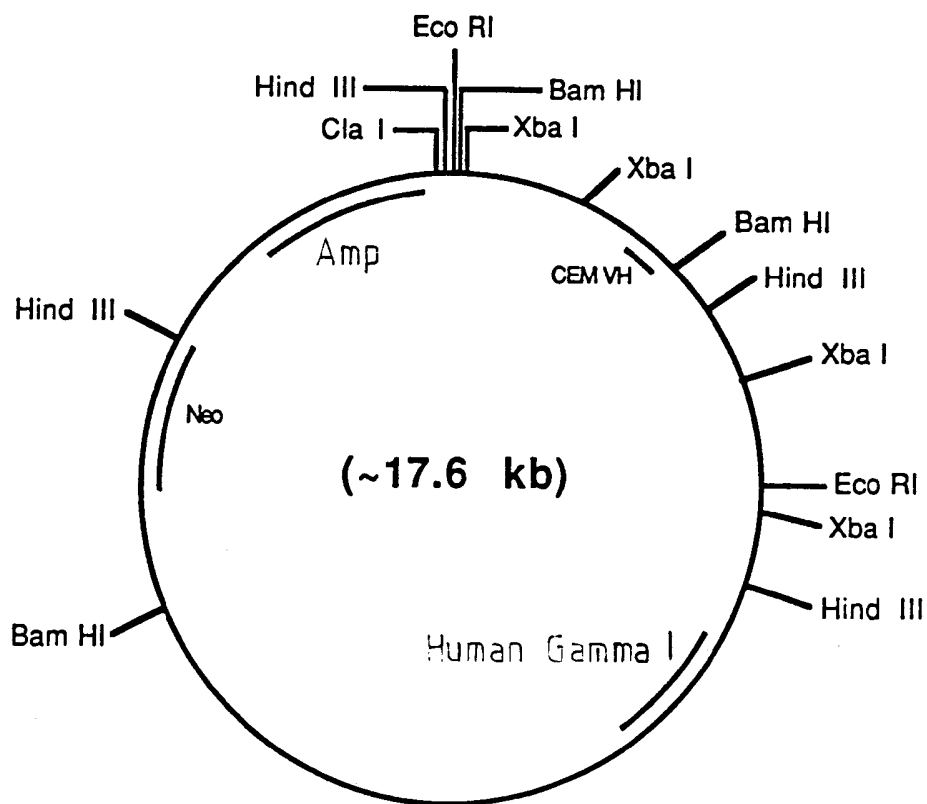
33335

140

12/8

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

8 ábra

A pNCEMG 1 plazmid restrekciós
helyei és funkciók térképe

pNCEMG1

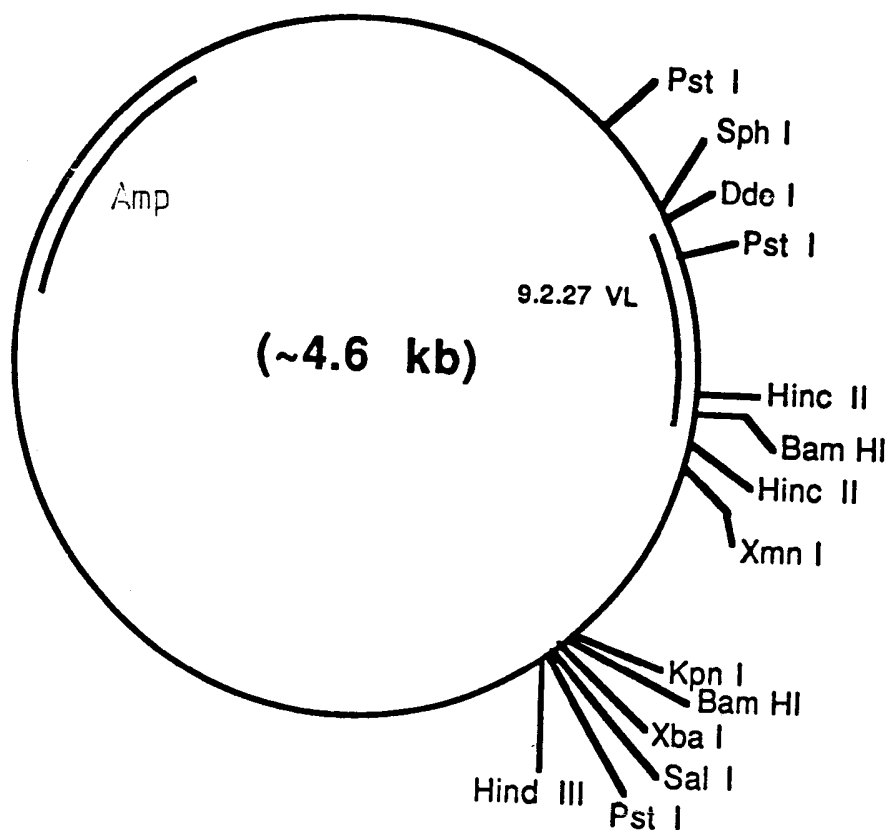
SB.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETI ÜGYVÉDI
SZOLGÁLTATÓIRODA
1069 BUDAPEST, DALMÁSI U. 10.
TELEFON: 153-3733

4692/90 A
KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY

12/9

9 ábra

A pTZK910 plazmid restrekciós
helyei és funkciók térképe



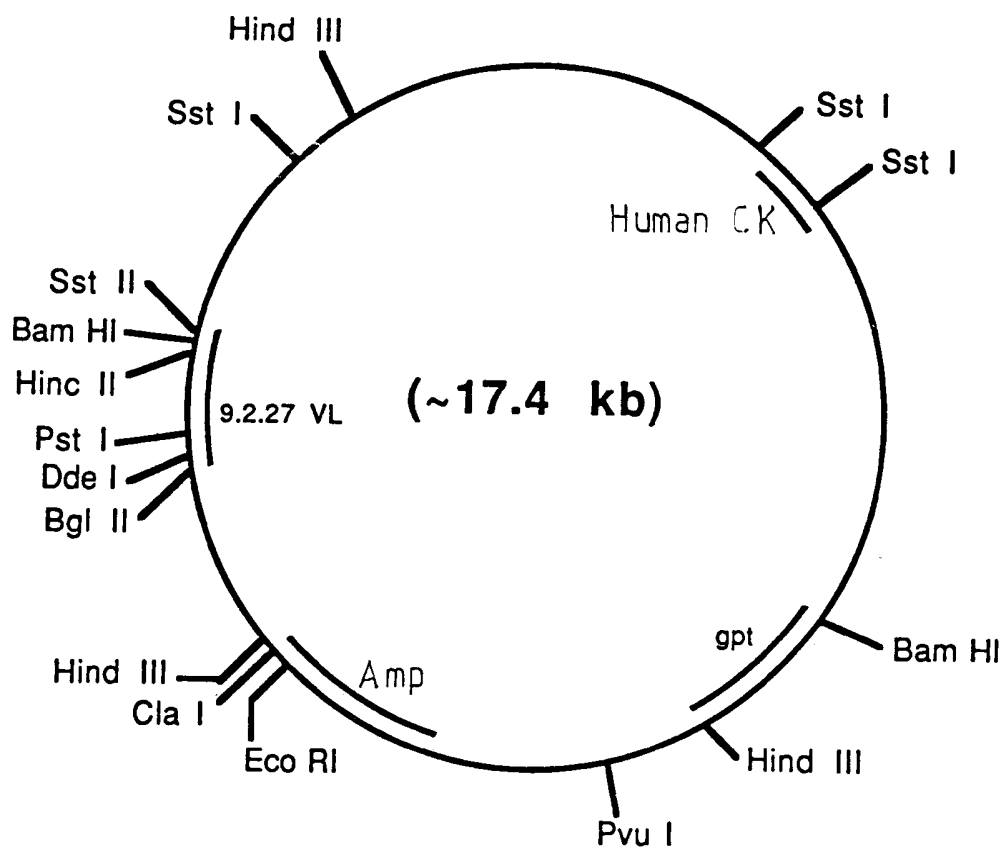
pTZK910

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMAIRODA
1061 BUDAPEST, DAKSZENTHÁZI U. 10.
TELEFON: 463-3733

6697/90
A
30005
12/10
KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

.10 ábra

A pG9.2.27K plazmid restrekciós
helyei és funkciós térképe

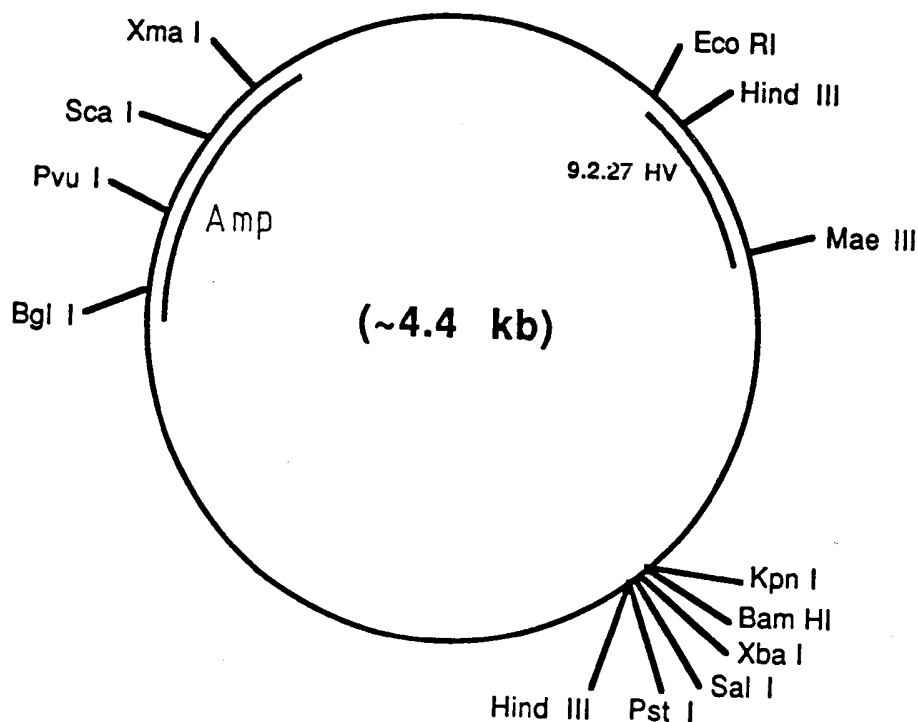


pG9.2.27K

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI TUDÁSI
KÖZPONT
1061 BUDAPEST, DÁSZINHALI U. 14.
TELEFON: 133-2133

II ábra

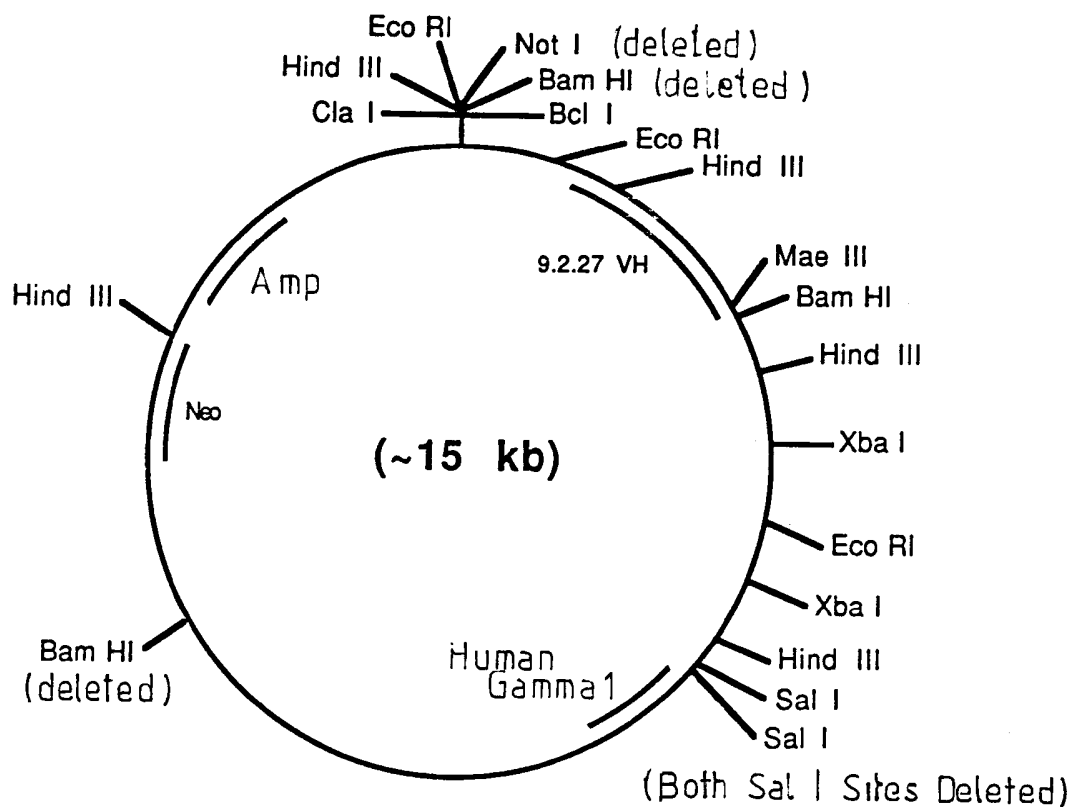
A pG4G21 plazmid restrekciós
helyei és funkciók térképe



pG4G21

12 ábra

A pN9.2.27G1 plazmid restrekciós helyei és funkciók térképe



pN9.2.27G1