



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 75366

C Patentti myönnetty
(45) Patent julkaistu 09.08.1988

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 12 N 5/00, 15/00, A 61 K 39/395,
C 12 P 1/00, G 01 N 33/53

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	803758
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	03.12.80
(23) Alkupäivä - Giltighetsdag	03.12.80
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	05.06.81
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.02.88
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	04.12.79
USA(US) 99969 Toteennäytetty-Styrkt	

(71) Ortho Pharmaceutical Corporation, U.S. Route 202, Raritan, New Jersey, USA(US)

(72) Patrick Chung-Shu Kung, Bridgewater, New Jersey,
Gideon Goldstein, Short Hills, New Jersey, USA(US)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä komplementin sitovan monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi
ihmisen heikentäjä-T-soluille yhden hybridisolulinjan avulla -
Förfarande för framställning av en komplement-fixerande monoklonal antikropp
mot mänskliga supressor-T-celler medelst en hybridcellinje

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on hybridisolulinja komple-
mentin sitovan monoklonaalisen vasta-aineen
valmistamiseksi ihmisen normaalien heikentäjä-
T-solujen pinta-antigeenille. Hybridi valmiste-
taan yhdistämällä ihmisen tymosyyteillä immuni-
soiduista CAF₁-hiiristä eristettyjä pernasoluja
hiiren P3X63Ag8U1-myeloomasoluihin. Keksintö
koskee myös monoklonaalisen vasta-aineen diag-
nostista ja terapeuttista käyttöä.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en hybridcellinje för fram-
ställning av komplement bindande monoklonal anti-
kropp mot ett ytantigen som finns på normala
mänskliga suppressor-T-celler. Hybriden bildas
genom fusionering av mjältceller, vilka isolerats
från CAF₁-möss immuniserade med mänskliga tymocyter, med
musens P3X63Ag8U1-myelomaceller. Uppfinningen avser
även diagnostisk och terapeutisk användning av
den monoklonala antikroppen.

Menetelmä komplementin sitovan monoklonaalisen vasta-
aineen valmistamiseksi ihmisen heikentäjä-T-soluille yh-
den hybridisolulinjan avulla

5 Keksintö kohdistuu menetelmään komplementin sito-
van monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi ihmisen
heikentäjä-T-soluille. Menetelmässä käytetään hyväksi uut-
ta hybridisolulinjaa, jonka avulla voidaan valmistaa
komplementin sitova monoklonaalinen vasta-aine ihmisen
10 normaaleista heikentäjä-T-soluista löydetyille pinta-anti-
geenille. Tätä vasta-ainetta voidaan käyttää terapeutti-
siin tarkoituksiin.

 Kohler ja Milstein yhdistivät vuonna 1975 hii-
15 ren myeloomasoluja immunisoitujen hiirien pernasoluihin
(Nature 256 (1975), ss. 495 - 497), jolloin ensimmäisen
kerran havaittiin, että oli mahdollista valmistaa jatkuva
solulinja homogeenisen (ns. monoklonaalisen) vasta-aineen
tuottamiseksi. Tämän jälkeen erilaisten hybridisolujen
20 (ns. hybridomien) valmistusta on yritetty monin tavoin ja
näiden hybridomien tuottamaa vasta-ainetta on yritetty so-
veltaa tieteelliseen käyttöön [ks. esim. Current Topics
in Microbiology and Immunology, vol. 81 - "Lymphocyte
Hybridomas", toim. F. Melchers, M. Potter ja N. Warner,
25 Springer-Verlag 1978 sekä sen sisältämät kirjallisuusviit-
teet; C. J. Barnstable et al., Cell 14 (toukokuu 1978),
ss. 9 - 20; P. Parham ja W. F. Bodmer, Nature 276 (1978),
ss. 397 - 399; Handbook of Experimental Immunology, 3.
painos, vol. 2 (1978), kappale 25, toim. D. M. Wier; ja
30 Chemical and Engineering News, tammikuu 1 (1979), ss. 15 -
17].

 Näissä viitteissä on esitetty saavutetut tulok-
set ja esiintyneet vaikeudet yritettäessä valmistaa hybri-
domeista monoklonaalista vasta-ainetta. Vaikka valmistus-
35 menetelmä periaatteessa tunnetaankin hyvin, vaikeuksia

esiintyy paljon ja jokainen tapaus on erilainen. Ei voida etukäteen taata, että yritettäessä valmistaa haluttua hybridomaa, siinä onnistutaan, ja että onnistuttaessa hybridoma tuottaa vasta-ainetta, tai että näin muodostuneella vasta-aineella on haluttu spesifisyys. Onnistuminen riippuu pääasiassa käytetystä antigeenilajista ja halutun hybridoman eristysmenetelmästä.

Monoklonaalista ihmisen lymfosyyttien pinta-antigeeneille spesifistä vasta-ainetta on yritetty valmistaa vain harvoissa tapauksissa [ks. esim. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 81 (1978), ss. 66 - 69 ja 164 - 169]. Näissä kokeissa käytetyt antigeenit olivat viljeltyjä ihmisen lymfoblastioidileukemiasolulinjoja ja kroonisen lymfosyyttileukemian solulinjoja. Monet näin valmistetut hybridomat tuottivat vasta-ainetta, joka vaikutti kaikkien ihmisen solujen erilaisiin pinta-antigeeneihin. Mikään näistä hybridomeista ei tuottanut ihmisen lymfosyyttilajille spesifistä vasta-ainetta.

Äskettäin on esitetty julkaisuja, joissa on kuvattu sellaista hybridomien valmistus ja testaus, jotka tuottavat tietyille T-solujen antigeeneille spesifistä vasta-ainetta [ks. esim. E. L. Reinherz et al., J. Immunol. 123 (1979), ss. 1312 - 1317; E. L. Reinherz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1979), ss. 4061 - 4065; ja P. C. Kung et al., Science, 206 (1979), ss. 347 - 349].

Ihmisen ja eläinten elimistön immunologisiin toimintoihin osallistuu kaksi lymfosyyttien pääryhmää. Näistä toinen (kateenkorvasta peräisin oleva solu, eli T-solu) erilaistuu kateenkorvassa hemopoieettisista kantasoluista. Erilaistuneita soluja nimitetään "tymosyyteiksi". Kypsät T-solut irtoavat kateenkorvasta ja joutuvat sen jälkeen verenkiertoon, kudoksiin ja imukudokseen. Nämä T-solut muodostavat suuren osan elimistössä kiertävistä pienistä lymfosyyteistä. Ne ovat immunologisesti spesifisiä ja osallistuvat efektorisoluina suoraan solujen välityksellä tapahtuviin immunologisiin reaktioihin (esimerkiksi elinsiirtojen yhteydessä esiintyvä hylkiminen). Vaikka T-solut

eivät eritä vasta-aineita elimistön nesteisiin, toinen myöhemmin käsiteltävä lymfosyyttiryhmä tarvitsee eräissä tapauksissa T-soluja pystyäkseen itse erittämään vasta-aineita. Eräät T-solulajit toimivat toisissa immunologi-
5 sissa järjestelmissä säätelevästi. Tämän solujen yhteistoimintamuodon mekanismia ei vielä täysin tunneta.

Toiseen lymfosyyttiryhmään (luuytimeistä peräisin oleviin soluihin, eli B-soluihin) kuuluvat ne, jotka erittävät vasta-aineita. Ne kehittyvät myös hemopoieettisista
10 kantasoluista, mutta kateenkorva ei säätele niiden erilaisuudesta. Linnuilla ne erilaistuvat kateenkorvalle analogisessa elimessä, joka on nimeltään "Bursa of Fabricius". Imettäväisistä ei kuitenkaan ole löydetty vastaavaa elintä, ja täten B-solujen arvellaan erilaistuvan luuytimessä.

15 T-solut jakaantuvat ainakin kolmeen alalajiin, joita nimitetään "auttaja-", "heikentäjä-" ja "tappaja-" T-soluiksi, nämä joko hidastavat tai nopeuttavat reaktiota tai tappavat (liuottavat) vieraita soluja. Nämä alaluokat ovat hyvin tunnettuja hiirien elimistössä, mutta vasta
20 äskettäin on kuvattu niiden toimintaa ihmisen elimistössä (ks. esim. R. L. Evans et al., Journal of Experimental Medicine 145 (1977), ss. 221 - 232; ja L. Chess ja S. F. Schlossmann, "Functional Analysis of Distinct Human T-cell Subsets Bearing Unique Differentiation Antigens"-
25 niminen artikkeli teoksessa "Contemporary Topics in Immunology", toim. O. Stutman, Plenum Press 1977, vol 7, ss. 363 - 379).

Eri T-solulajien ja -alalajien identifiointi tai niiden heikentäminen on tärkeää erilaisten immunoregula-
30 toristen häiriöiden diagnosoimisessa ja hoidossa.

Esimerkiksi tiettyjen leukemia- ja imukudoksen
vainmuotojen prognoosi on erilainen sen mukaan, ovatko ne lähtöisin B- vai T-soluista. Täten taudin prognoosia arvi-
oitaessa nämä kaksi lymfosyyttiryhmää täytyy pystyä erot-
35 tamaan toisistaan (ks. esim. A. C. Aisenberg ja J. C. Long, The American Journal of Medicine 58 (1975), s. 300; D. Bel-
pomme et al., artikkeli teoksessa "Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas", toim. S. Thierfelder et al.,

Springer, Heidelberg 1977, ss. 33 - 45; ja D. Belpomme et al., British Journal of Haematology 38 (1978), s. 85).

5 Tietyissä tautitiloissa (esim. nuorten nivelreumassa, pahanlaatuisissa tautitiloissa ja agammaglobulinemiassa) T-solujen alaryhmät ovat joutuneet epätasapainoon.

On mahdollista, että autoimmuunisissa sairauksissa yleensä "auttaja"-T-soluja esiintyy ylimäärin ja tietyistä "heikentäjä"-T-soluista on puutetta, kun taas agammaglobulinemiassa tietyjä "heikentäjä"-T-soluja esiintyy
10 ylimäärin tai "auttaja"-T-soluista on puutetta. Pahanlaatuisiin tauteihin liittyy yleensä "heikentäjä"-T-solujen ylimäärä. Joissakin leukemiamuodoissa tietyssä kehitysvaiheessa olevia T-soluja muodostuu ylimäärin. Diagnoosin onnistuminen voi täten riippua siitä, pystytäänkö tämä epä-
15 tasapaino tai ylimäärä havaitsemaan tai määrittämään se, mitä kehitysvaihetta esiintyy ylimäärin (ks. esim. J. Kerssey et al., "Surface Markers Define Human Lymphoid Malignancies with Differing Prognoses"-niminen artikkeli teoksessa "Haematology and Blood Transfusion", vol. 20, Springer-Verlag 1977, ss. 17 - 23, ja sen sisältämät viitteet;
20 sekä E. L. Reinberg et al., J. Clin. Invest. 64 (1979), ss. 392 - 397).

Agammaglobulinemiaan, tautitilaan, jossa immunoglobuliinia ei muodostu, kuuluu ainakin kaksi eri tyyppiä.
25 Tyypissä I ei muodostu immunoglobuliinia, koska "heikentäjä"-T-soluja esiintyy ylimäärin, kun taas tyypissä II tämä aiheutuu "auttaja"-T-solujen puutteesta. Molemmissa tyypeissä potilaan B-solut eli lymfosyytit, jotka vastaavat vasta-aineen varsinaisesta erityksestä, ovat täysin
30 normaaleja eikä niistä esiinny puutetta, sen sijaan näiden B-solujen toimintaa joko heikennetään tai niitä "ei auteta", mikä vähentää huomattavasti immunoglobuliinin tuotantoa tai keskeyttää sen kokonaan. Agammaglobulinemiatyyppi voidaan siten määrittää sen perusteella, esiintyykö "heikentäjä"-T-soluja ylimäärin vai onko "auttaja"-
35 T-soluista puutetta.

On havaittu viitteitä siitä, että annettaessa autoimmuunista tautia tai pahanlaatuisia tauteja sairastaville potilaille vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä ylimäärin esiintyville T-solulajeille, vasta-aineet voivat vaikuttaa taudin kehitykseen edullisesti. Esimerkiksi "auttaja"-T-solusyöpää (tiettyjä ihon T-soluimukudoskasvaimia ja tiettyjä T-solujen akuutteja lymfoblastileukemia-muotoja) voidaan hoitaa antamalla potilaalle "auttaja"-T-soluantigeenille spesifistä vasta-ainetta. Autoimmuunista tautia, joka aiheutuu "auttaja"-T-solujen ylimäärästä, voidaan myös hoitaa samalla tavalla. Sellaisia tauteja (esim. pahanlaatuisia tautitiloja tai tyyppiä I olevaa agammaglobulinemiaa), jotka aiheutuvat "heikentäjä"-T-solujen ylimäärästä, voidaan hoitaa antamalla potilaalle vasta-ainetta, joka on spesifinen "heikentäjä"-T-soluantigeenille.

Antiseerumit, jotka vaikuttavat ihmisen kaikkiin T-soluihin (ns. ihmisen vastainen tymosyyttiglobuliini, eli ATG), ovat osoittautuneet terapeuttisesti käyttökelpoisiksi hoidettaessa potilaita, joille on suoritettu elinsiirtoja. Koska T-solut vaikuttavat solujen välityksellä tapahtuviin immunologisiin reaktioihin (siirrettyjen elinten hylkimismekanismi), T-soluille spesifisen vasta-aineen saaminen estää tai hidastaa tätä hylkimisprosessia (ks. esim. Cosimi et al., "Randomized Clinical Trial of ATG in Cadaver Renal Allgraft Recipients: Importance of T Cell Monitoring", Surgery 40 (1976), ss. 155 - 163 ja julkaisun sisältämät viitteet).

Ihmisen T-solulajien ja -alalajien identifioimiseen ja heikentämiseen on tähän asti käytetty spontaaneja autovasta-aineita tai ihmisen T-soluille selektiivisiä antiseerumeja, jotka on valmistettu immunoimalla eläimiä ihmisen T-soluilla, poistamalla eläimistä veri seerumin saamiseksi ja adsorboimalla antiseerumi (esimerkiksi) autologisilla ei-allogeenisillä B-soluilla niiden vasta-aineiden poistamiseksi, joilla on ei-haluttu selektiivisyys. Näiden antiseerumien valmistus on erittäin vaikeaa erikokoisesti adsorptio- ja puhdistusvaiheessa. Adsorboidut ja

puhdistetut antiseerumitkin sisältävät halutun vasta-
aineen lisäksi useista syistä monia epäpuhtauksia. Eräs
syy on se, että seerumi sisältää miljoonia vasta-aine-
molekyylejä jo ennen immunointia T-soluilla. Toiseksi im-
munointi aiheuttaa vasta-aineiden muodostumisen useita
5 antigeenejä vastaan, joita on löydetty kaikista injek-
toiduista ihmisen T-soluista. Ei pystytä selektiivisesti
tuottamaan tietylle antigeenille spesifistä vasta-ainetta.
Kolmanneksi näillä menetelmillä valmistetun spesifisen
10 vasta-aineen tiitteri on tavallisesti melko alhainen
(esim. laimennusten ollessa suurempia kuin 1:100 vasta-
aine on inaktiivinen) ja spesifisen ja ei-spesifisen vas-
ta-aineen suhde on pienempi kuin $1/10^6$.

Tähän asti käytettyjen antiseerumien puutteelli-
15 suuksia ja monoklonaalisen vasta-aineen etuja on kuvattu
mm. Chess'in ja Schlossmann'in edellä mainitussa artikke-
lissa (sivulta 365 alkaen) sekä edellä mainitussa artik-
kelissa "The Chemical and Engineering News"-lehdessä.

Nyt on keksitty uusi hybridoma (OKT8), joka pys-
20 tyy tuottamaan uutta monoklonaalista vasta-ainetta pinta-
antigeenille, jota on löydetty ihmisen normaaleista "hei-
kentäjä"-T-soluista (noin 30 % ihmisen normaaleista peri-
feerisistä soluista) ja noin 80 %:lta ihmisen normaaleja
tymosyyttejä, mutta ei B-soluista eikä nollasoluista ja
25 alle 2 %:lta luuydinsoluja. Lisäksi monoklonaalinen vas-
ta-aine OKT8 sitoo komplementin. Näin muodostunut vasta-
aine on monospesifinen yhdelle ainoalle pinta-antigeeni-
determinantille, jota esiintyy noin 30 %:lla ihmisen nor-
maaleja T-soluja, eikä se sisällä käytännöllisesti katsoen
30 lainkaan muita ihmisen vastaisia immunoglobuliineja, päin
vastoin kuin tähän asti tunnetut antiseerumit (jotka si-
sältävät luonnostaan epäpuhtauksina vasta-aineita, jotka
reagoivat hyvin monien ihmisen antigeenien kanssa) ja tä-
hän asti tunnetut monoklonaaliset vasta-aineet (jotka ei-
35 vät ole monospesifisiä yhdelle ainoalle ihmisen "heikentä-
jä"-T-solujen antigeenille). Lisäksi tätä hybridomaa voi-
daan viljellä antigeenin tuottamiseksi, jolloin eläinten

käyttö vasta-aineen tuottamiseen ei ole välttämätöntä, eikä myöskään tarvita monimutkaisia adsorptio- ja puhdistusvaiheita, jotka tähänastisissa epäpuhtaidenkin antiseerumien valmistusmenetelmissä ovat olleet välttämättömiä.

5 Sekä esillä olevasta hybridomasta, että sen tuottamasta vasta-aineesta käytetään tässä yhteydessä nimitystä "OKT8", asiayhteydestä ilmenee, kumpaa kulloinkin tarkoitetaan. Tämä hybridoma on tallennettu 18.09.1979 laitokseen The American Type Culture Collection, 12 301 Parklawn
10 Drive, Rockville, Maryland 20852, U.S.A., tallennusnumerolla ATCC CRL 8014.

Monoklonaaliselle vasta-aineelle OKT8 on tunnusomaista, että se

 a) reagoi heikentäjä-T-solujen kanssa (noin 30 %
15 ihmisen normaaleista T-soluista), alle 2 %:n kanssa ihmisen normaaleja luuydinsoluja eikä lainkaan B-solujen eikä nollasolujen kanssa,

 b) reagoi noin 80 %:n kanssa ihmisen normaaleja tymosyyttejä,

20 c) reagoi noin 34 %:n kanssa käsittelemättömiä perifeerisiä T-soluja, 95 %:n kanssa perifeerisiä T-soluja, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8002 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, ei lainkaan perifeeristen T-solujen
25 kanssa, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8014 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, 75 %:n kanssa käsittelemättömiä tymosyyttejä, 55 %:n kanssa tymosyyttejä, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8002 avulla
30 valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, 90 %:n kanssa tymosyyttejä, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8001 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, eikä lainkaan tymosyyttien kanssa, jotka on etukäteen käsi-
35 telty hybridisolulinjan ATCC CRL 8014 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla,

d) reagoi ALL-T-soluvaiheiden kanssa, jotka kuuluvat vaiheen Thy 3, Thy 4 tai Thy 4 - 6 tavallisiin tymosyytteihin tai vaiheen Thy 8 myöhäisiin tymosyytteihin, mutta ei reagoi ALL-T-soluvaiheiden kanssa, jotka kuuluvat vaiheen I tymosyytteihin tai vaiheen Thy 3-4 tavallisiin tymosyytteihin,

e) reagoi solulinjojen CEM- ja MOLT-4 kanssa, mutta ei solulinjan HSB-2 kanssa, ja

f) määrittelee T-solupopulaation (OKT8⁺), jota esiintyy normaalia pienempinä pitoisuuksina primäärisessä maksakirroosissa ja multippeliskleroosissa, puuttuu kokonaan tai esiintyy normaalia pienempinä pitoisuuksina akuutissa elinsiirtoreaktiossa, huomattavasti normaalia suurempina pitoisuuksina akuutissa tarttuvassa mononukleosisissa, puuttuu täysin myasthenia graviksessa ja esiintyy normaaleina pitoisuuksina kaikissa Hodgkinsin taudin vaiheissa ja psoriasiksessa.

Monoklonaalisen vasta-aineen OKT8 valmistus hybridoman ATCC CRL 8014 avulla on kuvattu patenttivaatimuksissa 1 ja 2.

Hybridoma valmistettiin pääpiirteittäin Milsteinin ja Kohlerin esittämällä menetelmällä. Tässä immunisoitiin ensin hiiriä normaaleilla ihmisen tymosyyteillä ja sen jälkeen immunisoitujen hiirien pernasolut yhdistettiin hiiren myeloomasolulinjan soluihin, ja viljelmän pintanesteestä seulottiin ne hybridomat, jotka tuottivat ihmisen terveisiin E-rosettipositiivisiin T-soluihin ja/tai tymosyytteihin selektiivisesti sitoutuvaa vasta-ainetta. Halutut hybridomat kloonattiin ja karakterisoitiin. Tulokseksi saatiin hybridoma, joka tuottaa vasta-ainetta (OKT8) ihmisen normaalien heikentäjä-T-solujen (noin 30 % ihmisen normaaleista perifeerisistä T-soluista) pinta-antigeenille. Tämä vasta-aine reagoi noin 30 %:n kanssa ihmisen normaaleja T-soluja, sen lisäksi se reagoi noin 80 %:n kanssa ihmisen normaaleja tymosyyttejä, alle 2 %:n kanssa luuydinsoluja, eikä lainkaan B-solujen eikä nollasolujen kanssa.

Ottaen huomioon tähän asti esiintyneet vaikeudet ja huonot tulokset käytettäessä pahanlaatuisten tautien solulinjoja antigeeninä, on yllättävää, että esillä oleval-
la menetelmällä saatiin aikaan haluttu hybridoma. On ko-
5 rostettava, että hybridisolujen valmistuksessa esiintyvien arvaamattomien tekijöiden vuoksi ei pystytä tietyllä anti-
geeni/solu-yhdistelmällä saatujen tulosten perusteella en-
nustamaan jonkin muun antigeeni/solu-yhdistelmän käyttäy-
tymistä. On nimittäin havaittu, että käytettäessä antigeen-
10 nina pahanlaatuisen taudin T-solulinjoja tai solun pinnal-
ta eristettyjä puhdistettuja antigeenejä, ei yleensä ole saatu onnistuneita tuloksia.

Hybridoman ja sen tuottaman vasta-aineen valmistus ja karakterisointi on tarkemmin selostettu keksinnön ku-
15 vauksessa ja esimerkeissä.

Hybridoman valmistusmenetelmä koostuu pääpiirteit-
tään seuraavista vaiheista:

A. Hiiriä immunisoidaan normaaleilla ihmisen tymo-
syyteillä. Yleensä naaraspuoliset CAF₁-hiiret on havaittu
20 tähän parhaiten soveltuviksi, mutta myös muiden hiirikan-
tojen käyttöä voidaan ajatella. Immunisointiaikataulun ja
tymosyyttipitoisuuden pitäisi olla sellainen, että saadaan
käyttökelpoiset määrät sopivasti esikäsiteltyjä splenosyyt-
tejä. Kolme immunisointia 2 x 10 solulla/hiiri/ruiske
25 0,2 ml:ssa fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta, 14 päivän
välein on havaittu tehokkaaksi.

B. Pernat poistetaan immunisoiduista hiiristä, ja
valmistetaan pernasuspensio sopivaan väliaineeseen. Sopiva
väliainemäärä on noin 1 ml pernaa kohti. Nämä koemenetel-
30 mät ovat sinänsä tunnettuja.

C. Suspendoidut pernasolut yhdistetään sopivasta
solulinjasta saatuihin hiiren myeloomasoluihin sopivan yh-
distämiskatalysaattorin avulla. Edullinen suhde on noin 5
pernasolua yhtä myeloomasolua kohti. Noin 10⁸ splenolyytil-
35 le sopivan yhdistämiseen käytetyn väliaineen kokonaistila-
vuus on noin 0,5 - 1,0 ml. Monet hiiren myeloomasolulinjat
ovat tunnettuja ja saatavissa yleensä akateemisista tutki-
muslaitoksista tai erilaisista talletuspankeista, esimerk-

kinä mainittakoon The Salk Insitute Cell Distribution Center, La Jolla, California, U.S.A. Käytetyn solulinjan pitäisi edullisesti kuulua ns. lääkeaineille vastustuskykyiseen lajiin, jotta myeloomasolut eivät eläisi selektiivisessä väliaineessa, jossa hybridisolut puolestaan elävät. Yleisimpään lajiin kuuluvat 8-atsaguaniinille vastustuskykyiset solulinjat, joista puuttuu hypoksantii-niguaninifosforibosyyli-transferraasientsyymi, ja täten tämä laji ei elä HAT-väliaineessa (sisältää hypoksantii-
10 nia, aminopteriiniä ja tymidiiniä). On myös yleensä edullista, että käytetty myeloomasolulinja kuuluisi ns. "ei-erittävään" lajiin, jolloin se ei itse tuota mitään vasta-ainetta, mutta myös vasta-aineita tuottavia lajeja voidaan käyttää. Kuitenkin eräissä tapauksissa vasta-aineita
15 tuottavat myeloomasolulinjat voivat olla edullisia. Edullinen solujen yhdistämiseen käytettävä katalysaattori on polyetyleeniglykoli, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 1 000 - 4 000 (kaupallisesti saatavissa nimikkeellä PEG jne.), mutta myös muita sinänsä tunnettuja yhdistämiskatalysaattoreita voidaan käyttää.
20

D. Vapaiden pernasolujen, vapaiden myeloomasolujen ja yhdistettyjen solujen seos laimennetaan, ja laimennuksia viljellään erillisillä alustoilla selektiivisessä väliaineessa, jossa vapaat myeloomasolut kuolevat noin 1
25 viikossa. Laimennus voi olla ns. rajaava laimennus, jossa laimennukseen käytetyn nesteen tilavuus on tilastollisesti laskettu niin, että pystytään eristämään haluttu määrä soluja (esim. 1 - 4), kullekin erilliselle alustalle (esim. mikrotitrauslevyn kuhunkin syvennykseen). Väliaineena käytetään esim. HAT-väliainetta, jossa lääkeaineille (esim. 8-atsaguaniinille) vastustuskykyinen vapaa myeloomasolulinja tuhoutuu. Koska vapaat pernasolut eivät
30 ole pahanlaatuisia, niiden lisääntymiskyky on rajattu. Täten tietyn ajan kuluttua (noin viikossa) vapaiden pernasolujen lisääntyminen lakkaa. Yhdistetyt solut sen sijaan lisääntyvät jatkuvasti, koska ne ovat toisaalta peräisin myeloomasoluista, jotka on eristetty pahanlaatuisesta kasvaimesta, ja toisaalta pernasoluista, jotka pystyvät elämään selektiivisessä väliaineessa.
35

E. Tarkastetaan, löytyykö eri kasvatusalustojen pintanesteestä, joka sisältää hybridoman, E-rosettipositiivisille puhdistetuille ihmisen T-soluille tai tymosyyteille spesifistä vasta-ainetta.

5 F. Valikoidaan (esim. rajaavalla laimennuksella) ja kloonataan hybridomat, jotka tuottavat haluttua vasta-ainetta.

Kun haluttu hybridoma on eristetty ja kloonattu, muodostuvaa vasta-ainetta voidaan tuottaa eri tavoin. Puh-
10 tainta monoklonaalista vasta-ainetta saadaan viljelemällä haluttua hybridomaa in vitro sopivassa väliaineessa sopivan pituisen ajan, minkä jälkeen haluttu vasta-aine otetaan talteen pintanesteestä. Sopiva väliaine ja viljelyajan pituus ovat tunnettuja tai ne voidaan helposti määrittää. Tämä in vitro
15 -menetelmä tuottaa käytännöllisesti katsoen monospesifistä monoklonaalista vasta-ainetta, joka ei sisällä käytännöllisesti katsoen lainkaan muita ihmisen vastaisia spesifisiä immunoglobuliineja. Muita immunoglobuliineja on mukana pieni määrä, koska väliaine sisältää ksenogeenistä seerumia
20 (esim. vasikan sikiöseerumia). Tällä in vitro -menetelmällä ei kuitenkaan saada tiettyihin tarkoituksiin riittävää vasta-ainemäärää tai riittävän suurta vasta-ainepitoisuutta, koska monoklonaalisen vasta-aineen pitoisuus on vain noin 50 µg/ml.

25 Haluttaessa valmistaa paljon suurempia pitoisuuksia hieman epäpuhtaampaa monoklonaalista vasta-ainetta, haluttu hybridoma voidaan ruiskuttaa hiiriin, edullisesti syngeneisiin tai semisyngeneisiin hiiriin. Hybridoma aiheuttaa vasta-ainetta tuottavien kasvainten muodostumisen hiiriin
30 sopivan inkubaatioajan kuluttua, mikä johtaa halutun vasta-aineen pitoisuuden kohoamiseen hiiren veressä (noin 5-20 mg/l) ja peritoneaalisisä tulehdusnesteessä (vesivatsa). Vaikka näiden hiirten veressä ja vesivatsassa on myös

tavallisia vasta-aineita, näiden pitoisuus on vain noin 5 % monoklonaalisen vasta-aineen pitoisuudesta. Koska sitä paitsi nämä tavalliset vasta-aineet eivät ole ihmisen vastaisia spesifisyydeltään, eristetyistä vesivatsoista ja seerumista saatu monoklonaalinen vasta-aine ei sisällä käytännöllisesti katsoen lainkaan kontaminoivia ihmisen vastaisia immunoglobuliineja. Tämän monoklonaalisen vasta-aineen tiitteri on korkea (aktiivinen laimennuksissa 1:50 000 ja myös suuremmissa laimennuksissa), ja sen spesifisen ja ei-spesifisen immunoglobuliinin suhde on korkea (noin 1/20). Sellaiset muodostuneet immunoglobuliinit, joiden rakenteessa on kevyitä K-myeloomaketjuja, ovat ei-spesifisiä, ei-vaikuttavia peptidejä, jotka pelkästään laimentavat monoklonaalista vasta-ainetta vaikuttamatta haitallisesti sen spesifisyyteen.

Esimerkki 1

Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistus

A. Immunisointi ja somaattinen solujen hybridisointi

Naaraspuolisiin CAF₁-hiiriin (Jackson Laboratories, hiirien ikä 6-8 viikkoa) ruiskutettiin intraperitoneaalisesti 2×10^7 ihmisen tymosyyttiä 0,2 ml:ssa fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta 14 päivän välein. Neljän päivän kuluttua kolmannelta immunisointikerrasta hiiristä poistettiin pernat, ja näistä valmistettiin yhtä solulaatua sisältävä suspensio puristamalla kudus ruostumattomasta teräksestä valmistetun seulan lävitse.

Solujen yhdistäminen suoritettiin Kohlerin ja Milsteinin kehittämällä menetelmällä. 1×10^8 splenosyyttiä yhdistettiin 0,5 ml:ssa yhdistämisväliainetta, joka koostui 35 %:sta polyetyleeniglykolia (PEG 1000) ja 2 %:sta dimetyylisulfoksidia RPMI-1640 -väliaineessa (Gibco, Grand Island, NY), 2×10^7 P3X63Ag8Ui-myeloomasoluun, jotka toimitti tohtori M. Scharff, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY. Nämä myeloomasolut erittävät IgG₁:n K-kevyitä ketjuja.

B. Hybridoman eristys ja kasvatus

Kun solut oli yhdistetty, niitä viljeltiin HAT-väliaineessa (sisälsi hypoksantiinia, aminopteriiniä ja tymidiiniä) 37°C:ssa 5 % hiilidioksidia sisältävässä kosteassa
 5 atmosfäärissä. Useita viikkoja myöhemmin 40-100 µl viljelmien hybridomapitoista pintaliuosta siirrettiin pellettiin, joka sisälsi 10⁶ perifeeristä lymfosyyttiä, jotka oli jaettu E-rosettipositiivisiin (E⁺) ja E-rosettinegatiivisiin (E⁻) populaatioihin, nämä oli valmistettu terveiden ihmisten ve-
 10 restä Mendesin kuvaamalla menetelmällä [J. Immunol. 111 (1973) 860]. Näihin soluihin sitoutuneet hiiren hybridoman tuottamat vasta-aineet todettiin epäsuoralla immunofluorenssimenetelmällä. Viljelmien pintaliuoksissa inkuboidut solut värjättiin fluoresiinilla käsitellyllä vuohessa val-
 15 mistetulla anti-hiiri-IgG:llä (G/M FITC) (Meloy Laboratories, Springfield, VA, F/p = 2,5) ja fluoresoivat vasta-aineella värjäytyt solut analysoitiin sen jälkeen soluluorografilla FC200/4800A (Ortho Instruments, Westwood, MA) esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Hybridomaviljelmät, jotka sisälsivät
 20 spesifisesti E⁺-lymfosyyttien (T-solujen) ja/tai tymosyyttien kanssa reagoivia vasta-aineita, valikoitiin ja kloonattiin kahdesti rajaavalla laimennusmenetelmällä syöttösolujen läsnäollessa. Sen jälkeen kloonit siirrettiin intraperitoneaalisesti ruiskuttamalla 1×10^7 tietyn kloonin solua
 25 (0,2 ml:n tilavuudessa) CAF₁-hiireen, joka oli esikäsitelty 2,6,10,14-tetrametyylipentadekaanilla, jota toimittaa Aldrich Chemical Company kauppanimellä "Pristine". Näiden hiirien pahanlaatuisia vesivatsoja käytettiin sen jälkeen lymfosyyttien karakterisoimiseen esimerkissä 2 esitetyllä
 30 tavalla. Hybridivasta-aineen OKT8 todettiin standardimenetelmillä kuuluvan IgG_{2a}-alaluokkaan.

Esimerkki 2OKT8-vasta-aineen reaktiivisuuden karakterisointiA. Lymfosyyttipopulaatioiden eristäminen

5 Terveiden vapaaehtoisten verenluovuttajien (ikä
15 15 - 40 vuotta) verestä erotettiin perifeeriset yksitumai-
set verisolut Ficoll-Hypaque-tiheysgradienttisentrifugoin-
timenetelmällä (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NH)
Boym'in esittämällä tavalla [Scand. J. Clin. Lab. Invest.
21 (suppl. 97) (1968), s. 77]. Fraktioimattomat yksitumai-
10 set solut erotettiin pinta-Ig⁺ (B-) ja pinta-Ig⁻ (T- ja
nollasolu)-populaatioiksi käyttämällä Sephadex G-200 anti-
F(ab')₂-pylväskromatografiaa, menetelmällä, jonka ovat ku-
vanneet Chess et al., J. Immunol. 113 (1974). T-solut
erotettiin talteen E-rosettoimalla Ig⁻-populaatio 5 %:lla
15 lampaan punasoluja (Microbiological Associates, Bethesda,
MD). Rosetoitu seos sentrifugoitiin Ficoll-Hypaque-sentri-
fugissa ja talteenotettu E⁺-pelletti käsiteltiin 0,155-m
NH₄Cl:lla (10 ml 10⁸ solua kohti). Näin saatu T-solupopu-
laatio oli <2-%:isesti EAC-rosettipositiivinen ja
20 >95-%:isesti E-rosettipositiivinen standardimenetelmillä
määritettynä. Lisäksi rosetteja muodostamaton Ig⁻ (nolla-
solu)-populaatio erotettiin Ficoll-rajapinnalta. Tämä
jälkimmäinen populaatio oli <5-%:isesti E-positiivinen
ja ≤2-%:isesti sIg-positiivinen. Pinta-Ig⁺(B)-kanta ero-
25 tettiin Sephadex G-200-pylvästä eluoimalla normaalilla
ihmisen gammaglobuliinilla, kuten aikaisemmin on kuvattu.
Tämä populaatio oli >95-%:isesti pinta-Ig-positiivinen ja
<5-%:isesti E-positiivinen.

Normaaleja ihmisen luuydinsoluja saatiin terveiden
30 vapaaehtoisten luovuttajien taaemmasta suoliluuharjusta
punktiomenetelmällä.

B. Tymosyyttien eristäminen

Normaali ihmisen kateenkorvarauhanen saatiin poti-
lailta, joille oli tehty korjaavia sydänleikkauksia ja
35 joiden ikä vaihteli kahdesta kuukaudesta 14 vuoteen. Ka-
teenkorvarauhanen paloiteltiin, ja palaset asetettiin he-
tti 199(Gibco)-väliaineeseen, jossa oli 5 % vasikan sikiö-

seerumia, ne hienonnettiin huolellisesti pihdeillä ja sak-
silla ja sen jälkeen muodostettiin yhtä solulajia sisäl-
tävä suspensio puristamalla seos terässeulan läpi. Seuraa-
vaksi solut sentrifugoitiin Ficoll-Hypaque-sentrifugissa
5 ja pestiin kohdassa A kuvatulla tavalla. Näin saadut tymo-
syytit olivat >95-%:isesti elinkykyisiä ja ≥90-%:isesti
E-rosettipositiivisia.

C. T-solulinja ja T-solujen akuutin lymfoblastileu- kemian solut

10 T-solulinjat CEM, HSB-2 ja MOLT-4 toimitti tohtori
H. Lazarus (Sidney Farber Cancer Institute, Boston, MA).
Leukemiasolut saatiin 25:ltä T-solujen akuuttia lymfoblas-
tileukemiaa sairastavalta potilaalta. Nämä yksittäiset
kasvaimet oli aikaisempien kokeiden perusteella todettu
15 kuuluvan T-solukasvaimiin, koska kasvainsolut muodostivat
spontaanisti rosetteja lampaan punasolujen kanssa (>20 %
E⁺) ja koska ne reagoivat T-soluille spesifisten hetero-
antiseerumien, anti-HTL (B.K.)- ja A99-antiseerumin kans-
sa, kuten edellä on kuvattu. Kasvainpopulaatioita kylmä-
20 säilytettiin -196°C:ssa nestemäisessä typessä 10-%:isessa
dimetyylisulfoksidissa ja 20-%:isessä ihmisen AB-seerumis-
sa, kunnes ne karakterisoitiin pinnaltaan. Kaikki analy-
soidut kasvainpopulaatiot olivat >90-%:isesti blasteja
sytosentrifugivalmistesten Wright-Giemsa-morfologialtaan.

25 Esimerkki 3

Solufluorografinen analyysi ja solujen erotus

Monoklonaalisten vasta-aineiden ja kaikkien solu-
populaatioiden reaktiotuotteiden solufluorografinen ana-
lyysi suoritettiin epäsuoralla immunofluoresenssimenetel-
30 mällä, jossa solut värjättiin fluoresiiniin liitettyllä
vuohessa valmistetulla antihiiri-IgG:llä (G/M FITC) (Meyo
Laboratories), analyysiin käytettiin solufluorografia
FC200/4800A (Otho Instruments). Tällöin 10×10^6 solua kä-
siteltiin 0,15 ml:lla vasta-ainetta OKT5 laimennuksen ol-
lessa 1:500, soluja inkuboitiin 4°C:ssa 30 min ja pestiin
35 kahdesti. Solujen annettiin sen jälkeen reagoida 0,15 ml:n
kanssa G/M FITC (laimennus 1:40) 4°C:ssa 30 min, reaktio-

tuote sentrifugoitiin ja pestiin 3 kertaa. Nämä solut analysoitiin sen jälkeen solulufluorografilla, jossa kunkin solun aiheuttama fluoresenssi-intensiteetti rekisteröitiin pulssinkorkeusanalysointorilla. Reaktiivisuusmalli oli samanlainen laimennuksella 1:10 000, mutta suuremmilla laimennuksilla reaktiota ei tapahtunut. Taustavärjäyksen intensiteetti määritettiin 0,15 ml:lla suhteessa 1:500 laimennettua vesivatsanestettä, joka oli saatu intraperitoneaalaisesti ei-tuottavalla hybridikloonilla immunisoidusta CAF₁-hiirestä.

Kokeissa, joissa tutkittiin vasta-aine- ja komplementtivälitteistä lymfolyysiä, tymosyyttejä ja periferisiä T-soluja viljeltiin yön yli, minkä jälkeen seurasi selektiivinen hajotus ja sen jälkeen solut analysoitiin solulufluorografilla.

Esimerkki 4

Lymfoidipopulaatioiden hajotus monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla

40 x 10⁶ perifeeristä T-solua tai tymosyyttiä lisättiin 15 ml:n muoviputkeen (Falcon, Oxnard, CA). Solupelletteihin lisättiin 0,8 ml vasta-ainetta OKT3, OKT4 tai OKT8 tai tavallista vesivatsanestettä (vertailuaine), jotka oli laimennettu suhteessa 1:200 PBS:llä, seokset suspendoitiin ja inkuboitiin 20°C:ssa 60 minuutin ajan. Sen jälkeen vasta-aineella käsiteltyihin populaatioihin lisättiin 0,2 ml tuoretta kaniinin komplementtia, seos suspendoitiin ja sitä inkuboitiin edelleen 37°C:ssa 60 min vesihauteessa, joka oli liitetty ravistelijaan. Inkuboinnin päätyttyä solut sentrifugoitiin ja elinkykyiset solut määritettiin Trypan-sinisellä. Solut laskettiin, pestiin 2 x 5-%:isella FCS:llä ja asetettiin lopulliseen väliaineeseen RPMI 1640 (Grand Island Biological Company, Grand Island, NY), joka sisälsi 20 % ihmisen AB⁺-seerumia, 1 % penisilliini-streptomysiiniä, 200 mM L-glutamiinia, 25 mM HEPES-puskuria ja 0,5 % natriumkarbonaattia, ja seosta inkuboitiin yön yli 37°C:ssa kosteassa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 % CO₂.

Kuviossa 1 on esitetty solufluorografista saatu fluoresenssispektri normaaleille ihmisen tymosyyteille, joiden on annettu reagoida OTK₆:n ja muiden monoklonaalisten vasta-aineiden (laimennus 1:500) sekä G/M FITC:n kanssa. Taustafluoresenssivärjäys määritettiin lisäämällä kuhunkin populaatioon suhteessa 1:500 laimennettua vesivatsanestettä hiirestä, johon oli injektoitu ei-tuottavaa kloonია, ja inkuboimalla seosta.

Kuviossa 2 on esitetty tymosyyttien erilaistuminen kateenkorvassa.

Hybridooma valmistettiin, ja monoklonaalinen vasta-aine valmistettiin ja karakterisoitiin edellä olevissa esimerkeissä kuvatulla tavalla. Vaikkakin suuria määriä esillä olevaa vasta-ainetta valmistettiin injektoimalla esillä olevaa vasta-ainetta intraperitoneaalisesti hiiriin ja erottamalla hiiristä pahanlaatuiset vesivatsat, on selvää, että hybridomaa voidaan viljellä myös alalla hyvin tunnetuilla in vitro-menetelmillä, jolloin vasta-aine erotetaan viljelmien pintanesteestä.

Taulukosta 1 ilmenee monoklonaalisten vasta-aineiden OKT6, OKT8, OKT9 ja OKT10 reaktiivisuus ihmisen eri lymfoidisolupopulaatioiden kanssa. Monoklonaalinen vasta-aine OKT8 reagoi noin 30 %:n kanssa ihmisen normaaleja T-soluja, noin 80 %:n kanssa ihmisen normaaleja tymosyyttejä, alle 2 %:n kanssa luuydinsoluja eikä lainkaan B-solujen eikä nollasolujen kanssa. Muun muassa tämän reaktiivisuuskaavan avulla esillä oleva vasta-aine OKT8 voidaan todeta ja erottaa muista vasta-aineista.

Kuviossa 1 on esitetty solufluorografista saatu fluoresenssispektri ihmisen normaaleista tymosyyteistä koostuvalle suspensiolle, jonka on annettu reagoida vasta-aineiden OKT3, OKT4, OKT5, OKT6, OKT8, OKT9 ja OKT10 (kaikkien laimennussuhde 1:500), sekä G/M FITC:n kanssa. Samanlaiset reaktiivisuuskaavat saatiin 12 muulle tutkitulle ihmisen normaalille tymosyyttipopulaatiolle. Kuvioista ilmenee, että reaktiivisuusprosentissa ja fluoresenssi-intensiteetissä on merkittäviä eroja kaikkien tutkittujen

monoklonaalisten vasta-aineiden välillä. Esimerkiksi OKT9 reagoi noin 10 %:n kanssa tymosyyttejä fluoresenssi-intensiteetin ollessa heikko, kun taas OKT5, OKT6, OKT8 ja OKT10 reagoivat noin 70 %:n kanssa tymosyyttejä fluoresenssi-intensiteetin ollessa voimakkaampi. OKT4, joka reagoi 75 %:n kanssa tymosyyttejä, sijoittuu fluoresenssi-intensiteetin suhteen OKT9:n ja sellaisten monoklonaalisten vasta-aineiden väliin, joiden fluoresenssi-intensiteetti on voimakkaampi.

- 10 Lisäksi kuviosta 1 ilmenee, että noin 15 % tymosyyteistä voidaan todeta OKT3:lla käyttämällä epäsuoraa immunofluoresenssimenetelmää. OKT1, joka reagoi tymosyytien kanssa käytännöllisesti katsoen samalla tavalla kuin OKT3, ei tällöin tule esiin. Myös kuviossa 1 esitetyn reaktiivisuuskaavan avulla esillä oleva vasta-aine OKT8 voidaan todeta ja erottaa muista vasta-aineista.

- 15 Taulukosta 2 ilmenee erilaisten monoklonaalisten vasta-aineiden määrittelymien antigeenien jakaantuminen ihmisen perifeerisiin T-soluihin ja lymfosyytteihin; jakaantuminen on määritetty sarjalla hajotuskokeita esimerkiksi 3 kuvatulla tavalla. Koska ainoastaan OKT3, OKT4 ja OKT8 olivat komplementin sitovia monoklonaalisia vasta-aineita, näitä kolmea käytettiin määrittelyssä.

- 20 Taulukosta 2A ilmenee, että koko T-solupopulaatio reagoi OKT3:n kanssa, kun taas OKT4, OKT5 ja OKT8 reagoivat 60 %:n, 25 %:n ja 34 %:n kanssa T-soluja. Hajotus OKT4:llä ja komplementillä vähensi solujen kokonaislukumäärää 62 %:lla ja tuhosi spesifisesti OKT4⁺-populaation. Lisäksi OKT5⁺- ja OKT8⁺-solujen prosentuaalinen osuus kasvoi, mutta OKT5⁺- ja OKT8⁺-solujen kokonaismäärä ei muuttunut.
- 30 Tästä kokeesta voitiin päätellä, että OKT4⁺-populaatio erosi OKT5⁺- ja OKT8⁺-populaatioista. Lisää tukea tälle olettamukselle saatiin kokeesta, jossa T-soluja hajotettiin OKT8:lla ja komplementillä. Tällöin OKT4⁺-T-solujen prosentuaalinen osuus kasvoi, kokonaislukumäärä pysyi samana, ja OKT8⁺- ja OKT5⁺-populaatiot tuhoutuivat. Lisäksi nämä kokeet osoittivat, että OKT8⁺-populaatio oli vastakkainen OKT4⁺-populaatiolle sisältäen koko OKT5⁺-T-solujakeen.
- 35

Samanlaiset ihmisen tymosyyteillä suoritettut kokeet antoivat erilaisia tuloksia. Taulukosta 2B ilmenee, että noin 75 % tymosyyteistä oli OKT4-positiivisia tai OKT8-positiivisia. Sitä paitsi hajotettaessa soluja OKT4:llä tai OKT8:lla ainoastaan 25 % tymosyyteistä jäi jäljelle. Suurin osa jäljelle jääneistä tymosyyteistä reagoi OKT3:n kanssa, kun taas pieni osa niistä reagoi OKT6:n kanssa. Nämä havainnot osoittavat, että suurimmalla osalla ihmisen tymosyyteistä on OKT4-, OKT5-, OKT6- ja OKT8-pinta-antigeenit samassa solussa. Lisäksi taulukosta 2 ilmenee, että käsiteltäessä soluja OKT8:lla ja OKT4:llä OKT3-antigeenin sisältävien kypsien tymosyyttien määrä kasvaa huomattavasti. Täten suurin osa OKT3:n kanssa reagoivista tymosyyteistä on jo erottunut OKT4⁺- ja OKT8⁺-jakeiksi, koska suurin osa soluista, jotka eivät reagoineet OKT4:n ja OKT8:n kanssa, olivat OKT3-positiivisia. Jos OKT3⁺-alapopulaatio olisi sekä OKT4-positiivinen että OKT8-positiivinen, hajoitus jommalla kummalla monoklonaalisella vasta-aineella olisi tuhonnut OKT3:n kanssa reagoivat tymosyytit.

Jotta saataisiin edelleen selville OKT3:n kanssa reagoivien tymosyyttialapopulaatioiden suhde muiden monoklonaalisten vasta-aineiden määrittelyyn tymosyyttifraktioihin, käsiteltiin tymosyyttejä OKT3:lla ja komplementillä ja käsittelyssä jäljelle jääneitä soluja verrattiin siten käsittelemättömiin tymosyyttipopulaatioihin. Taulukosta 2B ilmenee, että OKT3 ja komplementti poisti 25 % tymosyyteistä. Sen sijaan OKT4-, OKT5-, OKT6- ja OKT8-vasta-aineiden kanssa reagoivat populaatiot pysyivät käytännöllisesti katsoen muuttumattomina. Näistä havainnoista voidaan päätellä, että suurin osa OKT6-markkerin sisältävistä tymosyyteistä kuuluu OKT3⁻-populaatioon. Lisäksi tuloksista voidaan päätellä, että tymosyytit, jotka samanaikaisesti ilmentävät OKT4:n, OKT5:n ja OKT8:n määrittelemät antigeenit, rajoittuvat samalla tavalla OKT3⁻-populaatioon. On myös huomattava, että OKT9:n kanssa reagoiva tymosyyttipopulaatio ei vähentynyt käsiteltäessä fraktioimattomia tymosyyttejä OKT3:lla ja komplementillä, mikä osoittaa, että OKT9⁺-alapopulaatio rajoittuu suurimmaksi osaksi OKT3⁻-tymosyyttipopulaatioon.

Näiden tulosten pohjalta on ollut mahdollista määrittää ihmisen tymosyyttien kehitysvaiheet kateenkorvassa.

Kuviosta 2 ilmenee, että käytännöllisesti katsoen kaikissa tymosyyteissä on OKT10-markkeri. Lisäksi tymosyytit saavat varhaisessa vaiheessa OKT9-antigeenin (Thy1 ja Thy2). Tämä vaihe käsittää vain pienen osan tymosyyteistä, ja siihen kuuluu noin 10 % ei-fraktioidusta populaatiosta.

Sen jälkeen ihmisen tymosyytit saavat OKT6:n määrittelemän tymosyyttiantigeenin ja samanaikaisesti ne ilmentävät OKT4:n, OKT5:n ja OKT8:n (Thy4). Jälkimmäinen alapopulaatio edustaa valtaosaa tymosyyteistä, ja siihen kuuluu yli 70-80 % tymosyyttipopulaatiosta. Tymosyyttien edelleen kypsyessä niiden OKT6-reaktiivisuus häviää, ne tulevat reaktiivisiksi OKT3:n (ja OKT1:n) kanssa ja erottuvat OKT4⁺- ja OKT5⁺/OKT8⁺-jakeiksi (Thy7 ja Thy8). Näyttää siltä, että viimeisessä vaiheessa tymosyyttien irrotessa kateenkorvasta perifeeristen T-solujen joukkoon, niiden OKT10-markkeri häviää, sillä tämä antigeeni puuttuu käytännöllisesti katsoen kaikilta perifeerisiltä T-lymfo-syyteiltä. Näiden kolmen pääkehitysvaiheen välisiä mahdollisia siirtymävaiheita on merkitty kuviossa 2 Thy3:lla, Thy5:llä ja Thy6:lla.

Koska akuutin T-solujen lymfoblastileukemian on arveltu johtuvan epäkypsistä tymosyyteistä, määritettiin T-ALL-leukemiaa sairastavista henkilöistä eristettyjen kasvainsolujen ja mainittujen oletettujen tymosyyttien kehitysvaiheiden välinen suhde. Määrittämisessä käytettiin T-ALL-leukemiaa sairastavista henkilöistä eristettyä 25 kasvainsolupopulaatiota ja kolmea T-solulinjaa, jotka oli etukäteen tutkittu tavanomaisilla anti-T-solureagensseilla ja E-rosetoinnilla. Taulukosta 3 ilmenee, että suurin osa T-ALL-leukemiasoluista reagoi joko pelkän OKT10:n tai OKT9:n ja OKT10:n kanssa, mutta solut eivät reagoineet muiden monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa. Täten 15/25 tutkituista tapauksista näytti sisältävän varhaisen tymosyyttivaiheen antigeeneja (vaihe 1).

Sitä vastoin 5/25 tapauksista reagoi OKT6:n kanssa, mistä voidaan vetää se johtopäätös, että ne ovat peräisin

kypsemmästä tymosyyttipopulaatiosta (vaihe 2). Tämä T-ALL-ryhmä reagoi eri tavoin OKT4:n, OKT8:n ja OKT9:n kanssa, kuten taulukosta 3 ilmenee. Kahdella viidesosalla potilaista oli sellaisia kasvainsoluja, jotka sisälsivät suurimman osan tavallisista tymosyyttiantigeeneista, mukaan lukien OKT4, OKT6 ja OKT8. On huomattava, että OKT5 ei esiinny yhdessäkään näistä viidestä vaiheen 2 kasvaimesta, vaikkakin OKT8-reaktiivisuutta havaittiin. Tästä jälkimmäisestä tuloksesta voidaan selvästi vetää se johtopäätös, että OKT5 ja OKT8 määrittelevät eri antigeeneja tai eri determinantteja samassa antigeenissa. Lopuksi 1/25:lla potilaista oli sellaisia kasvaimia, jotka olivat peräisin kypsästä tymosyyttipopulaatiosta (vaihe 3) OKT3-reaktiivisuuden perusteella määritettynä. Tämän henkilön kasvain oli lisäksi reaktiivinen OKT5:n, OKT8:n ja OKT10:n kanssa. Tutkituista 25 leukemiapopulaatiosta ainoastaan neljä oli sellaista, joita ei voitu selvästi luokitella. Näistä kolme oli OKT4- ja OKT8-positiivisia, mutta ne eivät reagoineet OKT3:n eikä OKT6:n kanssa, jolloin ne olivat todennäköisimmin Thy4:n ja Thy7, 8:n välisiä siirtymävaiheita. Yksi 25 tapauksesta osoittautui olevan Thy3:n ja Thy4:n välinen siirtymävaihe, sillä se oli reaktiivinen OKT8:n ja OKT10:n kanssa.

Myös T-ALL-kasvainpopulaatioista peräisin olevissa T-solulinjoissa oli soluja, jotka edustivat tiettyä tymosyyttien kehitysvaihetta. Taulukosta 4 ilmenee, että HSB-2 reagoi yksinomaan OKT9:n ja OKT10:n kanssa, ja täten se määrittelee vaiheesta 1 peräisin olevan kasvainpopulaation. Sitä vastoin CEM-T-solulinja reagoi OKT4:n, OKT6:n, OKT9:n ja OKT10:n kanssa ja se osoittautui olevan peräisin vaiheen 2 tymosyyteistä. Lopuksi solulinja MOLT-4 on ilmeisesti HSB-2:n ja CEM:in välillä oleva leukemiatransformaatio, sillä se ekspressoi OKT6:n, OKT8:n, OKT9:n ja OKT10:n.

Koska myöhempien vaiheiden (esim. vaiheen II) T-solujen akuuttia lymfoblastileukemiaa sairastavien henkilöiden on todettu parantuvan täydellisemmin kuin vaiheen I ALL-leukemiaa sairastavien, OKT8-vasta-aineen avulla voidaan vetää johtopäätöksiä T-solujen ALL-leukemiaa sairastavan henkilön prognoosista.

Taulukosta 5 ilmenee perifeeristen T-solujen ja T-solujakeiden pitoisuuksien ja eri tautitilojen välinen suhde. Näitä suhteita voidaan käyttää terapeuttisiin tar-
 koituksiin tautitilojen aiheutuessa jonkin T-solujakeen
 5 kohonneesta pitoisuudesta (esim. tyyppiä I oleva agamma-
 globulinemia). Tällöin potilaalle, jolla esiintyy ylimää-
 rin jotakin T-solujaetta, annetaan sopivaa monoklonaalis-
 ta vasta-ainetta, jolloin ylimäärä saadaan vähenemään tai
 kokonaan poistetuksi.

10 Myös taulukoissa 2 - 5 esitettyjen suhteiden
 avulla OKT8-vasta-aine voidaan todeta ja erottaa muista
 vasta-aineista.

Muita monoklonaalisia vasta-aineita tuottavia
 samojen hakijoiden valmistamia hybridomeja (OKT1, OKT3,
 15 OKT4 ja OKT5) on kuvattu seuraavissa FI-patenttihakemuk-
 sissa 800846, 801343, 801342 ja 802917. Näiden lisäksi
 muita monoklonaalisia vasta-aineita tuottavia samojen ha-
 kijoiden valmistamia hybridomeja (OKT6, OKT9 ja OKT10) on
 kuvattu FI-patenttihakemuksissa 803755, 803756 ja 803757.

20 Kyseisen vasta-aineen OKT8 havaittiin kuuluvan
 IgG_{2a}-alaluokkaan, joka on yksi hiiren IgG:n neljästä
 alaluokasta. Nämä immunoglobuliini G:n alaluokat eroavat
 toisistaan ns. "kiinteiltä" alueiltaan, vaikkakin tietyl-
 le antigeenille spesifisen vasta-aineen rakenteessa on ns.
 25 "vaihtuva" alue, joka on toiminnallisesta samanlainen
 riippumatta siitä, mihin immunoglobuliini G:n alaluokkaan
 se kuuluu. Toisin sanoen monoklonaalinen vasta-aine, jol-
 la on edellä kuvatut tunnusmerkit, voi kuulua alaluokkiin
 IgG₁ - IgG_{2a}, IgG_{2b} tai IgG₃ tai luokkiin IgM tai IgA tai
 30 muihin Ig-luokkiin. Näiden luokkien tai alaluokkien erot
 eivät vaikuta vasta-aineen reaktiivisuuden selektiivisyy-
 teen, mutta ne voivat vaikuttaa siihen, miten vasta-aine
 reagoi myöhemmin muiden aineiden, esimerkiksi komplemen-
 tin tai anti-hiiri-vasta-aineiden kanssa. Vaikka käsillä
 35 oleva vasta-aine kuuluu spesifisesti IgG_{2a}-alaluokkaan,
 edellä kuvatulla tavalla reagoivat vasta-aineet on tarkoi-
 tettu kuuluviksi käsillä olevan keksinnön suojapiiriin

riippumatta siitä, mihin immunoglobuliiniluokkaan tai -alaluokkaan ne kuuluvat.

Esillä olevaa vasta-ainetta OKT8 voidaan käyttää tymosyyttien erilaistumisen toteamiseen ja tutkimiseen, kuten kuviossa 2 on esitetty.

Tautitiloja (esim. akuuttia tarttuvaa mononukleootia tai pahanlaatuisia tauteja, kuten vaiheen II ALL-leukemiaa), jotka aiheutuvat OKT8⁺-solujen ylimäärästä, voidaan hoitaa antamalla potilaalle terapeuttisesti vaikuttava määrä OKT8-vasta-ainetta. Reagoimalla selektiivisesti OKT8⁺-antigeenin kanssa, vaikuttava määrä OKT8-vasta-ainetta vähentää ylimäärin esiintyviä OKT8⁺-soluja vaikuttaen täten taudin kulkuun edullisesti. Vasta-ainetta OKT8 voidaan sisällyttää terapeuttisiin koostumuksiin, jotka muodostuvat vaikuttavista määristä OKT8-vasta-ainetta ja farmaseuttisesti hyväksyttävistä kantaja-aineista.

Taulukko 1

Monoklonaalisten vasta-aineiden reaktiivisuus ihmisen lymfoidipopulaatioiden kanssa

	Monoklonaalinen vasta-aine	Perifeerinen veri		Luuydin (6)	Kateenkorva (22)
		E ⁺	E ⁻		
25	OKT6	0 %	0 %	0 %	70 %
	OKT8	30 %	0 %	<2 %	80 %
	OKT9	0 %	0 %	0 %	≤10 %
	OKT10	<5 %	10 %	≤20 %	95 %

Suluissa olevat luvut merkitsevät tutkittujen näytteiden määrää.

%-arvot ovat keskiarvoja.

Taulukko 2

Monoklonaalisten vasta-aineiden määrittelymien antigeenien jakaantumiserot ihmisen perifeerisissä T-soluissa ja tymosyyteissä

Lymfoidipopulaatio		Jäljelle jää- neiden solujen kokonaislukumäärä									Jäljelle jääneiden solujen reaktiivuus (%) monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa				
		OKT3	OKT4	OKT5	OKT6	OKT8	OKT9	OKT10							
A. Perifeeriset T-solut															
Ilman käsittelyä ^x	40 x 10 ⁶	98	60	25	0	34	-	-							
OKT4 + C [†]	15,2 x 10 ⁶	95	0	70	0	95	-	-							
OKT8 + C'	25,2 x 10 ⁶	95	92	0	0	0	-	-							
B. Tymosyytit															
Ilman käsittelyä ^x	40 x 10 ⁶	30	75	70	65	75	8	92							
OKT4 + C'	10 x 10 ⁶	80	0	85	10	55	6	75							
OKT8 + C'	9,5 x 10 ⁶	85	65	0	13	0	5	85							
OKT3 + C'	30 x 10 ⁶	0	60	80	82	90	12	86							

24

^xKäsittelemättömiä populaatioita ei re-analyysillä pystytty erottamaan pelkästään komplementilla käsitellyistä populaatioista. Ei-spesifinen hajoaminen oli $\leq 5\%$ kaikissa tapauksissa. Tulokset edustavat kuutta koetta.

[†]C' = komplementti

75366

Taulukko 3

Leukemiasolujen (akuutti T-solujen lymfoblastileukemia) pintaominaisuudet

Erilaistumisaste	Reaktiivisuus monoklonaalisten vasta-ai- neiden kanssa	Tutkittujen T-ALL- tapauksen lukum.
------------------	---	--

OKT3	OKT4	OKT5	OKT6	OKT8	OKT9	OKT10	(n = 25)
------	------	------	------	------	------	-------	----------

Vaihe 1

A. Esitymosyytti (Thy1)+	-	-	-	-	-	++	7
--------------------------	---	---	---	---	---	----	---

B. Tymosyytin varhaisaste (Thy2)	-	-	-	-	+	+	8
-------------------------------------	---	---	---	---	---	---	---

Vaihe 2

Tavallinen tymosyytti

(Thy3)	-	+	-	+	+	+	1
--------	---	---	---	---	---	---	---

(Thy4)	-	+	-	+	+	+	1
--------	---	---	---	---	---	---	---

(Thy3-4)	-	-	-	+	-	+	2
----------	---	---	---	---	---	---	---

(Thy4-6)	-	-	-	+	-	+	1
----------	---	---	---	---	---	---	---

Vaihe 3

Kypsä tymosyytti (Thy8)	+	-	+	-	+	+	$\frac{1}{21} \times$
----------------------------	---	---	---	---	---	---	-----------------------

*Tutkittaviin T-ALL-tapauksiin kuului myös neljä muuta kasvainta, joita ei voitu helposti luokitella vaiheisiin 1-3. Ks. testiä, jossa niiden karakterisointi on yksityiskohtaisesti esitetty

+Thy-merkintä viittaa kuvioon 2.

+Reaktiivisuus oli positiivinen (+), jos spesifinen fluoresenssi oli Z30 & taustan yläpuolella, ja reaktiivisuus oli negatiivinen (-), jos spesifistä fluoresenssia ei pystytty erottamaan taustaväriäyksestä kasvainsolususpensioissa.

Taulukko 4

75366

Solulinjojen reaktiivisuus monoklonaalisten vasta-
aineiden kanssa

Solulinja	OKT3	OKT4	OKT5	OKT6	OKT8	OKT9	OKT10
5 HSB-2	- ^x	-	-	-	-	+	+
CEM	-	+	-	+	+	+	+
MOLT-4	-	-	-	+	+	+	+

^xKriteerit (-)- ja (+)-reaktiivisuudelle olivat samat kuin taulukossa 3.

Perifeeristen T-solujen pitoisuudet eri tautitiloissa

5	Tautitila	T-solujen pitoisuudet				
		<u>OKT3⁺</u>	<u>OKT4⁺</u>	<u>OKT5⁺</u>	<u>OKT8⁺</u>	<u>OKT6⁺</u>
	Primäärinen maksa- kirroosi (2)	N	+	-	-	-
10	Multippeliskleroosi (pitkälle edennyt) (8)	-	N	-	-	-
	Myasthenia Gravis (ei hoidettu varhaisessa vaiheessa) (3)	0	0	0	0	0
	Akuutti elinsiirto (3)	0 ... -	-	0	+	+
15	Agammaglobulinemia					
	Tyyppi I			+		
	Tyyppi II		0			
20	Hyper IgE (4)	-	N	0 ... -	0 ... -	-
	Akuutti mononukleoosi- infektio (4)*	+	0 ... --	++	++	0
	Hodgkinsin tauti					
25	Vaiheet I & II	N	N	N	N	0
	Vaiheet III & IV	--	N	N	N	0
	Psoriasis (3/5)	N	+ ... ++	N	N	0

30 N = normaali pitoisuus

O = puuttuu

+ = normaalia suurempi

++ = huomattavasti normaalia suurempi

- = normaalia pienempi

35 -- = huomattavasti normaalia pienempi

*) Nämä pitoisuudet palaavat normaaleiksi noin viikkoa aikaisemmin kuin kliiniset oireet häviävät

Suluissa olevat luvut ilmaisevat tutkittujen potilaiden lukumäärän

1. Menetelmä IgG-luokkaan kuuluvan komplementin
sitovan monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi, joka
5 vasta-aine

a) reagoi heikentäjä-T-solujen kanssa (noin 30 %
ihmisen normaaleista T-soluista), alle 2 %:n kanssa ihmi-
sen normaaleja luuydinsoluja eikä lainkaan B-solujen eikä
nollasolujen kanssa,

10 b) reagoi noin 80 %:n kanssa ihmisen normaaleja
tymosyyttejä,

c) reagoi noin 34 %:n kanssa käsittelemättömiä pe-
rifeerisiä T-soluja, 95 %:n kanssa perifeerisiä T-soluja,
jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL
15 8002 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella
ja komplementilla, ei lainkaan perifeeristen T-solujen
kanssa, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan
ATCC CRL 8014 avulla valmistetulla monoklonaalisella vas-
ta-aineella ja komplementilla, 75 %:n kanssa käsittelemät-
20 tömiä tymosyyttejä, 55 %:n kanssa tymosyyttejä, jotka on
etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8002 avulla
valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komple-
mentilla, 90 %:n kanssa tymosyyttejä, jotka on etukäteen
käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8001 avulla valmiste-
25 tulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla,
eikä lainkaan tymosyyttien kanssa, jotka on etukäteen käsi-
telty hybridisolulinjan ATCC CRL 8014 avulla valmistetulla
monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla,

d) reagoi ALL-T-soluvaiheiden kanssa, jotka kuuluvat
30 vaiheen Thy 3, Thy 4 tai Thy 4 - 6 tavallisiin tymosyyttei-
hin tai vaiheen Thy 8 myöhäisiin tymosyytteihin, mutta ei
reagoi ALL-T-soluvaiheiden kanssa, jotka kuuluvat vaiheen
I tymosyytteihin tai vaiheen Thy 3-4 tavallisiin tymosyyttei-
hin,

35 e) reagoi solulinjojen CEM- ja MOLT-4 kanssa, mutta
ei solulinjan HSB-2 kanssa, ja

f) määrittelee T-solupopulaation (OKT8⁺), jota
esiintyy normaalia pienempinä pitoisuuksina primäärisessä
maksakirroosissa ja multippeliskleroosissa, puuttuu koko-

75366

naan tai esiintyy normaalia pienempinä pitoisuuksina hyper-IgE:ssä, normaalia suurempina pitoisuuksina akuutissa elinsiirtoreaktiossa, huomattavasti normaalia suurempina pitoisuuksina akuutissa tarttuvassa mononukleosisissa, puuttuu
 5 täysin myasthenia graviksessa ja esiintyy normaaleina pitoisuuksina kaikissa Hodgkinsin taudin vaiheissa ja psoriasiksessa,

t u n n e t t u siitä, että menetelmään kuuluu seuraavat
 10 vaiheet:

- A) valmistetaan hybridooma ATCC CRL 8014
 - i) immunisoimalla hiiriä ihmisen tymosyyteillä,
 - ii) poistamalla pernat mainituista hiiristä ja valmistamalla pernasolususpensio,
 - 15 iii) yhdistämällä mainitut pernasolut hiiren myeloomasoluihin yhdistämiskatalyysaattorin läsnäollessa,
 - iv) laimentamalla ja viljelemällä yhdistettyjä soluja erillisissä syvennyksissä väliaineessa, jossa vapaat myeloomasolut eivät kasva,
 - 20 v) arvioimalla eri syvennyksien hybridoomapitoinen pintaneste sen suhteen, sisältääkö se E-rosettipositiivisille puhdistetuille T-soluille tai ihmisen tymosyyteille spesifistä vasta-ainetta,
 - vi) valikoimalla ja kloonamalla hybridooma ATCC
 - 25 CRL 8014, joka tuottaa vasta-ainetta, joka reagoi käytännöllisesti katsoen kaikkien ihmisen normaalien heikentäjä-T-solujen kanssa, alle 2 %:n kanssa ihmisen normaaleja luuydinsoluja eikä lainkaan ihmisen normaalien perifeeristen B-solujen eikä nollasolujen kanssa, ja
 - 30 B) valmistetaan monoklonaalinen vasta-aine
 - vii) viljelemällä hybridoomaa ATCC CRL 8014 sopivassa väliaineessa, ja
 - viii) ottamalla vasta-aine talteen mainitun hybridooman pintanesteestä.

2. Menetelmä IgG-luokkaan kuuluvan komplementin sitovan monoklonaalisen vasta-aineen valmistamiseksi, joka vasta-aine

5 a) reagoi heikentäjä-T-solujen kanssa (noin 30 % ihmisen normaaleista T-soluista), alle 2 %:n kanssa ihmisen normaaleja luuydinsoluja eikä lainkaan B-solujen eikä nollasolujen kanssa,

b) reagoi noin 80 %:n kanssa ihmisen normaaleja tymosyyttejä,

10 c) reagoi noin 34 %:n kanssa käsittelemättömiä perifeerisiä T-soluja, 95 %:n kanssa perifeerisiä T-soluja, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8002 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, ei lainkaan perifeeristen T-solujen
15 kanssa, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8014 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, 75 %:n kanssa käsittelemättömiä tymosyyttejä, 55 %:n kanssa tymosyyttejä, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8002 avulla
20 valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, 90 %:n kanssa tymosyyttejä, jotka on etukäteen käsitelty hybridisolulinjan ATCC CRL 8001 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla, eikä lainkaan tymosyyttien kanssa, jotka on etukäteen käsi-
25 telty hybridisolulinjan ATCC CRL 8014 avulla valmistetulla monoklonaalisella vasta-aineella ja komplementilla,

d) reagoi ALL-T-soluvaiheiden kanssa, jotka kuuluvat vaiheen Thy 3, Thy 4 tai Thy 4 - 6 tavallisiin tymosyytteihin tai vaiheen Thy 8 myöhäisiin tymosyytteihin, mutta ei
30 reagoi ALL-T-soluvaiheiden kanssa, jotka kuuluvat vaiheen I tymosyytteihin tai vaiheen Thy 3-4 tavallisiin tymosyytteihin,

e) reagoi solulinjojen CEM- ja MOLT-4 kanssa, mutta ei solulinjan HSB-2 kanssa, ja

35 f) määrittää T-solupopulaation (OKT8⁺), jota esiintyy normaalia pienempinä pitoisuuksina primäärisessä maksakirroosissa ja multipeliskleroosissa, puuttuu koko-

naan tai esiintyy normaalia pienempinä pitoisuuksina hyper-IgE:ssä, normaalia suurempina pitoisuuksina akuutissa elinsiirtoreaktiossa, huomattavasti normaalia suurempina pitoisuuksina akuutissa tarttuvassa mononukleosisissa, puuttuu

5 täysin myasthenia graviksessa ja esiintyy normaaleina pitoisuuksina kaikissa Hodgkinsin taudin vaiheissa ja psoriasiksessa,

t u n n e t t u siitä, että menetelmään kuuluu seuraavat vaiheet:

- 10 A) valmistetaan hybridooma ATCC CRL 8014
 - i) immunisoimalla hiiriä ihmisen tymosyyteillä,
 - ii) poistamalla pernat mainituista hiiristä ja valmistamalla pernasolususpensio,
 - iii) yhdistämällä mainitut pernasolut hiiren myeloomasoluihin yhdistämiskatalysaattorin läsnäollessa,
 - 15 iv) laimentamalla ja viljelemällä yhdistettyjä soluja erillisissä syvennyksissä väliaineessa, jossa vapaat myeloomasolut eivät kasva,
 - v) arvioimalla eri syvennyksien hybridoomapitoinen
 - 20 pintaneste sen suhteen, sisältääkö se E-rosettipositiivisille puhdistetuille T-soluille tai ihmisen tymosyyteille spesifistä vasta-ainetta,
 - vi) valikoimalla ja kloonamalla hybridooma ATCC CRL 8014, joka tuottaa vasta-ainetta, joka reagoi käytännöllisesti katsoen kaikkien ihmisen normaalien heikentäjä-T-solujen kanssa, alle 2 %:n kanssa ihmisen normaaleja luuydinsoluja eikä lainkaan ihmisen normaalien perifeeristen B-solujen eikä nollasolujen kanssa, ja
 - B) valmistetaan monoklonaalinen vasta-aine
 - 25 vii) siirtämällä hybridooma ATCC CRL 8014
 - 30 intraperitoneaalisesti hiiriin, ja
 - viii) ottamalla vasta-aine talteen hiirien pahanlaatuisesta vesivatsasta tai seerumista.

1. Förfarande för framställning av en monoklonal antikropp, som hör till IgG-klassen och binder komplement, och vilken antikropp

a) reagerar med suppressor-T-celler (ungefär 30 % av människans normala T-celler), med under 2 % av människans normala benmärgsceller och inte alls med B-celler eller nollceller,

b) reagerar med cirka 80 % av människans normala tymocyter,

c) reagerar med cirka 34 % av obehandlade perifera T-celler, med 95 % av perifera T-celler, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8002 framställd monoklonal antikropp och med komplement, inte alls med perifera T-celler, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8014 framställd monoklonal antikropp och med komplement, med 75 % av obehandlade tymocyter, med 55 % av tymocyter, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8002 framställd monoklonal antikropp och med komplement, med 90 % av tymocyter, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8001 framställd monoklonal antikropp och med komplement, och inte alls med tymocyter, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8014 framställd monoklonal antikropp och med komplement,

d) reagerar med ALL-T-cell-stadier, som hör till vanliga tymocyter i stadium Thy 3, Thy 4 eller Thy 4 - 6 eller till sena tymocyter i stadium Thy 8, men inte reagerar med ALL-T-cell-stadier, som hör till tymocyter i stadium I eller till vanliga tymocyter i stadium Thy 3-4,

e) reagerar med cellinjer CEM och MOLT-4, men inte med cellinjen HSB-2, och

f) definierar en T-cellpopulation (OKT^+), som förekommer i mindre halter än normalt vid primär levercirros och multipel skleros, saknas totalt eller förekommer i mindre halter än normalt vid hyper IgE, i större halter än normalt vid en akut transplantationsreaktion, i betydligt

större halter än normalt vid akut infektiös mononukleos, saknas totalt vid myasthenia gravis och förekommer i normala halter i samtliga stadier av Hodgkins sjukdom och psoriasis,

5 k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet omfattar de följande stegen: man

A) framställer hybridoma ATCC CRL 8014 genom

i) immunisering av möss med människans tymocyter,

ii) avlägsning av mjältarna från nämnda möss och

10 framställning av en mjältcellsuspension,

iii) fusionering av nämnda mjältceller med musmyelomceller i närvaro av en fusionskatalysator,

iv) utspädning och odling av de fusionerade cellerna i separata brunnar i ett medium, där fria myelomceller
15 inte växer,

v) evaluering av supernatanten i varje brunn som innehåller ett hybridoma med avseende på närvaro av en antikropp mot E-rosett-positiva, renade T-celler eller människans tymocyter,

20 vi) väljning och kloning av hybridoma ATCC CRL 8014, som producerar en antikropp, vilken reagerar med praktiskt taget alla människans normala suppressor-T-celler, med under 2 % av människans normala benmärgsceller och inte alls med människans normala perifera B-celler eller nollceller,
25 och

B) framställer den monoklonala antikroppen genom

vii) odling av hybridoma ATCC CRL 8014 i ett lämpligt medium, och

viii) tillvaratagande av antikroppen från supernatanten över nämnda hybridoma.
30

2. Förfarande för framställning av en monoklonal antikropp, som hör till IgG-klassen och binder komplement, och vilken antikropp

35 a) reagerar med suppressor-T-celler (ungefär 30 % av människans normala T-celler), med under 2 % av människans normala benmärgsceller och inte alls med B-celler eller nollceller,

b) reagerar med cirka 80 % av människans normala tymocyter,

5 c) reagerar med cirka 34 % av obehandlade perifera T-celler, med 95 % av perifera T-celler, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8002 framställd monoklonal antikropp och med komplement, inte alls med perifera T-celler, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8014 framställd monoklonal antikropp och med komplement, med 75 % av obehandlade tymocyter, med 55 % av tymocyter, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8002 framställd monoklonal antikropp och med komplement, med 90 % av tymocyter, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8001 framställd monoklonal antikropp och med komplement, och inte alls med tymocyter, som på förhand behandlats med en medelst hybridcellinjen ATCC CRL 8014 framställd monoklonal antikropp och med komplement,

20 d) reagerar med ALL-T-cell-stadier, som hör till vanliga tymocyter i stadium Thy 3, Thy 4 eller Thy 4 - 6 eller till sena tymocyter i stadium Thy 8, men inte reagerar med ALL-T-cell-stadier, som hör till tymocyter i stadium I eller till vanliga tymocyter i stadium Thy 3-4,

e) reagerar med cellinjer CEM och MOLT-4, men inte med cellinjen HSB-2, och

25 f) definierar en T-cellpopulation (OKT^+), som förekommer i mindre halter än normalt vid primär levercirros och multipel skleros, saknas totalt eller förekommer i mindre halter än normalt vid hyper IgE, i större halter än normalt vid en akut transplantationsreaktion, i betydligt större halter än normalt vid akut infektiös mononukleos, saknas totalt vid myasthenia gravis och förekommer i normala halter i samtliga stadier av Hodgkins sjukdom och psoriasis,

30

k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet omfattar
de följande stegen: man

- 5 A) framställer hybridoma ATCC CRL 8014 genom
 i) immunisering av möss med människans tymocyter,
 ii) avlägsning av mjältarna från nämnda möss och
framställning av en mjältcellsuspension,
 iii) fusionering av nämnda mjältceller med musmye-
lomceller i närvaro av en fusionskatalysator,
 iv) utspädning och odling av de fusionerade celler-
10 na i separata brunnar i ett medium, där fria myelomceller
inte växer,
 v) evaluering av supernatanten i varje brunn som
innehåller ett hybridoma med avseende på närvaro av en an-
tikropp mot E-rosett-positiva, renade T-celler eller män-
15 niskans tymocyter,
 vi) väljning och kloning av hybridoma ATCC CRL 8014,
som producerar en antikropp, vilken reagerar med praktiskt
taget alla människans normala suppressor-T-celler, med un-
der 2 % av människans normala benmärgsceller och inte alls
20 med människans normala perifera B-celler eller nollceller,
och
 B) framställer den monoklonala antikroppen genom
 vii) införande av hybridoma ATCC CRL 8014 i möss,
och
25 vii) tillvaratagande av antikroppen från mössens
maligna ascites eller serum.

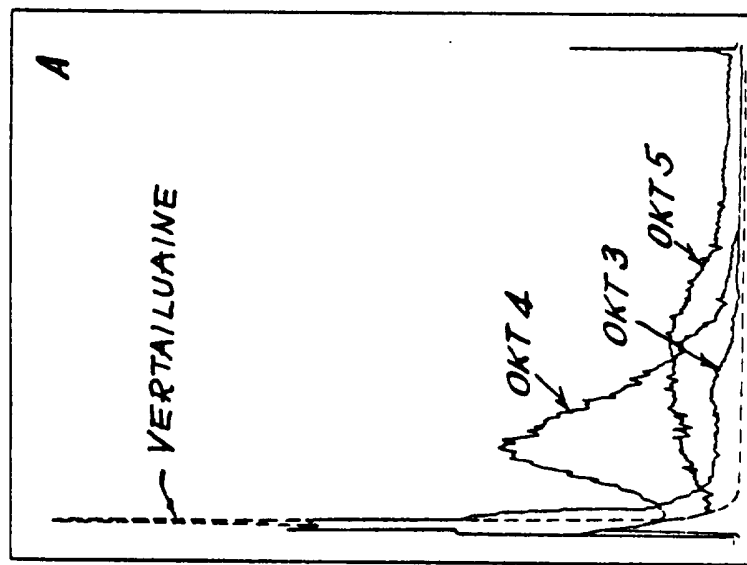
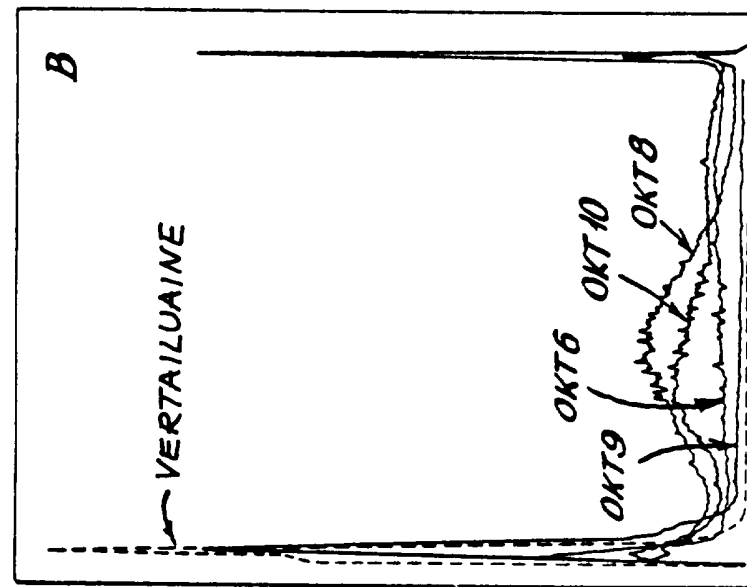
Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patentan-
sökningar: 801343 (C 12 N 5/00).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: Nature 256 (1975) 495-497.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 4061-4065.

Fig. 1.

MONOKLONAALISTEN VASTA-AINEIDEN VAIKUTUS IHMISEN TYMOSYTTIIN



SOLUJEN LUKUMÄÄRÄ

75366

FLUORESENSSI-INTENSITEETTI

75366

Fig. 2.

TYMOSYYTTIEN ERILAISTAMINEN IHMISSÄ

