FI000120309B

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120309 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **15.09.2009**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/34 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **934422**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag **08.10.1993**

(24) Alkupäivä - Löpdag **10.04.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **08.12.1993**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US1992/003091**

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

10.04.1991 US 683602 P 27.01.1992 US 826623 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • The Scripps Research Institute, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Kang, Angray, 7706 Hillside Drive, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Barbas, Carlos, 3131-H Via Alicante, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • Lerner, Richard A., 7750 Roseland Drive East, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Heterodimeerisiä reseptorikirjastoja, jotka käyttävät fagomideja

Heterodimeriska receptorbibliotek, som använder fagomider

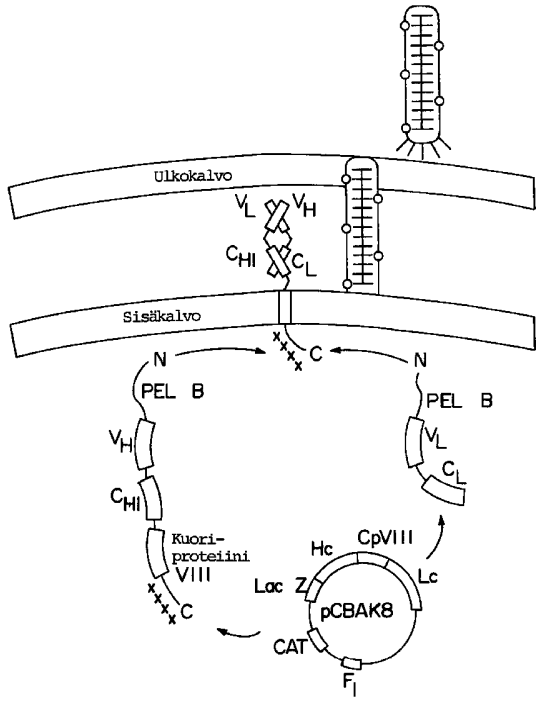
(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

WO 88/06630 A1,
McCafferty, J., et al., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains, Nature, 1990, vol. 348, pp 552-554,
Huse WD, et al., Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda, Science, 1989, vol. 246, pp 1275-81,
IL'Ichev AA, et al., M13 filamentous bacteriophage in protein engineering, Molekularnaya Biologiya, 1990, vol. 24, pp 530-35

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Filamenttifaagi, joka käsittää cpVIII-proteiinimatriksin ja kapseloi genomin, joka koodaa autogeenisesti kokoontuvan reseptorin, kuten jonkin vasta-aineen, ensimmäistä ja toista polypeptidiä, ja reseptori, joka muodostuu ensimmäisestä ja toisesta polypeptidistä, jotka ovat integroituneet matriksin pintaan filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoankkurialueen kautta, joka on fuusioitunut ainakin toiseen polypeptideistä.

Ett filamentfag, som innefattar ett cpVIII-proteinmatrix och kapslar en genom, som kodar för en autogeniskt sammansättande receptors, såsom en antikropps, första polypeptid och andra polypeptid, och en receptor bestående av en första polypeptid och en andra polypeptid, som är integrerade i matrixets yta genom filamentfagets höljeproteins membranförankringsregion, som är fusionerad med minst en av polypeptiderna.



Heterodimeerisiä reseptorikirjastoja, jotka käyttävät fagomideja - Heterodimeriska receptorbibliotek, som använder fagomider

Esillä oleva keksintö koskee kloonausvektoreita ja menetelmiä DNA-molekyylien, jotka pystyvät ilmentämään jonkin fuusiopolypeptidin säiemäisen faagipartikkelin pinnalla, kirjaston tuottamiseksi.

Säiemäiset bakteriofaagit ovat ryhmä toisiaan läheisesti muistuttavia viruksia, jotka infektoivat bakteereita. Niitä nimitetään säiemäisiksi, koska ne ovat pitkiä ja ohuita partikkeleita, jotka muodostuvat pitkänomaisesta kapselista, joka ympäröi deoksiribonukleiinihappoa (DNA), joka muodostaa bakteriofaagin genomin. Säiemäiset F pili bakteriofaagit (Ff-faagi) infektoivat ainoastaan gram-negatiivisia bakteereja adsorboitumalla spesifisesti F piluksien päähän ja niitä ovat fd, f1 ja M13.

Ff-faagin kypsä kapseli muodostuu faagin koodaaman viiden geenituotteen muodostamasta kuoresta: cpVIII:n, geenin VIII pää-kuoriproteiinituotteen, joka muodostaa kapselin bulkin; ja neljän pienemmän kuoriproteiinin, cpIII:n ja cpIV:n kapselin yhdessä päässä ja cpVII:n ja cpIX:n kapselin toisessa päässä. Kapselin kokonaispituus muodostuu 2 500-3 000:sta cpVIII:n kopiosta järjestäytyneessä kierukkamuodossa, joka muodostaa karakteristisen filamenttirakenteen. Suunnilleen viisi kopiota kustakin pienemmästä kuoriproteiinista on läsnä kapselin päissä. Geenin III koodaama proteiini (cpIII) on tyypillisesti läsnä 4-6 kopiona kapselin toisessa päässä ja toimii reseptorina, jonka avulla faagi kiinnittyy isäntäbakteeriinsa infektion alkuvaiheessa. Yksityiskohtaisten katsausten osalta Ff-faagin rakenteesta katso Rasched ym., Mikrobiol. Rev., 50:401-427 (1986) ja Model ym. julkaisussa The Bacteriophages, Volume 2, R. Calendar, toim., Plenum Press, ss. 375-456 (1988).

Ff-faagipartikkelin kokoontuminen edellyttää erittäin monimutkaista mekanismia. Faagipartikkelit eivät kokoonnu isäntäsolun sisällä; ne kokoontuvat pikemminkin sinä aikana, kun viruksen genomi tunkeutuu isäntäsolun kalvon läpi. Ennen tunkeutumista pää-kuoriproteiini cpVIII ja pienempi kuoriproteiini cpIII syntetisoituvat ja kulkeutuvat isäntäsolun kalvoon. Sekä cpVIII että cpIII ankkuroituvat isäntäsolun kalvoon ennen liittymistään kypsään partikkeliin. Lisäksi muodostuu viruksen genomi ja sen kuoren muodostaa cpV-proteiini. Tunkeutumistapahtuman aikana cpV-kuorinen genominen DNA irtautuu cpV-kuoresta ja samanaikaisesti

sen kuoren muodostavat uudelleen kypsät kuoriproteiinit. Kokoontumismekanismeja, jotka säätelevät näiden proteiinien siirtymistä kalvosta partikkeliin, ei tällä hetkellä tunneta.

Sekä cpIII- että cpVIII-proteiinissa on kaksi domeenia, jotka tuottavat signaaleja kypsän faagipartikkelin kokoontumista varten. Ensimmäinen domeeni on sekreetiosignaali, joka ohjaa vastasyntetisoituneen proteiinin isäntäsolun kalvolle. Sekreetiosignaali sijaitsee polypeptidin aminopäässä ja kohdentaa polypeptidin ainakin solun kalvoon. Toinen domeeni on kalvoonankkuroitumisalue, joka tuottaa signaaleja isäntäsolun kalvoon kiinnittymistä varten ja faagipartikkeliin liittymistä varten kokoontumisen aikana. Tämä toinen sekä cpVIII:n että cpIII:n signaali käsittää ainakin hydrofobisen alueen kalvon läpimenemistä varten.

cpVIII:a on tutkittu laajasti mallikalvoproteiinina, koska se pystyy integroitumaan kahden lipidikerroksen muodostamaan kaksoiskelmuun, kuten solukalvoon, epäsymmetrisessä suunnassa niin että aminohappopää on ulospäin ja emäksinen karboksipää on kalvon sisäänpäin. Kypsä proteiini käsittää noin 50 aminohappotähdettä, joista 11 tähdettä muodostaa karboksipään, 19 tähdettä muodostaa hydrofobisen transmembraanialueen ja loput tähteet käsittävät aminopään.

cpVIII:n sekreetiosignaalialuetta on tutkittu huomattavan paljon kalvoproteiinisynteesiä ja kalvoihin kohdentamista koskevan tutkimuksen viemiseksi eteenpäin. Vähän kuitenkin tiedetään muutoksista, joita cpVIII:n kalvoonankkuroitumisalueen rakenteessa voi olla, jotta faagipartikkelit pääsevät kokoontumaan.

cpIII:n sekvenssin manipuloiminen osoittaa, että hydrofobisten aminohappojen 23 C-terminaalisen aminohappotähteen aluetta, joka normaalisti on vastuussa kalvoonankkuroitumisfunktiosta, voidaan muuttaa eri tavoin ja säilyttää silti proteiinin kyky liittyä kalvoihin. Nuo ankkurialueeltaan modifioidut cpIII-proteiinit menettivät kuitenkin kykynsä komplementoida geneettisesti geenin III mutantteja, mikä osoittaa että vaatimuksia, joita kalvoankkurille asetetaan funktionaalisen kokoontumisen toteutumiseksi, ei ole selvitetty.

On kuvattu Ff-faagiin perustuvia ilmentämisvektoreita, joissa koko cpIII-aminohappotähdesekvenssi on muutettu insertoimalla siihen lyhyitä polypeptidi-"epitooppeja" [Parmely ym., Gene, 73:305-318 (1988) ja Cwirla ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382 (1990)] tai aminohappotähdesekvenssi, joka muodostaa yksiketjuisen vasta-ainedomeenin. McCafferty ym., Science, 348:552-554 (1990). Näitä hybridiproteiineja syntetisoitiin ja koottiin faagipartikkeleihin noin 5 kopiona

per partikkeli, jollaisena tiheytenä normaalia cpIII:a tavallisesti tavataan. Nämä ilmentyneet fuusioproteiinit sisältävät kuitenkin koko cpIII-aminohappotähdesekvenssin eikä julkaisuissa ole ehdotettu fuusioproteiineja, jotka käyttäisivät vain cpIII:n karboksipään kalvoonankkuroitumisaluetta.

Ei ole myöskään kuvattu mitään ekspressiosysteemiä, jossa faagin kuoriproteiini on muokattu niin, että se sallii sellaisen heterodimeerisen molekyylin kokoontumisen, joka on funktionaalinen ja pystyy integroitumaan faagipartikkelin kuoreen.

On keksitty uusi pintaintegraatiotekniikka heterodimeerisen yhdistelmägeenituotteen ilmentämiseksi yhdistelmägeenin sisältävän filamenttifaagin pinnalla. Keksinnössä käytetään filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoonankkuroitumisaluetta välineenä geenituotteen ja geenin liittämiseksi toisiinsa filamenttifaagin replikaation kokoontumisvaiheen aikana.

Toisin sanoen filamenttifaagin kahdentumisen aikana kuoriproteiinit kokoontuvat matriksiin, jonka sisällä on faagin genomi. Nyt on keksitty, että (1) faagin kokoontuminen ei keskeydy, kun läsnä on filamenttifaagin yhdistelmä-kuoriproteiineja, (2) filamenttifaagin yhdistelmä-kuoriproteiinit voivat integroitua kokoontuvaan matriksiin ja (3) integroitumista matriksiin voidaan ohjata niin, että se tapahtuu suunnassa, jossa pintaan päästään käsiksi.

Esillä olevaa keksintöä voidaan soveltaa edullisesti ennalta määrätyn spesifisyyden omaavien heterodimeeristen reseptoreiden tuotantoon, so. sitä voidaan käyttää vasta-aineiden, T-solureseptoreiden ja vastaavien, jotka sitovat jonkin ennalta valitun ligandin, tuottamiseen.

Siten esillä olevassa keksinnössä kytketään heterodimeerisen reseptorin tunnistamis- ja filamenttifaagin kahdentumistoiminnot yhteen menetelmässä jonkin heterodimeerisen reseptorin ja reseptoria koodaavan geenin eristämiseksi. Menetelmällä tuotetaan filamenttifaagi, joka muodostuu geenin VIII koodaamien proteiinien, jotka sisältävät jonkin yhdistelmä-genomin, matriksista. Yhdistelmä-genomi sisältää geenejä, jotka koodaavat heterodimeerisen reseptorin polypeptidejä. Heterodimeerinen reseptori integroituu ympäröivän matriksin pintaan filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoonankkuroitumisdomeenin kautta, joka fuusioituu peptidisidoksella translaation aikana yhteen heterodimeerisen reseptorin polypeptideistä. Heterodimeerisen reseptorin polypeptidit ja geenit, jotka koodaavat polypeptidejä, kytkeytyvät toisiinsa fyysisesti faagin kahdentumissyklin kokoontumisvaiheen aikana. Reseptorikuorisen faagin sitominen spesifisesti johonkin kiinteään kan-

tajaan antaa edullisesti käyttöön keinon eristää yhdistelmä-genomi, joka koodaa haluttua heterodimeeristä reseptoria, erilaisia yhdistelmägenomeja sisältävästä kirjastosta.

Eräässä toteutusmuodossa esillä oleva keksintö koskee vasta-ainemolekyyliä, joka käsittää raskaita ja kevyitä polypeptiketjuja, joista mainittu raskas polypeptidiketju käsittää V_H-domeenin, jonka molemmin puolin ovat aminoterminaalinen prokaryoottinen sekreetiosignaalialue ja karboksiterminaalinen filamenttifaagin kalvoonankkuroitumisalue, ja mainittu kevyt polypeptidiketju käsittää V_L-domeenin, joka on fuusioitunut aminoterminaaliseen prokaryoottiseen sekreetiosignaalialueeseen.

Erään toisen toteutusmuotonsa mukaan esillä oleva keksintö koskee fuusiopolypeptidin ilmentämisvektoria, joka käsittää ylävirtaan ja alavirtaan transloituvia DNA-sekvenssejä, jotka ovat operatiivisesti liittyneet toisiinsa nukleotidisekvenssillä, joka soveltuu insertti-DNA:n suunnattuun ligaatioon, mainitun ylävirran sekvenssin koodatessa prokaryoottista sekreetiosignaalia ja mainitun alavirran sekvenssin koodatessa filamenttifaagin kalvoankkuria, mainittujen transloituvien DNA-sekvenssien ollessa operatiivisesti liitetyt DNA-ilmentämissignaalien sarjaan mainittujen transloituvien DNA-sekvenssien ilmentämiseksi osina mainittua fuusiopolypeptidiä.

Täsmällisemmin sanottuna keksinnön kohteena ovat patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, patenttivaatimuksen 21 mukainen polypeptidi, patenttivaatimuksen 24 mukainen filamenttifaagipartikkelikirjasto, patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä DNA-molekyylikirjaston tuottamiseksi, patenttivaatimuksen 30 mukainen kirjasto, patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä filamenttifaagipartikkelien kirjaston diversiteetin muuttamiseksi, patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä epitoopin sitovan kompleksin affiniteetin kypsyttämiseksi ja patenttivaatimuksen 42 mukainen menetelmä jonkin ennalta valitun ligandin läsnäolon ilmaisemiseksi näytteessä.

Piirustuksissa, jotka muodostavat osan tätä selitystä:

kuvio 1 on immunoglobuliinimolekyyliä kuvaava kaavioesitys, jossa näkyvät sen tärkeimmät rakennepiirteet. Ympäröity alue raskaassa ketjussa on vaihteleva alue (V_H), polypeptidi, joka sisältää tämän alueen biologisesti aktiivisen (ligandin sitovan) osan, ja geeni, joka koodaa tätä polypeptidiä, tuotetaan esillä olevan keksinnön mukaisilla menetelmillä.

Kuvio 2A on kaavamainen esitys ihmisen IgG:n (alalaji IgG1) raskaasta ketjusta (H). Numerointi kulkee vasemmalla olevasta N-päästä oikealla olevaan C-päähän päin. Huomaa neljä domeenia, joista jokainen sisältää ketjunsisäisen disulfidisidoksen (S-S), joka ulottuu suunnilleen 60 aminohappotähteen yli. Symboli CHO tarkoittaa hiilihydraattia. Raskaan (H) ketjun (V_H) alue V muistuttaa V_L:ää siinä, että siinä on kolme hypervariaabelia CDR-aluetta (ei esitetty).

Kuvio 2B on kaavamainen luonnos ihmisen kevyestä (Kappa) ketjusta (lohko 1). Numerointi kulkee vasemmalla olevasta N-päästä oikealla olevaan C-päähän päin. Huomaa ketjunsisäinen disulfidisidos (S-S), joka ulottuu suunnilleen saman määrän aminohappotähteitä yli V_L- ja C_L-alueilla. Lohko 2 esittää komplementaarisuuden määrittävien alueiden (CDR) sijainnit V_L-domeenissa. CDR:n ulkopuoliset segmentit muodostavat kehyssegmentit (FR).

Kuvio 3 kuvaa kaksisäikeisen synteettisen DNA:n sekvenssiä, joka on insertoitu Lambda Zap:iin Lambda Hc2 -ilmentämisvektorin muodostamiseksi. Kaksisäikeisen synteettisen DNA-insertin valmistus kuvataan esimerkissä 1a(ii). Eri ominaisuuksiin, jotka vaaditaan tältä vektorilta, jotta se ilmentäisi V_H-koodaavia DNA-homologeja, kuuluvat Shine-Dalgarno-sekvenssi, ribosomin sitomispaikka, johtosekvenssi, joka ohjaa ilmentyneen proteiinin periplasmaan, kuten kuvaavat Mouva ym., J. Biol. Chem., 255:27, 1980, ja erilaisia restriktioentsyymikohtia, joita käytetään operatiivisesti liittämään V_H-homologit ilmentämisvektoriin. V_H-ilmentämisvektorisekvenssi sisältää myös lyhyen nukleiinihapposekvenssin, joka koodaa aminohappoja, joita tavallisesti esiintyy raskasketjun vaihtelevilla alueilla (V_H-ranka). Tämä V_H-ranka on juuri ylävirtaan ja varsinaisessa luennassa kuten V_H-DNA-homologit, jotka ovat operatiivisesti liittyneet Xho I- ja Spe I -kloonauspaikkoihin. Kaksisäikeisen synteettisen DNA-insertin ylä- ja alasäikeiden sekvenssit on listattu vastaavasti tunnuksilla SEQ ID NO 1 ja SEQ ID NO 2. Synteettinen DNA-insertti on suunnatusti ligatoitu Lambda Zap II:een, joka on digeroitu restriktioentsyymeillä Not 1 ja Xho I Lambda Hc2 -ilmentämisvektorin muodostamiseksi.

Kuvio 4 esittää bakteeri-ilmentämisvektorin Lambda Hc2 (V_H-ilmentämisvektorin) päätunnusmerkkejä. Synteettinen DNA-sekvenssi kuviosta 3 on esitetty ylhäällä yhdessä T_3-polymeraasipromoottorin kanssa alkaen Lambda Zap II:sta. Insertin orientaatio Lambda Zap II:ssa on esitetty. V_H-DNA-homologit on insertoitu Xho I- ja Spe I -kloonauskohtiin. Läpilukutranskriptio tuottaa dekapeptidiepitoopin (tag), joka sijaitsee juuri kloonauskohdan 3'-päässä.

Kuvio 5 esittää kaksisäikeistä synteettistä DNA-sekvenssiä, joka on insertoitu Lambda Zap:iin Lambda Lc2 -ilmentämisvektorin tuottamiseksi. Eri ominaisuudet, jotka tältä vektorilta vaaditaan, jotta se ilmentäisi V_L-koodaavia DNA-homologeja, on kuvattu kuviossa 3. V_L-koodaavat DNA-homologit on liitetty Lc2-sekvenssiin Sac I- ja Xho I -restriktiokohdissa. Kaksisäikeisen synteettisen DNA-insertin ylä- ja alasäikeen sekvenssit on listattu vastaavasti tunnuksilla SEQ ID NO 3 ja SEQ ID NO 4. Synteettinen DNA-insertti on suunnatusti ligatoitu Lambda Zap II:een, joka on digeroitu re-striktioentsyymeillä SAC I ja Not I Lambda Lc2 -ilmentämisvektorin muodostamiseksi.

Kuvio 6 kuvaa bakteeri-ilmentämisvektorin Lc2 (V_L-ilmentämisvektorin) päätunnusmerkkejä. Synteettinen DNA-sekvenssi kuviosta 5 on esitetty kuvion yläosassa yhdessä Lambda Zap II:sta alkavan T_3-polymeraasipromoottorin kanssa. Insertin suunta Lambda Zap II:een on esitetty. V_L-DNA-homologit on insertoitu Sac I- ja Xho I -kloonauskohtiin.

Kuvio 7 kuvaa dikistronista ilmentämisvektoria, pComb, fagomidi-ilmentämisvektorin muodossa. pCombin tuottamiseksi fagomidit katkaistiin ensiksi ilmentämisvektoreista Lambda Hc2 ja Lambda Lc2 käyttäen in vivo katkaisumenettelyä valmistajien (Stratagene, La Jolla, California) ohjeiden mukaisesti. pComb-ilmentämisvektori valmistetaan Lambda Hc2:sta ja Lambda Lc2:sta, jotka eivät sisällä V_H-koodaavia tai V_L-koodaavia DNA-homologeja. In vivo -katkaisumenetelmä siirsi kloonatun insertin Lambda Hc2- ja Lambda Lc2 -vektoreista fagomidivektoriin. Saadut fagomidit sisälsivät samat nukleotidisekvenssit vasta-ainefragmentin kloonausta ja ilmaisua varten kuin emovektorit. Hc2- ja Lc2-fagomidi-ilmentämisvektorit restriktiodigeroitiin erikseen Sca I:llä ja EcoR I:llä. Linearisoidut fagomidit ligatoitiin Sca I ja EcoR I kohesiivisten päitten kautta dikistronisen (kombinatorisen) vektorin, pComb, muodostamiseksi.

Kuvio 8 on kaavioesitys fagomidivektorin pCBAK8-2b koostumuksesta, Fabin kokoontumistiestä ja sen liittymisestä faagin kuoreen. Vektori kuljettaa kloramfenikoliasetyylitransferaasi(CAT)markkerigeeniä nukleotiditähdesekvenssien, jotka koodaavaa Fd-cpVIII-fuusiopolypeptidiä ja kappaketjua, lisäksi. Se, että replikaatio on lähtöisin F1-faagista, helpottaa yksisäikeisen fagomidin kehittymistä. Isopropyylitiogalaktopyranosidin (IPTG) indusoima dikistronisen lähetin, joka koodaa Fd-cpVIII-fuusiotuotetta (V_H, C_{H1}, cpVIII) ja kevytketjua (V_L, C_L), ekspressio johtaa raskas- ja kevytketjujen muodostumiseen. Kunkin ketjun ohjaa periplasmatilaan pelB-kohdesekvenssi, joka sitten pilkotaan. Raskasketju ankkuroituu kalvoon cpVIII-fuusion avulla, kun taas kevytketju sekretoituu periplasmaan. Raskasketju

kokoontuu kevytketjun läsnäollessa muodostaen Fab-molekyylejä. Fab-molekyylit liittyvät faagipartikkeleihin cpVIII:n kautta (mustat pisteet).

Kuvio 9 on elektronimikroskooppikuva, joka kuvaa 5-7 nm:n kolloidaalisten kultapartikkeleiden, jotka on päällystetty NPN-BSA-konjugaatilla, paikallistumista filamenttifaagin pintaan ja bakteerisolusta esiinnousevaa faagia. Lohko 9A esittää bakteerisolun pinnasta kohoavaa filamenttifaagia, joka on spesifisti leimattu kolloidaalisilla kultapartikkeleilla, jotka on päällystetty BSA-NPN-antigeenilla. Lohko 9B esittää osaa kypsästä filamenttifaagista, jota pitkin näkyy antigeenin tarttumiskohtien leimautuminen.

Kuvio 10 esittää tuloksia kaksipaikkaisesta ELISA-analyysistä, jolla tutkittiin bakteriofaagipartikkeleiden pintaan kiinnittyneen Fab-vasta-aineen läsnäoloa ja toimintaa, kuten esimerkissä 4b kuvataan. Fab-vasta-aineen ilmentämiseksi faagipinnoilla XL1-Blue-soluja transformoitiin fagomidi-ilmentämisvektorin, pCBAK8-2b, avulla. Indusoija, isopropyylitiogalaktopyranosidi (IPTG), lisättiin bakteerilietteeseen 1 nM:n lopullisessa konsentraatiossa yhden tunnin kuluessa. Sitten bakteerilietteeseen lisättiin sekoittaen auttaja-faagi fagomidi-DNA:n tunnistussäikeen sense-säikeen kopioiden synnyttämiseksi. Kahden tunnin kuluttua bakteerisupernatantit, jotka sisälsivät bakteriofaagipartikkeleita, koottiin ELISAlla analysoitaviksi.

Ilmeni NPN-Fabia ilmentävien bakteriofaagipartikkeleiden spesifistä titrattavissa olevaa tarttumista NPN:llä päällystettyihin levyihin. Mitään tarttumista ei todettu käytettäessä yksinomaan auttaja-faagia.

Kuvio 11 kuvaa NPN-Fabia ilmentävän bakteriofaagin tarttumisen estymistä NPN-antigeenilla päällystettyihin levyihin lisättäessä kasvavia määriä vapaata hapteenia. Kokeet suoritettiin kuten kuvion 10 yhteydessä kuvattiin. Tarttumisen havaittiin estyvän täydellisesti lisättäessä 5 ng vapaata NPN-hapteenia.

Kuvio 12 esittää kaavamaisesti raskasketjufragmentin CDR3-alueen mutagenisointimenetelmää seurauksena sitoutumisspesifisyyden muutoksesta. Oligonukleotidialukkeet on merkitty mustilla palkeilla. Menetelmää kuvataan esimerkissä 6.

Kuvio 13 kuvaa lähtö- ja valittujen kloonien CDR3-alueen raskasketjun aminohapposekvenssejä ja vastaavaa SEQ ID NO -tunnusta ja kloonien affiniteettia vapaaseen fluoreseiiniin ja FI-BSA:han. Asteriksi tarkoittaa likimääräistä Kd-arvoa kompetitiivisella ELISAlla määritettynä.

Kuvio 14 esittää lähtö- ja valittujen kloonien CDR3-alueen raskasketjun aminohapposekvenssejä ja vastaavaa SEQ ID NO-tunnusta ja kloonien affiniteettia vapaaseen fluoreseiiniin ja FI-BSA:han. Asteriksi tarkoittaa likimääräistä Kd-arvoa kompetitiivisella ELISAlla määritettynä.

A. Määritykset

Aminohappotähde: aminohappo, joka on muodostunut kemiallisesti digeroitaessa (hydrolysoitaessa) jotakin polypeptidiä sen peptidisidoksien kohdalta. Tässä kuvatut aminohappotähteet ovat suositeltavimmin L-isomeerimuodossa. D-isomeerimuodossa olevilla tähteillä voidaan kuitenkin korvata mikä tahansa L-aminohappotähde, mikäli polypeptidi säilyttää halutun funktionaalisen ominaisuutensa. NH_2 tarkoittaa vapaata aminoryhmää, joka on polypeptidin aminopäässä. COOH tarkoittaa vapaata karboksiryhmää, joka on polypeptidin karboksipäässä. Pysyttäytyen standardinmukaisessa polypeptidinimistössä [joka on kuvattu julkaisussa J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) ja hyväksytty 37 C.F.R. 1.822(b) (2)], aminohappotähteiden lyhenteet on esitetty seuraavassa vastaavuustaulukossa:

Vastaavuustaulukko

Symboli		Aminohappo
1-kirjaiminen	3-kirjaiminen	
Y	Tyr	tyrosiini
G	Gly	glysiini
F	Phe	fenyylialaniini
M	Met	metioniini
A	Ala	alaniini
S	Ser	seriini
I	Ile	isoleusiini
L	Leu	leusiini
T	Thr	treoniini
V	Val	valiini
P	Pro	proliini
K	Lys	lysiini
H	His	histidiini
Q	Gln	glutamiini
E	Glu	glutamiinihappo
Z	Glx	Glu ja/tai Gln

W	Trp	tryptofaani
R	Arg	arginiini
D	Asp	aspartiinihappo
N	Asn	asparagiini
B	Asx	Asn ja/tai Asp
C	Cys	kysteiini
J	Xaa	tuntematon tai muu.

Huomattakoon että kaikki tässä kaavoilla esitetyt aminohappotähdesekvenssit luetaan vasemmalta oikealle konventionaalisessa suunnassa aminopäästä karboksipäähän. Lisäksi sanonta "aminohappotähde" määritellään laajasti sisältämään vastaavuustaulukossa luetellut aminohapot ja muunnetut ja epätavalliset aminohapot, kuten julkaisussa 37 CFR 1.822(b) (4) luetellut, jotka sisällytetään tähän viitteenä. Huomattakoon lisäksi, että ajatusviiva jonkin aminohappotähdesekvenssin alussa tai lopussa tarkoittaa peptidisidosta johonkin seuraavaan yhden tai useamman aminohappotähteen sekvenssiin tai kovalenttista sidosta johonkin aminoterminaaliseen ryhmään, kuten NH_2- tai asetyyliryhmään, tai karboksiterminaaliseen ryhmään, kuten COOH-ryhmään.

Nukleotidi: monomeerinen DNA- tai RNA-yksikkö, joka muodostuu sokeriosasta (pentoosi), fosfaatista ja typpeä sisältävästä heterosyklisestä emäksestä. Emäs liittyy sokeriosaan glykosidihiilen (pentoosin 1' hiili) kautta ja tuo emäksen ja sokerin yhdistelmä on nukleosidi. Kun nukleosidi sisältää fosfaattiryhmän, joka on liittynyt pentoosin 3'- tai 5'-asemaan, sitä kutsutaan nukleotidiksi. Operatiivisesti liittyneiden nukleotidien sekvenssiä nimitetään tässä yleensä "emässekvenssiksi" tai "nukleotidisekvenssiksi" ja niiden kieliopillisiksi vastineiksi ja niitä edustaa tässä kaava, jonka vasemmalta oikealle -suunta on konventionaalisessa 5'-päästä 3'-päähän suunnassa.

Emäspari (bp): adeniinin (A) ja tymiinin (T) tai sytosiinin (C) ja guaniinin (G) pari kaksisäikeisessä DNA-molekyylissä. RNA:ssa tymiinin paikalla on urasiili (U).

Nukleiinihappo: nukleotidien, joko yksi- tai kaksisäikeisten, polymeeri.

Polynukleotidi: yksi- tai kaksisäikeisten nukleotidien polymeeri. Tässä käytettynä "polynukleotidi" ja sen kieliopilliset vastineet sisältävät koko nukleiinihappoalueen. Polynukleotidi viittaa yleensä nukleiinihappomolekyyliin, joka muodostuu kahden tai useamman deoksiribonukleotidin ja/tai ribonukleotidin lineaarisesta säikeestä. Täsmällinen koko riippuu monista tekijöistä, jotka puolestaan ovat riippuvaisia

myöhemmistä käyttöolosuhteista, kuten alalla hyvin tiedetään. Tämän keksinnön mukaiset polynukleotidit sisältävät alukkeet, koettimet, RNA/DNA-segmentit, oligonukleotidit eli "oligot" (suhteellisen lyhyitä polynukleotideja), geenit, vektorit, plasmidit ja vastaavat.

Geeni: nukleiinihappo, jonka nukleotidisekvenssi koodaa jotakin RNA:ta tai polypeptidiä. Geeni voi olla joko RNA tai DNA.

Dupleksi-DNA: kaksisäikeinen nukleiinihappomolekyyli, joka käsittää kaksi olennaisesti komplementaaristen polynukleotidien säiettä, joita pitää yhdessä yksi tai useampi dupleksin emäsparissa läsnäolevan kunkin komplementaarisen emäksen välissä oleva vetysidos. Koska nukleotidit, jotka muodostavat emäsparin, voivat olla joko ribonukleotidiemäs tai deoksiribonukleotidiemäs, sanonta "dupleksi-DNA" viittaa joko DNA-DNA-dupleksiin, joka käsittää kaksi DNA-säiettä (dsDNA) tai RNA-DNA-dupleksiksiin, joka käsittää yhden DNA-säikeen ja yhden RNA-säikeen.

Komplementaariset emäkset: nukleotideja, jotka normaalisti muodostavat pareja, kun DNA tai RNA ottaa kaksisäikeisen konfiguraation.

Komplementaarinen nukleotidisekvenssi: yksisäikeisessä DNA- tai RNA-molekyylissä oleva nukleotidisekvenssi, joka on tarpeeksi komplementaarinen toiselle yksisäikeiselle sekvenssille, jotta se spesifisesti hybridisoituu siihen konsekventiaalisella vetysidoksella.

Säilynyt: nukleotidisekvenssi on säilynyt ennalta valittuun (viite)sekvenssiin nähden, mikäli se ei-satunnaisesti hybridisoituu ennalta valitun sekvenssin tarkaksi komplementiksi.

Hybridisaatio: olennaisesti komplementaaristen nukleotidisekvenssien (nukleiinihapposäikeiden) parin muodostus, jolloin muodostuu dupleksi tai heterodupleksi vetysidosten muodostuessa komplementaaristen emäsparien väliin. Kysymyksessä on kahden komplementaarisen polynukleotidin välillä tapahtuva spesifinen, so. ei-satunnainen vuorovaikutus, joka voidaan kompetitiivisesti estää.

Nukleotidianalogi: puriini- tai pyrimidiininukleotidi, joka eroaa rakenteellisesti A:sta, T:stä, G:stä, C:stä tai U:sta, mutta on tarpeeksi samanlainen korvatakseen tavallisen nukleotidin nukleiinihappomolekyylissä.

DNA-homologi: nukleiinihappo, jolla on ennalta valittu säilynyt nukleotidisekvenssi ja sekvenssi, joka koodaa reseptoria, joka pystyy sitomaan jonkin ennalta valitun ligandin.

Yhdistelmä-DNA (rDNA) -molekyyli: DNA-molekyyli, joka on tuotettu liittämällä operatiivisesti toisiinsa kaksi DNA-segmenttiä. Yhdistelmä-DNA on siis hybridi-DNA-molekyyli, joka käsittää vähintään kaksi nukleotidisekvenssiä, joita ei normaalisti tavata yhdessä luonnossa. rDNA:iden, joilla ei ole yhteistä biologista alkuperää, so. jotka ovat evolutionaarisesti erilaisia, sanotaan olevan "heterologisia".

Vektori: rDNA-molekyyli, joka kykenee autonomisesti replikoitumaan solussa ja johon voidaan operatiivisesti liittää jokin DNA-segmentti, esim. geeni tai polynukleotidi, kiinnittyneen segmentin replikoitumisen aikaansaamiseksi. Vektoreita, jotka pystyvät ohjaamaan yhtä tai useampaa polypeptidiä koodaavien geenien ilmentymistä, sanotaan tässä "ilmentämisvektoreiksi". Erityisen tärkeät vektorit mahdollistavat cDNA:n (komplementaarisen DNA:n) kloonaamisen mRNA:ista, jotka on tuotettu käänteistransskriptaasia käyttäen.

Reseptori: reseptori on jokin molekyyli, kuten proteiini, glykoproteiini ja vastaava, joka kykenee spesifisesti (ei- satunnaisesti) sitoutumaan toiseen molekyyliin.

Vasta-aine: termiä vasta-aine erilaisissa kieliopillisissa muodoissaan käytetään tässä viittaamaan immunoglobuliinimolekyyleihin ja immunoglobuliinimolekyylien immunologisesti aktiivisiin osiin, so. molekyyleihin, jotka sisältävät vasta-aineen tarttumiskohdan eli paratoopin. Esimerkkejä vasta-ainemolekyyleistä ovat koskemattomat immunoglobuliinimolekyylit, olennaisesti koskemattomat immunoglobuliinimolekyylit ja immunoglobuliinimolekyylin osat, mukaanluettuina sellaiset osat, jotka tunnetaan alalla nimillä Fab, Fab', $F(ab')_2$ ja F(v).

Vasta-aineen tarttumiskohta: vasta-aineen tarttumiskohta on vasta-ainemolekyylin se rakenteellinen osa, joka muodostuu raskasketjun ja kevytketjun variaabeleista ja hypervariaabeleista alueista, jotka spesifisesti sitovat antigeenin (reagoivat immunologisesti sen kanssa). Termi reagoida immunologisesti eri muodoissaan tarkoittaa spesifistä sitoutumista antigeenideterminantin sisältävän molekyylin ja jonkin vasta-aineen tarttumiskohdan, kuten kokonaisen vasta-ainemolekyylin tai osan siitä, sisältävän molekyylin välillä.

Monoklonaalinen vasta-aine: sanonta monoklonaalinen vasta-aine eri kieliopillisissa muodoissaan tarkoittaa vasta-ainemolekyylien populaatiota, joka sisältää vain yhden vasta-aineen tarttumiskohtalajin, joka pystyy reagoimaan immunologisesti

jonkin määrätyn antigeenin kanssa. Monoklonaalisella vasta-aineella on siis yleensä yksinkertainen tarttumisaffiniteetti mihin tahansa antigeeniin, jonka kanssa se reagoi immunologisesti. Monoklonaalinen antigeeni voi sen vuoksi sisältää vasta-ainemolekyylin, jossa on useita vasta-aineen tarttumiskohtia, joista kukin on immunospesifinen eri antigeenin suhteen, esim. bispesifinen monoklonaalinen vasta-aine.

Fuusiopolypeptidi: polypeptidi, joka muodostuu vähintään kahdesta polypeptidistä ja sidontasekvenssistä kahden polypeptidin liittämiseksi operatiivisesti yhdeksi jatkuvaksi polypeptidiksi. Kaksi fuusiopolypeptidiksi liitettyä polypeptidiä ovat yleensä lähtöisin kahdesta erillisestä lähteestä ja sen vuoksi fuusiopolypeptidi käsittää kaksi toisiinsa liitettyä polypeptidiä, joita ei normaalisti tavata luonnossa yhteen liittyneinä.

Ylävirtaan: suuntaan, joka on päinvastainen DNA-transskription suuntaan nähden ja sen vuoksi menee 5' → 3' -suunnassa ei-koodaavassa säikeessä tai 3' → 5' -suunnassa mRNA:ssa.

Alavirtaan: edelleen pitkin DNA-sekvenssiä sekvenssin transskription suunnassa eli lukusuunnassa, toisin sanoen suunnassa 3' → 5' DNA:n ei-koodaavaa säiettä pitkin tai suunnassa 5' → 3' RNA-transskriptiä pitkin.

Kistroni: nukleotidien sekvenssi DNA-molekyylissä, joka koodaa jotakin aminohappotähdesekvenssiä ja sisältää ylävirtaan ja alavirtaan olevat DNA:n ilmentymistä säätelevät elementit.

Stopkodoni: Mikä tahansa kolmesta kodonista, jotka eivät koodaa aminohappoa, vaan sen sijaan aikaansaavat proteiinisynteesin päättymisen. Ne ovat UAG, UAA ja UGA ja niitä nimitetään myös nonsense- tai lopetuskodoneiksi.

Johto-polypeptidi: polypeptidin aminopäässä oleva lyhyt aminohapposekvenssipätkä, joka kantaa tai ohjaa polypeptidin sisäkalvon läpi ja sillä tavoin turvaa sen mahdollisen sekreetion periplasmatilaan ja ehkä pitemmällekin. Johto-sekvenssipolypeptidi tavallisesti poistetaan, ennen kuin polypeptidi tulee aktiiviseksi.

Lukukehys: Jatkuvien nukleotiditriplettien (kodonien) erityissekvenssi, jota käytetään translaatioon. Lukukehys riippuu translaation aloituskodonin sijainnista.

B. Filamenttifaagi

Esillä oleva keksintö koskee filamenttifaagia, joka käsittää proteiinimatriksin, joka kapseloi genomin, joka koodaa ensimmäisiä ja toisia polypeptidejä, jotka kykenevät muodostamaan heterodimeerisen reseptorin. Lisäksi faagi sisältää heterodimeerisen reseptorin, joka muodostuu ensimmäisestä ja toisesta polypeptidistä, jotka ovat integroituneet matriksin pintaan filamenttifaagin kalvoankkurialueen kautta, joka on fuusioitunut ainakin yhteen ensimmäisistä ja toisista polypeptideistä. Heterodimeerisellä reseptorilla on kyky sitoa ligandi ja sen vuoksi sitä nimitetään ligandin sitovaksi heterodimeeriseksi reseptoriksi.

Heterodimeerinen reseptori on eräässä suositeltavassa toteutusmudossa epitoopin sitova kompleksi. Toisin sanoen ensimmäisen ja toisen polypeptidin kompleksi, joka pystyy sitomaan epitoopin. Ensimmäinen ja toinen polypeptidi ovat suositeltavimmin vasta-aineen raskaan ketjun ja kevyen ketjun polypeptidejä.

Ensimmäinen ja toinen polypeptidi pystyvät autogeenisesti kokoontumaan funktionaaliseksi epitoopin sitovaksi kompleksiksi (heterodimeeriseksi reseptoriksi), joka sitten ekspressoituu faagin ulkopinnalla sillä tavoin, että se on ligandin tavoitettavissa, so. ne ovat integroituneina faagin pintaan. Siten siis jokin epitoopin sitova kompleksi on yleensä läsnä tämän keksinnön mukaisen faagin pinnalla. Tyypillisesti epitoopin sitova kompleksi muodostuu liittäjä-polypeptidistä, joka sisältää filamenttifaagin kalvoonankkuroitumisdomeenin, kuten jonkin osassa C kuvatun polypeptidin, ja jostakin ei-liittäjä-polypeptidistä tai -polypeptideistä. Suositeltavia ovat faagit, joissa on cpIII- tai cpVIII-kalvoonankkuroitumisdomeeni fuusioituneena heterodimeerisen kompleksin polypeptidiin, kuten tuonnempana kuvataan.

Koska reseptori kytketään faagiin tavalla, jolla pintaan käsiksi pääsy on mahdollista, faagia voidaan edullisesti käyttää kiinteäfaasiaffiniteettisorbenttina. Suositeltavissa toteutusmuodoissa faagi kytketään, mieluiten irrotettavasti, kiinteään (veteen liukenemattomaan) matriksiin, kuten esimerkiksi agaroosiin, selluloosaan, synteettisiin hartseihin, polysakkarideihin ja vastaaviin. Esimerkiksi faagia vuotavia transformantteja voidaan käyttää ja säilyttää kolonnissa ja pitää olosuhteissa, jotka tukevat faagin vuotamista. Vesipitoinen koostumus, joka sisältää ligandin, joka sitoutuu faagin ilmentämään reseptoriin, ohjataan sitten kolonnin läpi ennalta määrätyllä nopeudella ja olosuhteissa, jotka mahdollistavat reseptoriin tarttumisen, kiinteäfaasisen reseptori-ligandikompleksin muodostamiseksi. Sitten kolonni pestään sitoutumatta jääneen materiaalin poistamiseksi, jolloin ligandi jää jäljelle sitoutuneena kiinteäfaasiseen faagiin. Sitten ligandi voidaan poistaa ja ottaa

talteen pesemällä kolonni jollakin puskurilla, joka edistää reseptori-ligandikompleksin hajoamista.

Vaihtoehtoisesti puhdistettu faagi voidaan lisätä sekoittaen vesiliuokseen, joka sisältää affiniteetin avulla puhdistettavan ligandin. Tällä tavoin muodostettua reseptorin/ligandin sitovaa reaktioseosta säilytetään tarpeeksi kauan aikaa ja tarttumiselle tarpeeksi otollisissa olosuhteissa, jotta muodostuu faagiin kytketty reseptori-ligandikompleksi. Faagiin sitoutunut ligandi (ligandia kantava faagi) erotetaan sitten ja otetaan talteen sitoutumattomista materiaaleista, esimerkiksi sentrifugoimalla, elektroforeesin avulla, saostamalla, tai vastaavalla menetelmällä.

Tämän keksinnön mukainen faagi voidaan leimata, kun sitä käytetään jossakin tämän keksinnön mukaisessa diagnostisessa menetelmässä. Suositeltavia merkkiaineita ovat radioaktiivisesti leimatut nukleiinihapot sisällytettyinä faagin genomiin tai radioaktiivisesti leimatut aminohapot sisällytettyinä faagipartikkelin proteiinikomponentteihin. Leimattu faagi voidaan valmistaa rutiininomaisesti kasvattamalla faagi tässä kuvatulla tavalla, mutta niin, että viljelyväliaineeseen sisällytetään radioaktiivisesti leimattuja nukleotideja tai radioaktiivisesti leimattuja aminohappoja sisällytettäviksi faagin nukleiinihappoihin tai vastaavasti polypeptideihin. Esimerkkejä merkkiaineista ovat ^{3}H-tymidiini tai ^{35}S-metioniini. Muita isotooppisia merkkiaineita tai muita nukleotidi- tai aminohappoprekursoreita on helposti alaan perehtyneen saatavilla. Leimattu faagi sisältää suositeltavimmin tarpeeksi merkkiainetta, jotta se voidaan detektoida tämän keksinnön mukaisessa ligandin tarttumiskokeessa, so. faagi on detektoitavasti leimattu.

C. DNA-ilmentämisvektorit

Eräs esillä olevan keksinnön mukainen vektori on yhdistelmä-DNA(rDNA)-molekyyli, joka soveltuu vastaanottamaan ja ilmentämään transloituvia DNA-sekvenssejä fuusiopolypeptidin muodossa, joka sisältää filamenttifaagin kalvoonankkuroitumisdomeenin ja prokaryoottisen sekreetiosignaalidomeenin. Vektori käsittää kasetin, joka sisältää ylävirtaan ja alavirtaan transloituvia DNA-sekvenssejä, jotka on operatiivisesti liitetty nukleotidisekvenssin avulla, joka soveltuu ohjautuvasti ligatoitavaksi johonkin insertti-DNA:han. Ylävirtaan transloituva sekvenssi koodaa tässä määriteltyä sekreetiosignaalia. Alavirtaan transloituva sekvenssi koodaa tässä määriteltyä filamenttifaagin ankkurialuetta, jolla se liittyy ulkokalvoon. Kasetti sisältää suositeltavimmin DNA-ilmentymistä sääteleviä sekvenssejä fuusiopolypeptidin, joka muodostuu, kun transloituva DNA-sekvenssi-insertti (insertti-DNA) insertoidaan suunnatusti kasettiin suunnattuun ligaatioon

soveltuvan nukleotidisekvenssin kautta, ekspressiota varten. Filamenttifaagin kalvoankkuri on suositeltavimmin cpIII- tai cpVIII-kuoriproteiinin alue, joka pystyy sitomaan filamenttifaagipartikkelin matriksin samalla liittäen fuusiopolypeptidin faagin pintaan.

Ekspressiovektori on tunnettu siitä, että se pystyy ekspressoimaan jossakin sopivassa isännässä jonkin rakennegeenituotteen, kuten esimerkiksi tämän keksinnön mukaisen fuusiopolypeptidin.

Tässä käytettynä termillä "vektori" tarkoitetaan nukleiinihappomolekyyliä, joka kykenee siirtämään erilaisten geneettisten ympäristöjen välillä toista nukleiinihappoa, johon se on operatiivisesti liitetty. Suositeltavia vektoreita ovat sellaiset, jotka pystyvät autonomisesti replikoitumaan ja ilmentämään rakennegeenituotteita, joita on läsnä DNA-segmenteissä, joihin ne on operatiivisesti liitetty.

Tässä DNA-sekvenssien tai -segmenttien yhteydessä käytettynä termillä "operatiivisesti liitetty" tarkoitetaan, että sekvenssit tai segmentit on kovalenttisesti liitetty, mieluiten konventionaalisilla fosforidiesterisidoksilla yhteen DNA-säikeeseen, joko yksisäikeisessä tai kaksisäikeisessä muodossa.

Vektorin, johon tämän keksinnön mukainen kasetti operatiivisesti liitetään, valinta riippuu, kuten alalla hyvin tiedetään, halutuista ominaisuuksista, esim. vektorin replikaatiosta ja proteiinin ilmentämisestä, ja transformoitavasta isäntäsolusta, jotka seikat ovat yhdistelmä-DNA-molekyylien rakennustekniikkaan luonnostaan liittyviä rajoituksia.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa käytetty vektori sisältää jonkin prokaryoottisen replikonin, so. DNA-sekvenssin, jolla on kyky ohjata yhdistelmä-DNA-molekyylin autonomista replikoitumista ja pysymistä kromosomin ulkopuolella prokaryoottisessa isäntäsolussa, kuten bakteeri-isäntäsolussa, siihen transformoituneena. Tällaiset replikonit ovat hyvin tunnettuja alalla. Lisäksi toteutusmuodot, jotka sisältävät jonkin prokaryoottisen replikonin, sisältävät myös geenin, jonka ilmentyminen tuo jonkin selektiivisen edun, kuten esimerkiksi lääkeresistenssin, sillä transformoidulle isäntäbakteerille. Tyypillisiä bakteerin lääkeresistenssin aikaansaavia geenejä ovat sellaiset, jotka antavat resistenssin ampisilliinille tai tetrasykliinille. Vektorit sisältävät yleensä sopivia restriktiokohtia transloituvien DNA-sekvenssien insertiolle. Esimerkkejä vektoreista ovat plasmidit pUC8, pUC9, pBR322 ja pBR329, jotka ovat saatavissa firmalta BioRad Laboratories, (Richmond, CA), ja pPL ja pKK223, jotka ovat saatavissa firmalta Pharmacia (Piscataway, NJ).

Nukleotidisekvenssi, joka soveltuu suunnattuun ligaatioon, so. polyliittäjä, on DNA-ilmentämisvektorin alue, joka (1) operatiivisesti liittää replikoitumista varten ja kuljettaa ylävirtaan ja alavirtaan transloituvat DNA-sekvenssit ja (2) muodostaa kohdan tai välineen DNA-sekvenssin suunnattua ligaatiota varten vektoriin. Tyypillisesti suuntaava polyliittäjä on nukleotidisekvenssi, joka muodostaa kaksi tai useampia restriktioendonukleaasin tunnistussekvenssejä eli restriktiokohtia. Restriktiopilkkomisessa nämä kaksi restriktiokohtaa muodostavat kohesiivisia päitä, joihin transloituva DNA-sekvenssi voidaan sitoa DNA-ilmentämisvektoriin. Suositeltavimmin nämä kaksi restriktiokohtaa tuovat käyttöön restriktiopilkonnassa kohesiivisia päitä, jotka eivät ole komplementaarisia ja siten mahdollistavat transloituvan DNA-sekvenssin suunnatun insertion kasettiin. Eräässä toteutusmuodossa direktionaalisen ligaatiovälineen muodostavat nukleotidit, jotka ovat läsnä ylävirtaan transloituvassa DNA-sekvenssissä, alavirtaan transloituvassa DNA-sekvenssissä tai molemmissa. Eräässä toisessa toteutusmuodossa suunnattuun ligaatioon soveltuva nukleotidisekvenssi käsittää nukleotidisekvenssin, joka muodostaa useita suunnattuun kloonaukseen käytettäviä välineitä. Silloin kun suunnattuun ligaatioon soveltuva nukleotidisekvenssi muodostaa monia resktriktiokohtia, sitä nimitetään multippeli-kloonauskohdaksi.

Transloituva DNA-sekvenssi on lineaarinen sarja nukleotideja, jotka muodostavat keskeytymättömän vähintään 8 kodonin, jotka koodaavat jotakin polypeptidiä yhdessä lukukehyksessä, sarjan.

Ylävirtaan transloituva DNA-sekvenssi koodaa prokaryoottista sekreetiosignaalia. Sekreetiosignaali on proteiinin johto-peptidialue, joka ohjaa proteiinin gram-negatiivisten bakteerien periplasmamembraaniin.

Eräs suositeltava sekreetiosignaali on pelB-sekreetiosignaali. Kahdesta Erwinia carotovorasta peräisin olevasta pelB-geenituotevariantista lähtöisin olevan sekreetiosignaalialueen ennakoidut aminohappotähdesekvenssit on esitetty taulukossa 1 kuten kuvaavat Lei ym., Nature, 331:543-546 (1988). Eräs erityisen suositeltava pelB-sekreetiosignaali on myös esitetty taulukossa 1.

pelB-proteiinin johto-sekvenssiä on aikaisemmin käytetty sekreetiosignaalina fuusioproteiineille. Better ym., Science, 240:1041-1043 (1988); Sastry ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5728-5732 (1989) ja Mullinax ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8095-8099 (1990).

Taulukossa 1 on lueteltu myös muiden tässä keksinnössä käyttökelpoisten E. colista peräisin olevien sekreetiosignaalin polypeptidialueiden aminohappotähdesekvenssejä. Oliver, In Neidhard, F.C. (toim.), Escherichia coli ja Salmonella Typhimurium, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1:56-69 (1987).

Transloituva DNA-sekvenssi, joka koodaa pelB-sekreetiosignaalia, jolla on numerolla SEQ. ID. NO. 5 esitetty aminohappotähdesekvenssi, on eräs suositeltava DNA-sekvenssi sisällytettäväksi tämän keksinnön mukaiseen DNA-ilmentämisvektoriin.

Eräs alavirtaan transloituva DNA-sekvenssi koodaa filamenttifaagin membraaniankkuria. Suositeltavia membraaniankkureita on saatavissa filamenttifaageista M13, f1, fd ja vastaavista filamenttifaageista. Suositeltavia membraaniankkuridomeeneja löydetään kuoriproteiineista, joita koodaavat geeni III ja geeni VIII. Siten siis alavirtaan transloituva DNA-sekvenssi koodaa aminohappotähdesekvenssiä, joka vastaa joko filamenttifaagin geenin III tai geenin VIII koodaamaa kuoripolypeptidin membraaniankkuridomeenia ja on suositeltavimmin identtinen sen kanssa.

Taulukko 1

Johto-sekvenssejä

SEQ. ID.NO	Tyyppi	Aminohappotähdesekvenssi
(5)	PelB[1]	MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeu LeuLeuAlaAlaGlnProAlaMet
(6)	pelB[2]	MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeu LeuLeuAlaAlaGlnProAlaGlnProAlaMetAla
(7)	pelB[3]	MetLysSerLeuIleThrProIleAlaAlaGlyLeuLeu LeuAlaPheSerGlnTyrSerLeuAla
(8)	MalE[4]	MetLysIleLysThrGlyAlaArgIleLeuAlaLeuSer AlaLeuThrThrMetMetPheSerAlaSerAlaLeuAlaLysIle
(9)	OmpF[4]	MetMetLysArgAsnIleLeuAlaValIleValProAla LeuLeuValAlaGlyThrAlaAsnAlaAlaGlu
(10)	PhoA[4]	MetLysGlnSerThrIleAlaLeuAlaLeuLeuProLeu LeuPheThrProValThrLysAlaArgThr
(11)	Bla[4]	MetSerIleGlnHisPheArgValAlaLeuIleProPhe PheAlaAlaPheCysLeuProValPheAlaHisPro

(12)	LamB[4]	MetMetIleThrLeuArgLysLeuProLeuAlaValAla ValAlaAlaGlyValMetSerAlaGlnAlaMetAlaValAsp
(13)	Lpp[4]	MetLysAlaThrLysLeuValLeuGlyAlaValIleLeu GlySerThrLeuLeuAlaGlyCysSer
(14)	cpVIII[5]	MetLysLysSerLeuValLeuLysAlaSerValAlaVal AlaThrLeuValProMetLeuSerPheAla
(15)	cpIII[6]	MetLysLysLeuLeuPheAlaIleProLeuValValPro PheTyrSerHisSer

[1] pelB, jota käytetään tässä keksinnössä
[2] pelB, joka on lähtöisin Erwinia carotovora -geenistä
[3] pelB, joka on lähtöisin Erwinia carotovora EC 16 -geenistä
[4] johto-sekvenssejä, jotka ovat peräisin E. colista
[5] johto-sekvenssi cpVIII:lle
[6] johto-sekvenssi cpIII:lle

Filamenttifaagin kuoriproteiinin membraaniankkuridomeeni on osa kuoriproteiinin karboksiterminaalialuetta ja siihen sisältyy hydrofobisten aminohappotähteiden alue lipidin kaksikerroskalvon läpi ulottumista varten ja sellaisten aminohappotähteiden alue, jollainen tavataan normaalisti kalvon sytoplasman puolella ja joka ulottuu poispäin kalvosta.

Faagissa f1 geeni VIII-kuoriproteiinin kalvon läpi ulottuva alue on tähde Trp-26 - Lys-40 ja sytoplasma-alue käsittää karboksipään 11 tähdettä 41:stä 52:een. Ohkawa ym., J. Biol. Chem., 256:9951-9958 (1981). Eräs esimerkki kalvoankkurista voisi muodostua cpVIII:n tähteistä 26-40.

Erään suositeltavan kalvoankkuridomeenin aminohappotähdesekvenssi on siis johdettu filamenttifaagin M13 geenistä III peräisin olevasta kuoriproteiinista (nimitetään myös tunnuksella cpIII). Eräällä suositeltavalla cpIII:sta johdetulla kalvoankkurilla on sekvenssi, joka on esitetty numerolla SEQ ID No. 16 tähteestä 1 tähteeseen 211. Geeni III-kuoriproteiini on läsnä kypsällä filamenttifaagilla faagipartikkelin toisessa päässä yleensä kuoriproteiinin noin 4-6 kopiona.

Erään toisen suositeltavan kalvoankkuridomeenin aminohappotähdesekvenssi on johdettu M13-filamenttifaagin geeni VIII-kuoriproteiinista (nimitetään myös tunnuksella cpVIII). Eräällä suositeltavalla cpVIII:sta johdetulla kalvoankkurilla on sekvenssi, joka on esitetty numerolla SEQ ID NO. 17 tähteestä 1 tähteeseen 50.

Geeni VIII-kuoriproteiini on läsnä kypsällä filamenttifaagilla suurimmalla osalla faagipartikkelia yleensä kuoriproteiinin noin 2 500-3 000 kopiona.

Yksityiskohtaisten kuvausten saamiseksi filamenttifaagipartikkeleiden rakenteesta, niiden kuoriproteiineista ja partikkelien kokoontumisesta katso katsauksia Rachel ym., Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986) ja Model ym., The Bacteriophages: Vol. 2, R. Calendar, toim. Plenum Publishing Co., ss. 375-456, (1988).

Eräs kasetti tämän keksinnön mukaisessa DNA-ilmentämisvektorissa on vektorin alue, joka muodostaa transloituvan DNA-sekvenssin insertion (DNA-insertin) jälkeen, nukleotidisekvenssin, joka kykenee ilmentämään sopivassa isännässä tämän keksinnön mukaisen polypeptidin. Ilmentämiseen kykenevää nukleotidisekvenssiä nimitetään kistroniksi. Kasetti siis käsittää DNA:n ilmentämistä säätteleviä elementtejä, jotka on operatiivisesti liitetty ylävirtaan ja alavirtaan transloituviin DNA-sekvensseihin. Kistroni muodostuu, kun jokin transloituva DNA-sekvenssi insertoidaan suunnatusti (ligatoidaan suunnatusti) ylävirran ja alavirran sekvenssien väliin tähän tarkoitukseen sopivien nukleotidisekvenssien kautta. Tällä tavoin saadut kolme transloituvaa DNA-sekvenssiä, nimittäin ylävirran sekvenssi, insertoitu sekvenssi ja alavirran sekvenssi, ovat kaikki operatiivisesti liitetyt samaan lukukehykseen.

DNA-ekspressiota säätelevät sekvenssit käsittävät sarjan DNA-ekspressiosignaaleja rakenteellisen geenituotteen ilmentämiseksi ja ne sisältävät, kuten hyvin tiedetään, sekä 5'- että 3'-elementtejä, jotka ovat operatiivisesti liitetyt kistroniin, niin että kistroni pystyy ilmentämään rakenteellisen geenituotteen. 5' säätelysekvenssit muodostavat promoottorin transskription käynnistämiseksi ja ribosomisitomiskohdan, joka on operatiivisesti liitetty ylävirtaan transloituvan DNA-sekvenssin 5'-päähän.

Geeniekspression korkeiden tasojen aikaansaamiseksi E. colissa on välttämätöntä käyttää ei ainoastaan voimakkaita promoottoreja suurien määrien mRNA:ta kehittämiseksi, vaan myös ribosomisitomispaikkoja sen takaamiseksi, että mRNA translatoituu tehokkaasti. E. colissa ribosomisitomiskohta sisältää aloituskodonin (AUG) ja 3-9 nukleotidin pituisen sekvenssin, joka sijaitsee 3-11 nukleotidin päässä ylävirtaan aloituskodonista [Shine ym., Nature, 254:34 (1975)]. Sekvenssi, AGGAGGU, jota kutsutaan Shine-Dalgarno (SD)-sekvenssiksi, on komplementaarinen E. colin 16S mRNA:n 3'-päälle. Ribosomin sitomiseen mRNA:han ja mRNA:n 3'-pään sekvenssiin voivat vaikuttaa useat tekjät:

(i) Komplementaarisuuden aste SD-sekvenssin ja 16S tRNA:n 3'-pään välillä.

(ii) Välimatka ja mahdollisesti SD-sekvenssin ja AUG:n välillä oleva DNA-sekvenssi [Roberts ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:760 (1979a); Roberts ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5596 (1979b); Guarente ym., Science, 209:1428 (1980); ja Guarente ym., Cell, 20:543 (1980)]. Optimi saavutetaan mittaamalla geenien ekspressiotaso plasmideissa, joissa tämä välimatka systemaattisesti muuttuu. Erilaisten mRNA:iden vertailu osoittaa, että tilastollisesti suositeltavimpia sekvenssejä on asemista -20 asemiin +13 (jolloin AUG:n A on asema o) [Gold ym., Annu. Rev. Microbiol., 35:365 (1981)]. Johto-sekvenssien on osoitettu vaikuttavan translaatioon dramaattisesti (Roberts ym., 1979 a, b supra).

(iii) AUG:tä seuraava nukleotidisekvenssi, joka vaikuttaa ribosomin sitomiseen [Taniguchi ym., J. Mol. Biol., 118:533 (1978)].

Käyttökelpoisia ribosomisitomiskohtia on esitetty alla olevassa taulukossa 2.

Taulukko 2

Ribosomisitomiskohtia*

	SEQ ID. NO.		
1.	(18)	5'	AAUCUUGGAGGCUUUUUUAUGGUUCGUUCU
2.	(19)	5'	UAACUAAGGAUGAAAUGCAUGUCUAAGACA
3.	(20)	5'	UCCUAGGAGGUUUGACCUAUGCGAGCUUUU
4.	(21)	5'	AUGUACUAAGGAGGUUGUAUGGAACAACGC

---

* Initiaatioalueiden sekvenssit proteiinisynteesiä varten neljässä faagin mRNA-molekyylissä on alleviivattu.

AUG = initiaatiokodoni (kaksoisalleviivaus)

1. = Faagio ∅ X174 geeni-A proteiini

2. = Faagi Qβ replikaasi

3. = Faagi R17 geeni-A proteiini

4. = Faagi lambda geeni-cro proteiini.

3' säätelysekvenssit muodostavat ainakin yhden lopetus(stop)kodonin kehyksessä ja se on operatiivisesti liitetty alavirtaan transloituvaan DNA-sekvenssiin.

Siten siis tämän keksinnön mukainen DNA-ekspressiovektori tuo käyttöön systeemin transloituvien DNA-sekvenssien kloonaamiseksi vektorin kasettiosaan sellaisen kistronin tuottamiseksi, joka pystyy ilmentämään tämän keksinnön mukaisen fuusiopolypeptidin.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa DNA-ekspressiovektori tuo käyttöön systeemin, jolla voidaan itsenäisesti kloonata (insertoida) kaksi transloituvaa DNA-sekvenssiä kahteen vektorissa läsnä olevaan erilliseen kasettiosaan kahden erillisen kistronin muodostamiseksi heterodimeerisen reseptorin molempien polypeptidien tai polypeptidien ligandin sitovien osien, jotka käsittävät jonkin heterodimeerisen reseptorin, ilmentämiseksi. Kahden kistronin eksressoimiseen tarkoitettua DNA-ekspressiovektoria nimitetään kaksikistroniseksi ilmentämisvektoriksi.

Siten siis tämän keksinnön mukainen suositeltava DNA-ilmentämisvektori käsittää, edellä yksityiskohtaisesti kuvatun kasetin lisäksi, toisen kasetin toisen fuusiopolypeptidin ilmentämistä varten. Toinen kasetti sisältää toisen transloituvan DNA-sekvenssin, joka koodaa sekreetiosignaalia, kuten edellä määriteltiin, joka on operatiivisesti liitetty sen 3'-päähän nukleotidisekvenssin kautta, joka soveltuu suunnattuun ligaatioon vektorin alavirran puoleiseen DNA-sekvenssiin, joka yleensä muodostaa ainakin yhden stopkodonin kasetin lukukehyksessä. Toinen transloituva DNA-sekvenssi on operatiivisesti liitetty sen 5'-päässä ekspressiota sääteleviin DNA-sekvensseihin, jotka muodostavat edellä määritellyt 5' elementit. Toinen kasetti kykenee, kun siihen insertoidaan jokin transloituva DNA-sekvenssi (insertti-DNA), ilmentämään toisen fuusiopolypeptidin, joka käsittää sekreetiosignaalin fuusion polypeptidiin, jota insertti-DNA koodaa.

Eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa DNA-ilmentämisvektori on rakennettu kätevän käsiteltävyyden vuoksi genomin sisältävän filamenttifaagipartikkelin muotoon tämän keksinnön selityksen mukaisesti. Tässä toteutusmuodossa DNA-ilmentämisvektori sisältää lisäksi nukleotidisekvenssin, joka määrittää filamenttifaagin muodostaman replikoitumislähtökohdan, niin että vektori sopivan geneettisen komplementtiosan esiintyessä voi replikoitua filamanettifaagina yksisäikeisessä replikaattimuodossa ja pakkautua filamenttifaagipartikkeleihin. Tämä tunnusmerkki tekee mahdolliseksi sen, että DNA-ilmentämisvektori voidaan pakata faagipar-

tikkeleihin partikkelin myöhempää sekreetiota varten ja sen sisältämä vektori erilleen muista partikkeleista, jotka käsittävät faagipartikkelipopulaation.

Eräs replikaation lähteenä käytettävä filamenttifaagi on, kuten hyvin tiedetään, faagigenomin alue, joka muodostaa replikaation initiaatiokohdan, replikaation lopetuskohdan ja replikaation avulla tuotetun kahdentuvan muodon pakkautumiskohdan. Katso esimerkiksi Rasched ym., Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986) ja Horiuchi, J. Mol. Biol., 188:215-223 (1986).

Eräs tässä keksinnössä käytettäväksi suositeltava replikaation aloitusfilamenttifaagi on M13-, f1- tai fd-replikaationlähdefaagi. Erityisen suositeltava on sellainen replikaationlähdefilamenttifaagi, jolla on numerolla SEQ ID NO. 117 esitetty sekvenssi ja jota kuvaavat Short ym., Nucl. Acids Res., 16:7583-7600 (1988). Suositeltavia DNA-ilmentämisvektoreita ovat kaksikistroniset ilmentämisvektorit pCOMB8, pCKAB8, pCOMB2-8, pCOMB3, pCKAB3, pCOMB2-3 ja pCOMB2-3', joita kuvataan esimerkissä 1.

Sikäli kuin tämän keksinnön mukaista vektoria voidaan manipuloida niin, että se sisältää insertti-DNA:n, jolloin sillä on kyky ilmentää fuusiopolypeptidi, eräs toteutusmuoto koskee edellä kuvattuja vektoreita, jotka sisältävät insertti-DNA:n. Erityisen suositeltavia vasta-ainegeenejä sisältäviä vektoreita ovat esimerkeissä kuvatut.

D. Polypeptidit

Erään toisen toteutusmuotonsa mukaan esillä oleva keksintö koskee polypeptidiä, joka käsittää inserttidomeenin, jonka molemmin puolin on aminoterminaalinen sekreetiosignaalidomeeni ja karboksiterminaalinen filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoonankkuroitumisdomeeni.

Polypeptidi on fuusiopolypeptidi, jossa on reseptoridomeeni, joka muodostuu aminohappotähdesekvenssistä, joka muodostaa reseptoriproteiinin ligandin (epitooppi) sitomisdomeenin, joka sijaitsee prokaryoottisen sekreetiosignaalidomeenin ja filamenttifaagin kalvoonankkuroitumisdomeenin välissä. Toisin sanoen inserttidomeeni fuusiopolypeptidissä on jonkin reseptorin ligandinsitomisdomeeni ja sitä nimitetään myös ligandin sitovaksi reseptoripolypeptidiksi.

Mikäli polypeptidissä on reseptorialue, sitä nimitetään tässä myös reseptoriksi. Eräissä muissa suositeltavissa toteutusmuodoissa sekreetiosignaalidomeeni on pelB-sekreetiosignaali, kuten tässä selityksessä kuvataan. Lisäksi on suositelta-

vaa, että kalvoonankkuroitumisdomeeni on johdettu filamenttifaagi-cpIII- tai -cpVIII-proteiineista, kuten tässä kuvataan.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa reseptoriproteiini on jonkin ligandia sitovan heterodimeerisen reseptorin polypeptidiketju. Vielä suositeltavammin heterodimeerinen reseptori on epitoopin sitova kompleksi.

Suositeltavia heterodimeerisiä reseptoreita ovat immunoglobuliinit, tärkeimmät luokan I tai II solujen yksilöllisyydestä vastaavat antigeenit, lymfosyyttireseptorit, integriinit ja vastaavat heterodimeeriset reseptorit. Immunoglobuliinit (vasta-ainemolekyylit) voivat olla Fab- tai Fv-palasten muodossa tai muina vasta-ainemolekyylin osina, jotka sisältävät raskaan ja kevyen ketjun variaabelin domeenin alueita.

Eräässä toteutusmuodossa tämän keksinnön mukaisella polypeptidillä on aminohappotähdesekvenssi, joka voidaan esittää kaavalla, joka esitetään suunnassa aminopäästä karboksipäähän:

(F1) NH_2-O$(U)_m$-V-$(X)_n$-Z-COOH,

jossa O edustaa aminohappotähdesekvenssiä, joka muodostaa sekreetiosignaalin, U edustaa ensimmäistä välipolypeptidiä, V edustaa aminohappotähdesekvenssiä, joka muodostaa reseptori domeenin (ligandin sitovan reseptoripolypeptidin), X edustaa toista välipolypeptidiä ja Z edustaa aminohappotähdesekvenssiä, joka muodostaa filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoankkurin, edellyttäen että m on kokonaisluku 0 tai 1, niin että kun m on 0, U ei ole läsnä, ja kun m on 1, U on läsnä, ja n on 0 tai 1, niin että kun n on 0, X ei ole läsnä, ja kun n on 1, X on läsnä.

Kaavassa (F1) sekreetiosignaali ja filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoankkuri ovat kuten edellä määriteltiin. Näin siis suositeltava polypeptidi käsittää vasta-aineen variaabelin alueen ketjusta johdetun polypeptidin, joka on operatiivisesti liitetty aminopäästään sekreetiosignaaliin ja operatiivisesti liitetty karboksipäästään kalvoankkuriin.

Tämän toteutusmuodon eräs suositeltava polypeptidi muodostuu pääasiassa vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidistä variaabelina alueena. Tässä yhteydessä "muodostuu pääasiassa" tarkoittaa, että polypeptidi ei sisällä vasta-aineen kevyen ketjun polypeptidiä tai osaa siitä. Erityisen suositeltava on kaavan (F1) mukainen polypeptidi, jossa Z tarkoittaa tässä kuvatun kaltaista cpIII- tai cpVIII-

kalvoankkuria. Eräässä toisessa suositeltavassa toteutusmuodossa sekreetiosignaali on pelB-sekreetiosignaali.

Tässä polypeptidien yhteydessä käytettynä sanonta "operatiivisesti liitetty" tarkoittaa, että polypeptidifragmentit tai polypeptidien edustamat proteiinialueet on kovalenttisesti liitetty johonkin yhden polypeptidin polymeeriin, mieluiten niin, että konventionaaliset amidisidokset ovat polypeptidissä liitetyt vierekkäisten aminohappojen väliin.

Eräässä toteutusmuodossa V on aminohappotähdesekvenssi, joka muodostaa heterodimeerisen reseptorimolekyylin ketjun ligandin sitovan domeenin ja suositeltavimmin se on immunoglobuliinin variaabelin alueen polypeptidi. Eräässä erityisen suositeltavassa polypeptidissä V on V_H- tai V_L-polypeptidi. Kaikkein suositeltavin on sellainen polypeptidi, jossa V on jonkin immunoglobuliinin V_H-polypeptidi (vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidi) ja m ja n ovat molemmat nollia.

Eräässä toisessa toteutusmuodossa U tai X voi tarkoittaa proteolyyttistä pilkkomiskohtaa, kuten prekursoriproteiinissa, kuten esimerkiksi protrombiinissa, esiintyvää aminohapposekvenssiä, faktoria X ja vastaavaa, joka muodostaa polypeptidin pilkkomiskohdan. Fuusiopolypeptidi, jossa on pilkkomiskohta, antaa käyttöön keinon puhdistaa polypeptidi faagipartikkelista, johon se on kiinnittynyt.

Polypeptidin spacereillä U ja X voi kullakin olla mikä tahansa aminohappotähdesekvenssi, jonka pituus on 1-6 aminohappotähdettä. Yleensä spaceritähteitä on polypeptidissä läsnä tekemässä mahdolliseksi lukukehyksen jatkuvan lukemisen, mikä on tarpeen, kun polypeptidi tuotetaan tässä selitetyillä menetelmillä, joissa käytetään tämän keksinnön mukaista DNA-ilmentämisvektoria.

Esillä olevan keksinnön mukainen reseptori mukautuu siten, että sillä on sitoutumiskohta, joka on spesifinen, minkä todistaa sen kyky inhiboitua kompetitiivisesti, jollekin ennalta valitulle tai ennalta määrätylle ligandille, kuten jollekin antigeenille, hapteenille, entsymaattiselle sub-straatille ja vastaaville. Eräässä toteutusmuodossa tämän keksinnön mukainen reseptori on jokin ligandin sitova polypeptidi, joka muodostaa antigeenin sitomiskohdan, joka sitoutuu erityisesti johonkin ennalta valittuun antigeeniin muodostaakseen kompleksin, jolla on riittävän voimakas sitoutumiskyky antigeenin ja eristettävän kompleksin sitoutumiskohdan välillä. Kun reseptori on jokin antigeenin sitova polypeptidi, sen affiniteetti tai aviditeetti on yleensä suurempi kuin 10^5 M^{-1}, useimmiten suurempi kuin 10^6 ja suositeltavimmin suurempi kuin 10^8 M^{-1}.

Eräässä toisessa toteutusmuodossa tämän keksinnön mukainen reseptori sitoo substraatin ja katalysoi tuotteen muodostumisen substraatista. Vaikka katalyyttisen reseptorin ligandin sitomiskohdan topologia on oletettavasti tärkeämpi sen ennalta valitun aktiivisuuden kannalta kuin sen affiniteetti (liittymisvakio eli pKa) substraattiin, kysymyksessä olevien katalyyttisten reseptorien liittymisvakio ennalta valittuun substraattiin on yleensä suurempi kuin 10^3 M^{-1}, tavallisemmin suurempi kuin 10^5 M^{-1} tai 10^6 M^{-1} ja suositeltavimmin suurempi kuin 10^7 M^{-1}.

Esillä olevan keksinnön mukainen reseptori on suositeltavimmin heterodimeerinen ja muodostuu sen vuoksi tavallisesti kahdesta eri polypeptidiketjusta, jotka yhdessä mukautuvat niin, että niiden sitoutumisaffiniteetti tai liittymisvakio ennalta valittuun ligandiin on mieluiten suurempi kuin kummankaan polypeptidin affiniteetti tai liittymisvakio yksinään, so. monomeereina. Heterodimeeristä reseptoria nimitetään ligandin sitovaksi heterodimeeriseksi reseptoriksi, jotta myös sen kyky sitoa ligandi tulee ilmi.

Näin siis eräs suositeltava toteutusmuoto koskee ligandin sitovaa heterodimeeristä reseptoria, joka käsittää ensimmäisen ja toisen polypeptidin. Ensimmäisen polypeptidin vieressä on aminoterminaalinen prokaryoottinen sekreetiosignaalidomeeni ja karboksiterminaalinen filamenttifaagin kalvoankkuridomeeni. Toinen polypeptidi on fuusioitunut aminoterminaaliseen prokaryoottiseen sekreetiosignaalidomeeniin. Eräs erityisen suositeltava ligandin sitova heterodimeerinen reseptori käyttää tässä kuvattua prokaryoottista sekreetiosignaalia. Lisäksi eräs suositeltava ligandin sitova heterodimeerinen reseptori sisältää kalvoankkurin, joka on johdettu cpIII:sta tai cpVIII:sta, kuten tässä on kuvattu.

Ligandin sitovaa heterodimeeristä reseptoria nimitetään epitoopin sitovaksi kompleksiksi sen osoittamiseksi, että kompleksilla on kyky sitoa ligandissa läsnä oleva epitooppi, ja sen ilmaisemiseksi, että heterodimeerinen reseptori on muodostettu liittämällä toisiinsa (kompleksoimalla) kaksi polypeptidiä, kuten tässä on kuvattu.

Toinen tai kumpikin erilaisista polypeptidiketjuista on suositeltavimmin johdettu jonkin immunoglobuliinin kevyen ketjun ja raskaan ketjun variaabelista alueesta. Yleensä polypeptidejä, joka käsittävät kevyen (V_L) ja raskaan (V_H) ketjun variaabelit alueet, käytetään yhdessä ennalta valitun ligandin sitomista varten.

Siten siis eräs toteutusmuoto koskee ligandin sitovaa heterodimeeristä reseptoria, jossa ensimmäinen polypeptidi on jonkin vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidi ja toinen polypeptidi on kevyen ketjun polypeptidi. Eräs vaihtoehtoinen toteutus-

muoto koskee ligandin sitovaa heterodimeeristä reseptoria, jossa ensimmäinen polypeptidi on vasta-aineen kevyen ketjun polypeptidi ja toinen on vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidi.

Esillä olevan keksinnön mukaan tuotettu reseptori voi olla aktiivinen sekä monomeerisessa että multimeerisessa muodossa, joko homomeerisenä tai heteromeerisenä, suositeltavimmin heterodimeerisenä. Esimerkiksi ligandin sitova V_H- ja V_L-polypeptidi, joka on tuotettu esillä olevan keksinnön mukaan, voi edullisesti olla yhdistetty heterodimeerimuotoon jomman kumman aktiivisuuden moduloimiseksi tai heterodimeerille ainutlaatuisen aktiivisuuden aikaansaamiseksi.

Silloin kun yksittäisiä ligandipolypeptidejä nimitetään tunnuksilla V_H ja V_L, heterodimeeriä voidaan nimittää tunnuksella Fv. On kuitenkin selvää, että V_H voi sisältää V_H:n lisäksi olennaisesti koko raskaan ketjun konstantin alueen tai osan siitä. Samaten V_L voi sisältää V_L:n lisäksi olennaisesti koko kevyen ketjun konstantin alueen tai osan siitä. Heterodimeeriä, joka muodostuu V_H:sta, joka sisältää osan raskaan ketjun konstantista alueesta, ja V_L:stä, joka sisältää olennaisesti koko kevyen ketjun vakioalueen, nimitetään termillä Fab-palanen. Fab:in tuottaminen voi joissakin tapauksissa olla eduksi, koska Fab-palaseen sisältyvät lisävakioaluesekvenssit voivat Fv-palaseen verrattuna stabiloida V_H:n ja V_L:n keskinäistä vuorovaikutusta. Tällainen stabilointi saattaa lisätä Fab-palasen affiniteettia antigeeniin. Lisäksi Fab-palasta käytetään alalla tavallisemmin ja siten saatavissa on enemmän kaupallisia vasta-aineita erityisesti Fab:in tunnistamiseksi seulontamenetelmissä.

Yksittäiset V_H- ja V_L-polypeptidit voidaan tuottaa yhtä pitkinä tai olennaisesti yhtä pitkinä kuin ne luonnostaan esiintyvät. Kuitenkin suositeltavissa toteutusmuodoissa V_H- ja V_L-polypeptidit käsittävät yleensä vähemmän kuin 120 aminohappotähdettä, tavallisemmin vähemmän kuin noin 120 aminohappotähdettä, vaikka tavallisesti ne käsittävät enemmän kuin 60 aminohappotähdettä, tavallisesti enemmän kuin noin 95 aminohappotähdettä, vielä tavallisemmin enemmän kuin noin 100 aminohappotähdettä. Suositeltavimmin V_H:n pituus on noin 110 - noin 230 aminohappotähdettä, kun taas V_L:n pituus on noin 95 - noin 214 aminohappotähdettä. Suositeltavimmin V_H- ja V_L-ketjut ovat tarpeeksi pitkiä muodostaakseen Fab-palasia.

Aminohappotähdesekvenssit vaihtelevat kovasti riippuen kysymyksessä olevasta erityisidiotyypistä. Tavallisesti on ainakin kaksi kysteiiniä, joita erottaa toisistaan noin 60-75 aminohappotähdettä ja joita yhdistää disulfidisidos. Esillä olevan kek-

sinnön mukaan tuotetut polypeptidit ovat tavallisesti olennaisia kopioita immunoglobuliinien kevyen ja/tai raskaan ketjun variaabelien alueiden idiotyypeistä, mutta joissakin tilanteissa polypeptidi voi sisältää satunnaisia mutaatioita aminohappotähdesekvensseissä halutun aktiivisuuden parantamiseksi edullisesti.

Eräissä tilanteissa on suotavaa saada aikaan V_H- ja V_L-polypeptidien kovalenttinen ristisidos, mikä voidaan toteuttaa tuomalla kysteiinitähteitä karboksyylipäihin. Polypeptidi valmistetaan tavallisesti ilman immunoglobuliinin konstantteja alueita, mutta pieni osa J-alueesta voidaan sisällyttää siihen valitsemalla edullisesti DNA-synteesin alukkeet. D-alue sisältyy tavallisesti V_H:n transskriptiin.

Tavallisesti V_H- ja V_L-polypeptidien C-pää-alueiden sekvenssit ovat vaihtelevampia kuin N-pään ja, esillä olevan strategian perusteella, niitä voidaan edelleen modifioida tavallisesti esiintyvien V_H- ja V_L-ketjujen variaation mahdollistamiseksi. Voidaan käyttää synteettistä polynukleotidiä yhden tai useamman aminohapon varioimiseksi hypervariaabelilla alueella.

E. Menetelmä kirjaston tuottamiseksi

1. Yleisperusteet

Erään toteutusmuotonsa mukaisesti esillä oleva keksintö tuo käyttöön systeemin ennalta valittujen ligandeja sitovien spesifiteettien samanaikaiseksi kloonaamiseksi ja seulomiseksi geenivalikoimista käyttäen yksinkertaista vektorisysteemiä. Tämä systeemi tekee mahdolliseksi kloonaus- ja seulontamenetelmien kytkemisen yhteen ja sille on kaksi edellytystä. Ensiksikin että heterodimeerisen reseptorin polypeptidiketjujen ilmentäminen jossakin in vitro ilmentämisisännässä, kuten E. colissa, edellyttää molempien polypeptidiketjujen ilmentämistä yhdessä, jotta funktionaalinen heterodimeerinen reseptori voi kokoontua tuottamaan reseptorin, joka sitoo ligandin. Toiseksi että kirjaston eristettyjen jäsenten seulonta jonkin ennalta valitun ligandinsitomiskyvyn kannalta edellyttää välinettä ilmennetyn reseptorimolekyylin sitomiskyvyn korreloimiseksi (kytkentä) johonkin sopivaa välineeseen geenin, joka koodaa kirjastosta peräisin olevaa jäsentä, eristämistä varten.

Ilmentämisen ja seulonnan kytkeminen suoritetaan yhdistämällä jonkin fuusiopolypeptidin kohdistaminen jonkin bakteerisolun periplasmaan funktionaalisen reseptorin kokoamiseksi ja jonkin fuusiopolypeptidin kohdistaminen filamenttifaagipartikkelin kuorelle faagin kokoontumisen aikana kysymyksessä olevan kirjaston jäsenen sopivaa seulontaa varten. Periplasmaan kohdentaminen tapahtuu jonkin

sekreetiosignaalidomeenin läsnäolon avulla tämän keksinnön mukaisessa fuusiopolypeptidissä. Kohdentaminen faagipartikkeliin saadaan aikaan filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoankkuridomeerin (so. cpIII:sta tai cpVIII:sta johdetun kalvoankkuridomeenin) läsnäolon avulla tämän keksinnön mukaisessa fuusiopolypeptidissä.

Esillä olevassa keksinnössä kuvataan yhdessä toteutusmuodossa menetelmää DNA-molekyylien muodostaman kirjaston tuottamiseksi, kunkin DNA-molekyylin käsittäessä kistronin fuusiopolypeptidin ilmentämiseksi filamenttifaagipartikkelin pinnalla. Menetelmä käsittää vaiheen (a), jossa muodostetaan ligaatioseos yhdistämällä johonkin ligaatiopuskuriin (i) valikoima polypeptidiä koodaavia geenejä ja (ii) joukko DNA-ilmentämisvektoreita lineaarisessa muodossa sovitettuna muodostamaan fuusiopolypeptidiä ilmentävän kistronin, ja vaiheen (b), jossa seos saatetaan alttiiksi ligaatio-olosuhteille riittävän pitkäksi ajaksi, jotta geenivalikoima liittyy operatiivisesti (ligatoituu) vektorijoukkoon kirjaston muodostamiseksi.

Tässä toteutusmuodossa polypeptidiä koodaavien geenien valikoima on kaksisäikeisen (ds) DNA:n muodossa ja kullakin valikoiman jäsenellä on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon. Lisäksi DNA-ilmentämisvektoreiden joukossa kukin on lineaarinen DNA-molekyyli, jolla on ylävirrassa ja alavirrassa kohesiiviset päät, jotka (a) on sovitettu ottamaan suunnatusti vastaan polypeptidigeenit yhteisessä lukukehyksessä, ja (b) operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran transloituviin DNA-sekvensseihin. Ylävirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa sekreetiosignaalia, mieluiten pelB-sekreetiosignaalia, ja alavirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa filamenttifaagin kuoriproteiinin kalvoankkuria, kuten tässä selityksessä kuvattiin keksinnön mukaisen polypeptidin yhteydessä. Transloituvat DNA-sekvenssit on myös operatiivisesti liitetty vastaaviin ylävirran ja alavirran DNA-ilmentymistä säätéleviin sekvensseihin, kuten määriteltiin tässä kuvatun DNA-ilmentämisvektorin yhteydessä.

Tällä tavoin tuotettua kirjastoa voidaan käyttää kirjaston edustaman kistronikirjaston koodaamien fuusiopolypeptidien ilmentämiseen ja seulomiseen tässä kuvatuilla ilmentämis- ja seulontamenetelmillä.

2. Geenivalikoimien tuottaminen

Geenivalikoima on valikoima erilaisia geenejä, mieluiten polypeptidejä koodaavia geenejä (polypeptidi-geenejä), ja ne voidaan eristää luonnonlähteistä tai ne voidaan tuottaa keinotekoisesti. Suositeltavimmat geenivalikoimat muodostuvat

säilyneistä geeneistä. Erityisen suositeltavat geenivalikoimat käsittävät joko yhden tai molemmat geenit, jotka koodaavat dimeerisen reseptorimolekyylin osia.

Geenivalikoima, jota voidaan käyttää tämän keksinnön toteuttamisessa käytännössä, sisältää vähintään 10^3, mielellään vähintään 10^4, vielä mieluummin vähintään 10^5 ja kaikkein suositeltavimmin vähintään 10^7 erilaista geeniä. Menetelmät jonkin geenirepertuaarin diversiteetin arvioimiseksi ovat tuttuja alaan perehtyneelle.

Niinpä siis esillä oleva keksintö koskee erään toteutusmuotonsa mukaan menetelmää geeniparin, joka koodaa dimeeristä reseptoria, jolla on ennalta valittu aktiivisuus, eristämiseksi säilyneiden geenien valikoimasta. Lisäksi kuvataan kloonatun geeniparin ilmentämistä ja saadun ilmennetyn dimeerisen reseptoriproteiinin eristämistä. Suositeltavimmin reseptori on jokin heterodimeerinen polypeptidi, joka pystyy sitomaan jonkin ligandin, kuten esimerkiksi jonkin vasta-ainemolekyylin tai immunologisesti aktiivisen osan siitä, jonkin solureseptorin tai jonkin solun adheesioproteiinin, jota jokin säilyneiden geenien, so. geenien, jotka sisältävät säilyneen nukleotidisekvenssin, jonka pituus on vähintään noin 10 nukleotidia, perheen jäsenistä koodaa.

Esimerkkejä säilyneistä geeniperheistä, jotka koodaavat jonkin dimeerisen reseptorin eri polypeptidiketjuja, ovat sellaiset, jotka koodaavat immunoglobuliineja, tärkeimpiä luokan I tai II solujen yksilöllisyydestä vastaavia kompleksiantigeeneja (histocompatibity complex antigens), lymfosyyttireseptoreita, integriinejä ja vastaavia.

Geeni voidaan identifioida kuuluvaksi johonkin säilyneiden geenien valikoimaan useita menetelmiä käyttäen. Esimerkiksi jotakin eristettyä geeniä voidaan käyttää hybridisaatiokoettimena ei kovin tiukoissa olosuhteissa ilmaisemaan muita genomi-DNA:ssa läsnä olevia säilyneiden geenien valikoiman jäseniä käyttäen menetelmiä, joita on kuvannut Southern, J. Mol. Biol., 98:503 (1975). Mikäli hybridisointikoettimena käytetty geeni hybridisoituu moniin genomin restriktioendonukleaasifragmentteihin, geeni on säilyneiden geenien valikoiman jäsen.

Immunoglobuliinit

Immunoglobuliinit eli vasta-ainemolekyylit muodostavat laajan molekyyliperheen, johon kuuluu useita molekyylityyppejä, kuten IgD, IgG, IgA, IgM ja IgE. Vasta-ainemolekyyli muodostuu yleensä kahdesta raskaasta (H) ja kevyestä (L) ketjusta, joissa on sekä variaabeli (V) että konstantti (C) alue kussakin ketjussa, kuten

kuviossa 1 osoitetaan. Kaaviokuvat ihmisen IgG:n raskaasta ketjusta ja ihmisen kappa-kevytketjusta on esitetty vastaavasti kuvioissa 2A ja 2B. Immunoglobuliinin useat eri alueet sisältävät säilyneitä sekvenssejä, joita voidaan käyttää immunoglobuliinivalikoiman eristämiseen. Laajaa tietoa aminohappo- ja nukleiinihappo-sekvensseistä, jotka ovat esimerkkejä säilyneistä sekvensseistä ovat keränneet immunoglobuliineja varten Kabat ym., julkaisussa "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institute of Health, Bethesda, MD, 1987.

H-ketjun C-alue muodostaa immunobloguliinien erityistyypin. Sen vuoksi tässä määriteltyjen säilyneiden sekvenssien valinnan H-ketjun C-alueesta tuloksena voidaan valmistaa immunoglobuliinigeenien repertuaari, johon kuuluu valitun C-alueen immunoglobuliinityypin jäseniä.

H- tai L-ketjun V-alue käsittää yleensä neljä kehysaluetta (FR), joista kunkin vaihtelevuus, johon kuuluu säilyneiden sekvenssien pätkiä, on suhteellisesti vähäisempää. V_H-ketjun FR1- ja FR4- (J-alue)-kehysalueesta peräisin olevien säilyneiden sekvenssien käyttö on eräs suositeltava toteutusesimerkki ja sitä kuvataan esimerkeissä. Kehysalueet säilyvät yleensä läpi useiden tai kaikkien immunoglobuliinityyppien ja siten niiden sisältämät säilyneet sekvenssit ovat erityisen sopiva repertuaarien, joissa on useita immunoglobuliinityyppejä, valmistukseen.

"Major Histocompatibility Complex"

"Major Histocompatibility Complex" (MHC) on laaja geneettinen lokus, joka koodaa laajaa proteiinien ryhmää, joihin sisältyy useita molekyyliluokkia, joita nimitetään class I, class II tai class III MHC-molekyyleiksi. Paul ym., julkaisussa Fundamental Immunology, Raven Press, NY, ss. 303-378 (1984).

Class I MHC-molekyylit muodostavat polymorfisen ryhmän transplantaatioantigeeneja, jotka edustavat säilynyttä ryhmää, jossa antigeeni muodostuu raskaasta ketjusta ja ei MHC:n koodaamasta kevyestä ketjusta. Raskaaseen ketjuun kuuluu useita alueita, joita nimitetään N-, C1-, C2-, kalvo- ja sytoplasma-alueiksi. Säilyneet sekvenssit, joita tässä keksinnössä voidaan käyttää, löytyvät ensisijaisesti N-, C1- ja C2-alueilta ja ne identifioidaan "invarianttien tähteiden" jatkuviksi sekvensseiksi yllä mainitussa Kabat ym. julkaisussa.

Class II MHC-molekyylit käsittävät säilyneen perheen polymorfisia antigeeneja, jotka osallistuvat immuunivasteen muodostumiseen ja muodostuvat α- ja β-ketjusta. α- ja β-ketjua koodaavat geenit sisältävät kukin useita alueita, joissa on säilyneitä sekvenssejä, jotka soveltuvat class II α- ja β-ketjun MHC-valikoimien

tuottamiseen. Esimerkkejä säilyneistä nukleotidisekvensseistä ovat sellaiset, jotka koodaavat A1-alueen aminohappotähteitä 26-30, A2-alueen tähteitä 161-170 ja kalvoalueen tähteitä 195-206, jotka kaikki alueet kuuluvat α-ketjuun. Säilyneitä alueita on myös läsnä ß-ketjun B1-, B2- ja kalvoalueilla nukleotidisekvensseissä, jotka koodaavat aminohappotähteitä 41-45, 150-162 ja 200-209, vastaavasti.

Lymfosyyttireseptorit ja solun pinta-antigeenit

Lymfosyyteissä on useita proteiiniperheitä solujen pinnoilla, mukaanlukien T-solureseptori, Thy-1-antigeeni ja lukuisia T-solun pinta-atigeeneja, joihin kuuluvat antigeenit, jotka on määritelty monoklonaalisiksi vasta-aineiksi OKT4 (leu3), OKT5/8 (leu2), OKT3, OKT1 (leu1), OKT 11 (leu5), OKT6 ja OKT9. Paul, supra ss. 458-479.

T-solureseptori on termi, jota käytetään ryhmästä antigeeneja sitovia molekyylejä, joita tavataan T-solujen pinnalla. T-solureseptorilla on ryhmänä polymorfinen sitomis-spesifisyys, joka on monimuotoisuudessaan samanlainen kuin immunoglobuliinien. Kypsä T-solureseptori muodostuu α- ja β-ketjusta, joista kummassakin on variaabeli (V) ja konstantti (C) alue. Samankaltaisuudet, joita T-solureseptorilla on immunoglobuliinien kanssa geneettisessä organisaatiossaan ja toiminnassa, osoittaa että T-solureseptori sisältää säilyneiden sekvenssien alueita. Lai ym., Nature, 331:543-546, (1988).

Esimerkkejä säilyneistä sekvensseistä ovat sellaiset, jotka koodaavat α-ketjun aminohappotähteitä 84-90, β-ketjun aminohappotähteitä 107-115 ja gamma-ketjun aminohappotähteitä 91-95 ja 111-116. Kabat ym., supra, s. 279.

Integriinit ja adheesiot

Solun kiinnittymisessä mukana olevat adheesioproteiinit kuuluvat laajaan ryhmään toisiaan läheisesti muistuttavia proteiineja, joita nimitetään integriineiksi. Integriinit ovat heterodimeerejä, jotka muodostuvat α- ja ß-alayksiköistä. Integriiniryhmän jäseniin kuuluvat solun pintaglykoproteiinien verihiutalereseptori GpIIb-IIIa, vitronektiinireseptori (VnR), fibronektiinireseptori (FnR) ja leukosyyttiadheesioreseptorit LFA-1, Mac-1- Mo-1 ja 60.3. Rouslahti ym., Science, 238:491-497 (1987). Nukleiinihappo- ja ja proteiinisekvenssejä koskevat tiedot osoittavat, että näiden ryhmien jäsenissä on konservoitujen sekvenssien alueita, erityisesti GpIIb-IIIa:n, VnR:n ja FnR:n β-ketjun välillä ja VnR:n, Mac-1:n, LFA-1:n, FnR:n ja GpIIb-IIIa:n α-alayksikön välillä. Suzuki ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8614-8618, 1986; Ginsberg ym., J. Biol. Chem., 262:5437-5440, 1987.

Erilaisia tunnettuja menetelmiä voidaan käyttää käyttökelpoisen geenivalikoiman tuottamiseen. Esimerkiksi V_H- ja V_L-geenivalikoimia voidaan tuottaa eristämällä V_H- ja V_L-koodaava mRNA vasta-ainetta tuottavien solujen, esim. B-lymfosyyttien (B-solujen), suositeltavimmin uudelleen järjestyneiden B-solujen, jollaisia esiintyy selkärankaisen verenkierrossa tai pernassa, heterogeenisestä populaatiosta. Uudelleen järjestyneet B-solut ovat sellaisia, joissa on tapahtunut immunoglobuliinigeenitranslokaatiota, so. uudelleen järjestymistä, minkä osoittaa mRNA:n läsnäolo solussa, immunoglobuliinigeenin V-, D- ja J-alueen transskriptien sijaitessa siinä vierekkäin. Yleensä B-soluja kootaan 1-100 ml:n verinäytteestä, joka tavallisesti sisältää 10^6 B-solua/ml.

Joissakin tapauksissa on suotavaa vinouttaa valikoima jonkin ennalta valitun aktiivisuuden suhteen, kuten esimerkiksi käyttämällä jotakin nukleiinihapposolulähdettä (lähdesolut), joka on peräisin selkärankaisista riippumatta eri ikäkausista, terveydentilasta ja immuunivasteesta. Esimerkiksi terveen eläimen toistuva immunisoiminen ennen uudelleen järjestyneiden B-solujen keräämistä antaa tulokseksi valikoiman, jossa on runsaasti geneettistä materiaalia, joka tuottaa erittäin korkean affiniteetin omaavan reseptorin. Mullinax ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:8095-8099 (1990). Sitävastoin taas uudelleen järjestyneiden B-solujen kerääminen terveestä eläimestä, jonka immuunijärjestelmää ei ole äskettäin koeteltu (so. natiivi immuunijärjestelmä), antaa tulokseksi valikoiman, johon ei ole vaikutettu niin, että se tuottaa korkean affiniteetin omaavia V_H- ja/tai V_L-polypeptidejä.

Huomattakoon, että mitä suurempi on solujen, joita varten nukleiinihapot saadaan, populaation heterogeenisyys, sitä suurempi on immunologisen valikoiman (joka sisältää V_H- ja V_L-koodaavia geenejä), joka on saatavissa esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä seulomista varten, diversiteetti. Siten soluja, jotka ovat peräisin eri yksilöistä, erityisesti sellaisista, joiden iässä on immunologisesti merkittävä ero, ja soluja, jotka ovat peräisin eri kantoja, rotuja tai lajeja edustavista yksilöistä, voidaan edullisesti yhdistää valikoiman heterogeenisyyden (diversiteetin) lisäämiseksi.

Siten eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa lähdesolut saadaan selkärankaiselta, suositeltavimmin joltakin nisäkkäältä, joka on immunisoitu tai osittain immunisoitu jollakin antigeeniligandilla (antigeenillä), jota vastaan aktiivisuutta haetaan, so. jollakin ennalta valitulla antigeenillä. Immunisointi voidaan suorittaa tavanomaisella tavalla. Vasta-aineen tiitteriä eläimessä voidaan tarkkailla halutun immunisointiasteen määrittämiseksi, mikä aste vastaa halutun valikoiman rikastus- tai vinouttamisastetta. Osittain immunisoidut eläimet saavat yleensä vain yhden

immunisointikerran ja soluja kerätään näistä eläimistä pian vasteen ilmenemisen jälkeen. Täysin immunisoiduilla eläimillä esiintyy huipputiitteri, joka saavutetaan yhdellä tai useammalla toistetulla antigeeniruiskeella, joka annetaan isäntänisäkkäälle, tavallisesti 2-3 viikon välein. Tavallisesti 3-5 päivää viimeisen altistuksen jälkeen perna poistetaan ja pernasolujen, joista noin 90 % on uudelleen järjestyneitä B-soluja, geneettinen valikoima eristetään standardimenettelyjä käyttäen. Katso Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel ym., toim., John Wiley & Sons, NY. Nukleiinihappoja, jotka koodaavat V_H- ja V_L-polypeptidejä, voidaan johtaa soluista, jotka tuottavat IgA:ta, IgD:tä, IgE:tä, IgG:tä tai IgM:ää, mieluiten IgM:ää ja IgG:tä tuottavista soluista.

Alalla tunnetaan hyvin menetelmiä genomi-DNA:n fragmenttien valmistamiseksi, joista fragmenteista voidaan kloonata immunoglobuliinin variaabelin alueen geenejä diverssinä populaationa. Katso esimerkiksi Herrmann ym., Methods in Enzymol., 152:180-183 (1987); Frischauf, Methods in Enzymol., 152:183-190 (1987); Frischauf, Methods in Enzymol., 152-190-199 (1987) ja DiLella ym., Methods in Enzymol., 152:199-212 (1987). (Tässä mainittujen viitejulkaisujen sisältämä oppi liitetään tähän viitteenä).

Haluttu geenivalikoima voidaan eristää joko genomisesta materiaalista, joka sisältää geenin, joka ilmentää variaabelin alueen, eli lähetti-RNA:n (mRNA), joka edustaa variaabelin alueen transskriptia. Vaikeus käytettäessä genomi-DNA:ta, joka on lähtöisin muista kuin ei-uudelleen järjestyneistä B-lymfosyyteistä, on sekvenssien, jotka koodaavat variaabelia aluetta, missä sekvenssejä ovat erottamassa toisistaan intronit, vierekkäin asettelussa. Varsinaiset eksonit sisältävä DNA-fragmentti tai -fragmentit tulee eristää, intronit katkaista ja eksonit sitten pilkkoa oikeassa järjestyksessä ja oikeassa suunnassa. Useimmiten tämä on vaikeaa, niin että vaihtoehtoinen tekniikka, jossa käytetään uudelleen järjestyneitä B-soluja, on parempi menetelmä, koska immunoglobuliinigeenin V-, D- ja J-alueet ovat siirtyneet vierekkäin, niin että sekvenssi on jatkuva (ilman introneita) koko variaabelien alueiden osalta.

Silloin kun käytetään mRNA:ta, solut lysoidaan RNaasia inhiboivissa olosuhteissa. Eräässä toteutusmuodossa ensimmäisenä vaiheena on eristää koko solun mRNA. Poly A+ mRNA voidaan sitten valikoida hybridisoimalla oligo-dT-selluloosakolonniin. mRNA:iden, jotka koodaavat raskaan ja/tai kevyen ketjun polypeptidejä, läsnäolo voidaan sitten analysoida hybridisaation avulla käyttämällä sopivien geenien yksisäikeistä DNA:ta. Polynukleotidikoettimina voidaan sopivasti käyttää sekvenssejä, jotka koodaavat V_H:n tai V_L:n konstantteja osia ja jotka voidaan

saada vaihtelevista lähteistä. Katso esimerkiksi Early ja Hood, Genetic Engineering, Setlow ja Hollaender, toim., osa 3, Plenum Publishing Corporation, NY, (1981), sivut 157-188 ja Kabat ym., Sequences of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1987).

Suositeltavissa toteutusmuodoissa valmiste, joka sisältää kokonaissolu-mRNA:n, rikastetaan ensiksi mRNA:ta koodaavaa V_H:ta ja/tai V_L:ää varten. Rikastaminen suoritetaan yleensä suorittamalla kokonais-mRNA-valmisteelle tai siitä valmistetulle osittain puhdistetulle mRNA-tuotteelle alukkeella tapahtuva pidennysreaktio, jossa käytetään polynukleotidisynteesin aluketta, kuten tässä kuvataan. Esimerkkejä menetelmistä, joilla tuotetaan V_H- ja V_L-geenivalikoimia käyttäen polynukleotidisynteesialukkeita, kuvataan PCT-hakemuksessa nro PCT/US 90/02836 (kansainvälinen julkaisu nro WO 90/14430). Erityisen suositeltavissa menetelmissä geenivalikoiman valmistamiseksi turvaudutaan ennalta valittujen oligonukleotidien käyttöön alukkeina polymeraasiketjureaktiossa (PCR) PCR-reaktiotuotteiden muodostamiseksi, kuten tässä kuvataan.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa eristetyt B-solut immunisoidaan in vitro jotakin ennalta valittua antigeenia vastaan. In vitro -immunisointi määritellään epitooppispesifisten B-solujen kloonausekspansioksi viljelyssä vasteena antigeenistimulaatioon. Lopputuloksena on antigeenispesifisten B-solujen esiintymisen kaasvaminen immunoglobuliinivalikoimassa ja siten kloonien lukumäärän lasku ekspressiokirjastossa, joka tulee seuloa halutun spesifisyyden omaavaa vasta-ainetta ilmentävän kloonin identifioimiseksi. In vitro suoritetun immunisoinnin etuna on, että ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita voidaan kehittää rajatonta määrää terapeuttisesti arvokkaita antigeeneja vastaan, mukaanlukien toksiset ja heikot immunogeenit. Esimerkiksi voidaan tuottaa vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä tuumoriin liittyvien antigeenien, reumatekijöiden ja HCA-antigeenien polymorfisille determinanteille ja joita ei voida saada esiin immunisoiduissa eläimissä. Lisäksi voi olla mahdollista kehittää immuunivasteita, jotka normaalisti suppressoituvat in vivo.

In vitro -immunisointia voidaan käyttää joko jonkin primaarisen tai sekundaarisen immuunivasteen kehittämiseksi. Primaarisen immuunivasteen, joka saadaan B-solun altistamisesta ensi kerran jollekin antigeenille, tuloksena on epitooppi-spesifisten solujen klonaalinen ekspansio ja IgM-vasta-aineiden, joiden nimellisaffiniteettivakiot ovat matalasta kohtalaiseen (10^6-10^8 M^{-1}), sekreetio. Ihmisen perna- ja kitarisalymfosyyttien primaari-immunisointia viljelyssä voidaan käyttää tuottamaan monoklonaalisia vasta-aineita erilaisia antigeeneja vastaan, mukaanlukien solut,

peptidit, makromolekyylit, hapteenit ja tuumoreihin liittyvät antigeenit. Muisti-B-soluja, jotka ovat peräisin immunisoiduista donoreista, voidaan myös stimuloida viljelyssä sekundaarisen immuunivasteen herättämiseksi, jolle vasteelle on karakteristista IgG-isotyyppiä olevien suuren affiniteetin ($>10^9$ M^{-1}) omaavien vasta-aineiden klonaalinen ekspansio ja tuottaminen, erityisesti virusantigeeneja kohtaan, klonaalisesti pidentämällä herkistettyjä lymfosyyttejä, jotka ovat peräisin seropositiivisista yksilöistä.

Eräässä toteutusmuodossa periferaalisen veren lymfosyyteistä poistetaan erilaisia sytolyyttisiä soluja, jotka näyttävät vaimentavan antigeeni-spesifisten B-solujen aktivoitumista. Kun runsaslysosomiset alapopulaatiot (luonnolliset tappajasolut, sytotoksiset ja suppressori-T-solut, monosyytit) on ensin poistettu käsittelemällä leusiinin lysosmotrooppisella metyyliesterillä, jäljelle jäävät solut (mukaanlukien B-solut, T-auttajasolut, apusolut) tuottavat antigeeni-spesifisen vasteen in vitro -immunisoinnin aikana. Lymfokiinivaatimukset vasta-ainetuotannon alkuunpanemiseksi viljelyssä saadaan tyydytetyksi viljelysupernatantilla, joka on peräisin aktivoiduista, säteilytetyistä T-soluista.

In vitro -immunisoinnin lisäksi voidaan käyttää solujen seulontaa (immunoaffiniteettiabsorptiota) antigeeni-spesifisten B-solujen frekvenssin lisäämiseksi edelleen. Tekniikat B-solualapopulaatioiden valikoimiseksi kiinteäfaasisella antigeenin sitomisella ovat vakiintuneita. Seulontaolosuhteet voidaan tehdä optimaalisiksi B-solujen, jotka sitoutuvat suurella affiniteetilla erilaisiin antigeeneihin, mukaanlukien solun pintaproteiinit, frekvenssin lisäämiseksi valikoivasti. Seulontaa voidaan käyttää yksinään tai yhdistettynä in vitro -immunisointiin, antigeeni-spesifisten solujen frekvenssin lisäämiseksi yli tasojen, jotka voidaan saavuttaa kummalla tahansa tekniikalla yksinään. Immunoglobuliinia ilmentävät kirjastot, jotka on rakennettu rikastetuista B-solupopulatioista, vinoutetaan antigeeni-spesifisten vasta-ainekloonien eduksi ja siten tehdään mahdolliseksi haluttuja erityisominaisuuksia omaavien kloonien identifioiminen pienemmistä, vähemmän monimutkaisista kirjastoista.

Eräässä toteutusmuodossa donorina olevat periferaalisen veren lymfosyytit (PBL) voidaan siirtää SCID-oireyhtymää (severe combined immunodeficiency) sairastaviin hiiriin ja sitten vahvistaa in vivo SCID-hiirissä immuunivasteen lisäämiseksi ennen H- ja L-ketjua koodaavien nukleiinihappojen keräämistä talteen SCID-hiirien B-soluista. Katso esimerkiksi Duchosal ym., Nature, 355:258-262 (1992). Tuossa raportissa vahvistettiin ihmisen PBL:iä, jotka olivat peräisin donorista, jolla esiintyi anti-tetanustoksoidi(TT)- tiittereitä, SCID-hiiri-isännässä. Saadun

370 000 kloonia käsittävän kirjaston saantona oli 2 faagipartikkelia, jotka ilmensivät pinta-Fab:ia, jotka kykeni sitoutumaan TT:hen.

3. Polynukleotidialukkeiden valmistaminen

Termi "polynukleotidi" tässä käytettynä viittaamassa alukkeisiin, koettimiin ja nukleiinihappofragmentteihin tai -segmentteihin, joita on määrä syntetisoida alukkeen avulla pidentämällä, määritetään molekyyliksi, joka muodostuu kahdesta tai useammasta deoksiribonukleotidista tai ribonukleotidista, suositeltavimmin useammasta kuin 3:sta. Sen tarkka koko riippuu monista tekijöistä, jotka vuorostaan ovat riippuvaisia myöhemmistä käyttöolosuhteista.

Termi "aluke" tässä käytettynä viittaa polynukleotidiin, joka on joko puhdistettu jostakin nukleiinihapon restriktiodigerointituotteesta tai tuotettu synteettisesti ja joka pystyy toimimaan nukleiinihapposynteesin aloituskohtana, kun se saatetaan olosuhteisiin, joissa alkaa alukkeen avulla pidennetyn tuotteen, joka on komplementaarinen jollekin nukleiinihapposäikeelle, synteesi, so. nukleotidien ja jonkin polymerointiaineen, kuten DNA-polymeraasin, käänteistransskriptaasin tai vastaavan, läsnäollessa ja sopivassa lämpötilassa ja pH:ssa. Aluke on suositeltavimmin yksisäikeinen maksimitehon aikaansaamiseksi, mutta se voi vaihtoehtoisesti olla kaksisäikeisenä muotona. Mikäli aluke on kaksisäikeinen, se käsitellään ensiksi sen erottamiseksi sen komplementaarisäikeestä ennen kuin sitä käytetään pidennystuotteiden valmistukseen. Suositeltavimmin aluke on polydeoksiribonukleotidi. Alukkeen on oltava tarpeeksi pitkä, jotta se panee alulle pidennystuotteiden synteesin polymerointiaineiden läsnäollessa. Alukkeiden täsmälliset pituudet riippuvat monista tekijöistä, mukaanlukien lämpötila ja lähde, josta aluke on peräisin. Esimerkiksi kohdesekvenssin kompleksisuudesta riippuen polynukleotidialuke sisältää yleensä 15-25 tai useampia nukleotideja, vaikka se voi sisältää vähemmänkin nukleotideja. Lyhyet alukemolekyylit yleensä vaativat viileämpiä lämpötiloja muodostaakseen riittävän stabiileja hybridikomplekseja templaattien kanssa.

Tässä käytettäviksi alukkeiksi valitaan sellaisia, jotka ovat "olennaisesti" komplementaarisia kunkin kysymyksessä olevan syntetisoitavan tai kopioitavan sekvenssin eri säikeille. Tämä tarkoittaa, että alukkeen tulee olla riittävän komplementaarinen hybridisoituakseen ei-satunnaisesti kysymyksessä olevan templaattisäikeen kanssa. Sen vuoksi alukesekvenssi saattaa heijastaa tai olla heijastamatta templaatin tarkkaa sekvenssiä. Esimerkiksi jokin ei-komplementaarinen nukleotidifragmentti voidaan kiinnittää alukkeen 5'-päähän, muun osan alukesekvenssistä ollessa olennaisesti komplementaarinen säikeelle. Tällaiset ei-komplementaariset

fragmentit yleensä koodaavat jotakin endonukleaasirestriktiokohtaa. Vaihtoehtoisesti alukkeeseen voidaan sirotella ei-komplementaarisia emäksiä tai pitempiä sekvenssejä, edellyttäen että sekvenssi on riittävän komplementaarinen syntetisoitavan tai kopioitavan säikeen sekvenssille, jotta se hybridisoituu sen kanssa ei-satunnaisesti ja siten muodostaa pidennystuotteen polynyukleotidin syntetisointiolosuhteissa.

Tämän keksinnön mukaiset alukkeet sisältävät myös DNA:sta riippuvaisen RNA-polymeraasipromoottorisekvenssin tai sen komplementin. Katso esimerkiksi Krieg ym., Nucl. Acids Res., 12:7057-70 (1984); Studier ym., J. Mol. Biol. 189:113-130 (1986) ja Molecular Cloning: A Laboratory Manual, toinen painos, Maniatis ym., toim. Cold Spring Harbor, NY (1989).

Kun käytetään aluketta, joka sisältää jonkin DNA-riippuvaisen RNA-polymeraasipromoottorin, aluke hybridisoituu monistettavaan polynukleotidisäikeeseen ja DNA-riippuvaisen RNA-polymeraasipromoottorin toinen polynukleotidisäie täydennetään käyttämällä jotakin indusoivaa ainetta, kuten esimerkiksi E. coli DNA polymeraasi I:tä tai E. coli DNA-polymeraasin Klenowin fragmenttia. Aloituspolynukleotidi monistetaan vuorotellen RNA-polynukleotidin ja DNA-nukleotidin tuottamisen kanssa.

Alukkeet voivat myös sisältää templaattisekvenssin tai replikaation aloituskohdan RNA-ohjattua RNA-polymeraasia varten. Eräs tyypillinen RNA-ohjattu RNA-polymeraasi on QB-replikaasi, jota kuvaavat Lizardi ym., Biotechnology, 6:1197-1202 (1988). RNA-ohjatut polymeraasit tuottavat suuria määriä RNA-säikeitä pienestä määrästä templaatti-RNA-säikeitä, jotka sisältävät templaattisekvenssin tai replikaation aloituskohdan. Nämä polymeraasit antavat yleensä templaattisäikeen miljoonakertaisen kopioinnin, kuten ovat kuvanneet Kramer ym., J. Mol. Biol., 89:719-736 (1974).

Polynukleotidialukkeet voidaan valmistaa mitä tahansa sopivaa menetelmää käyttäen, kuten esimerkiksi fosfotriesteri- tai fosfodiesterimenetelmiä, katso Narang ym., Meth. Enzymol., 68:90 (1979), US-patentti nro 4356270 ja Brown ym., Meth. Enzymol., 68:109, (1979).

Alukkeen nukleotidisekvenssin valinta riippuu sellaisista tekijöistä, kuten etäisyydestä nukleiinihapon pinnalla alueesta, joka koodaa haluttua reseptoria, sen hybridisoitumispaikasta nukleiinihapon pinnalla mihin tahansa toiseen käytettävään

alukkeeseen nähden, geenien lukumäärästä valikoimassa, johon se on määrä hybridisoida, ja vastaavista.

a. Alukkeet immunoglobuliinigeenivalikoimien tuottamista varten

V_H- ja V_L-geenivalikoimia voidaan tuottaa erikseen ennen niiden käyttämistä tässä keksinnössä. Valikoiman valmistus suoritetaan yleensä alukkeen avulla pidentämällä, suositeltavimmin alukkeen avulla pidentämällä polymeraasiketjureaktio (PCR)-formaatissa.

V_H-koodaavien DNA-homologien valikoiman valmistamiseksi alukkeen avulla pidentämällä alukkeen nukleotidisekvenssi valikoidaan sellaiseksi, että se hybridisoituu moniin immunoglobuliinin raskaan ketjun geeneihin kohdassa, joka on olennaisesti V_H-koodaavan alueen vieressä, jolloin saadaan nukleotidisekvenssi, joka koodaa funktionaalista (sitoutumaan kykenevää) polypeptidiä. Monien eri V_H-koodaavien nukleiinihapposäikeiden hybridisoimiseksi alukkeen tulee olla jonkin eri säikeiden joukossa olevan nukleotidisekvenssin olennainen komplementti. Sellaisia kohtia ovat nukleotidisekvenssit konstantilla alueella, millä tahansa variaabelin alueen kehyksen alueella, mieluiten kolmannen kehyksen alueella, johtoalueella, promoottorialueella, J-alueella tai vastaavalla.

Jos V_H-koodaavat ja V_L-koodaavat DNA-homologien valikoimat on määrä valmistaa (PCR)-monistuksen avulla, on kunkin monistettavan nukleiinihapon kutakin koodaavaa säiettä varten käytettävä kahta aluketta, so. PCR-alukeparia. Ensimmäisestä alukkeesta tulee osa nonsense-säiettä (minus eli komplementaarista) ja se hybridisoituu johonkin valikoimaan sisältyvien V_H-säikeiden (plus eli koodaavien) joukossa olevaan nukleotidisekvenssiin. V_H-koodaavien DNA-homologien valmistamiseksi ensimmäiset alukkeet valitaan sen vuoksi hybridisoitumaan säilyneisiin alueisiin (so. olemaan niille komplementaarisia) immunoglobuliinigeenien ja vastaavien J-alueen, CH1-alueen, sarana-alueen, CH2-alueen tai CH3-alueen sisällä. V_L-koodaavan DNA-homologin valmistamiseksi ensimmäiset alukkeet valitaan hybridisoitumaan säilyneeseen alueeseen (so. olemaan niille komplementaarisia), joka on immunoglobuliinin kevyen ketjun geenien J-alueella tai konstantilla alueella ja vastaavilla. Toisista alukkeista tulee osa koodaavaa (plus) säiettä ja ne hybridisoituvat minus-säikeiden joukossa säilyneeseen nukleotidisekvenssiin. V_H-koodaavien DNA-homologien tuottamiseksi toiset alukkeet valitaan sitä varten hybridisoitumaan säilyneeseen nukleotidisekvenssiin, joka on V_H:ta koodaavan immunoglobuliinigeenin 5'-päässä, kuten sillä alueella, joka koodaa johtoaluetta eli ensimmäistä kehysaluetta. Huomattakoon, että sekä V_H:ta

että V_L:ää koodaavien DNA-homologien monistuksessa toisen alukkeen säilynyt 5'-nukleotidisekvenssi voi olla komplementaarinen sekvenssille, joka on ulkopuolelta lisätty käyttäen terminaalista deoksinukleotidyylitransferaasia, kuten ovat kuvanneet Loh ym., Science, 243:217-220 (1989). Joko ensimmäinen tai toinen aluke tai molemmat voivat sisältää nukleotidisekvenssin, joka muodostaa endonukleaasin tunnistuspaikan. Paikka voi olla heterologinen monistettavan immunoglobuliinigeenin suhteen ja se yleensä esiintyy alukkeen 5'-päässä tai sen lähellä.

Mikäli restriktiokohdan muodostava osa on läsnä, se sijaitsee yleensä alukkeen 5'-terminaalisessa ei-aloittavassa osassa. Ensimmäisen alukkeen muodostama restriktiokohta valitaan yleensä sellaiseksi, jonka tunnistaa restriktioentsyymi, joka ei tunnista toisen alukkeen muodostamaa restriktiokohtaa, minkä tarkoituksena on voida tuottaa DNA-molekyyli, jolla on kohesiiviset päät, jotka eivät ole toisilleen komplementaariset ja siten antavat mahdollisuuden suunnattuun insertioon johonkin vektoriin.

Eräässä toteutusmuodossa esillä olevassa keksinnössä käytetään polynukleotidisarjaa, joka muodostaa alukkeita, joissa on aloitusalue, joka sijaitsee alukkeen 3'-päässä. Aloittava alue käsittää yleensä lähinnä 3'-päätä sijaitsevat (3'-terminaaliset) 15-30 nukleotidiemästä. Kunkin alukkeen 3'-terminaalinen aloitusosa pystyy toimimaan alukkeena nukleiinihapposynteesin katalysoimiseksi, so. alukkeen avulla tapahtuvan pidennysreaktion initioimiseksi sen 3'-päästä alkaen. Toinen alukkeista tai molemmat voivat lisäksi sisältää 5'-terminaalisen (lähinnä 5'-päätä olevan) ei-aloittavan osan, so. osan, joka ei osallistu hybridisoitumiseen valikoimatemplaattiin.

PCR:ssä kukin aluke toimii yhdessä toisen alukkeen kanssa kohdenukleiinihapposekvenssin monistamiseksi. PCR:ssä käytettävien PCR-alukeparien valintaa ohjaavat tässä geenivalikoimien tuottamisen yhteydessä käsitellyt seikat. Toisin sanoen alukkeilla on nukleotidisekvenssi, joka on komplementaarinen jollekin valikoimassa säilyneelle sekvenssille. Käyttökelpoisia V_H- ja V_L-aloitussekvenssejä on esitetty tuonnempana olevissa taulukoissa 5 ja 6.

4. Polymeraasiketjureaktio geenivalikoimien tuottamiseksi

Strategia, jota käytetään johonkin valikoimaan sisältyvien V_H- ja V_L-geenien kloonaamiseen riippuu, kuten hyvin tiedetään, valikoiman muodostavien nukleiinihappojen tyypistä, kompleksisuudesta ja puhtaudesta. Muita tekijöitä ovat se, sisälty-

vätkö geenit yhteen tai moneen valikoimaan, ja se, onko ne määrä monistaa ja/tai mutagenoida.

V_H:ta ja V_L:ää koodaavat geenivalikoimat muodostuvat polynukleotidejä koodaavista säikeistä, kuten mRNA:sta ja/tai genomisen DNA:n sense-säikeestä. Jos valikoima on kaksisäikeisen genomisen DNA:n muodossa, se tavallisesti ensiksi denaturoidaan, yleensä sulattamalla, yksittäisiksi säikeiksi. Valikoimalle suoritetaan PCR-reaktio käsittelemällä valikoima (saattamalla se kosketukseen) PCR-alukeparilla, jossa parin kullakin jäsenellä on ennalta valittu nukleotidisekvenssi. PCR-alukepari kykenee aloittamaan alukkeen avulla tapahtuvat pidennysreaktiot hybridisoitumalla nukleotidisekvensseihin, mielellään vähintään noin 10 nukleotidin pituisiin sekvensseihin ja vielä mieluummin vähintään noin 20 nukleotidin pituisiin sekvensseihin, jotka on säilyneet valikoimassa. PCR-alukeparin ensimmäistä aluketta nimitetään tässä toisinaan "sense-alukkeeksi", koska se hybridisoituu nukleiinihapon koodaavaan eli sense-säikeeseen. Lisäksi PCR-alukeparin toista aluketta nimitetään tässä toisinaan "anti-sense-alukkeeksi", koska se hybridisoituu nukleiinihapon ei-koodaavaan eli anti-sense-säikeeseen, so. säikeeseen, joka on komplementaarinen koodaavalle säikeelle.

PCR-reaktio toteutetaan sekoittamalla PCR-alukepari, suositeltavimmin ennalta määrätty määrä sitä, valikoiman nukleiinihappoihin, suositeltavimmin ennalta määrättyyn määrään niitä, jossakin PCR-puskurissa PCR-reaktioväliaineen muodostamiseksi. Seosta pidetään polynukleotidin synteesiolosuhteissa ajan, joka on yleensä ennalta määrätty ja joka on riittävä PCR-reaktiotuotteen muodostumiselle, jolloin saadaan paljon erilaisia V_H-koodaavia ja/tai V_L-koodaavia DNA-homologeja.

Kussakin monistuksessa voidaan käyttää monia ensimmäisiä alukkeita ja/tai monia toisia alukkeita, esimerkiksi yhdestä lajista ensimmäistä aluketta voidaan muodostaa pari joukon erilaisia toisia alukkeita kanssa useiden erilaisten alukeparien muodostamiseksi. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää jotakin yksittäistä ensimmäisen ja toisen alukkeen paria. Joka tapauksessa monistusten, joissa käytetään ensimmäisen ja toisen alukkeen erilaisia kombinaatioita, monistustuotteita voidaan yhdistää geenikirjaston diversiteetin lisäämiseksi.

Erään toisen strategian mukaan tavoitteena on kloonata V_H- ja/tai V_L-koodaavia geenejä jostakin valikoimasta tuottamalla valikoiman polynukleotidikomplementti, kuten esimerkiksi genomisen dsDNA:n anti-sense-säie tai polynukleotidi, joka on tuotettu suorittamalla mRNA:lle käänteistransskriptaasireaktio. Alalla tunnetaan hyvin tällaisten komplementtien tuottamismenetelmiä.

PCR-reaktio toteutetaan käyttämällä mitä tahansa sopivaa menetelmää. Yleensä se tapahtuu jossakin puskuroidussa vesiliuoksessa, so. PCR-puskurissa, mielellään pH:ssa 7-9, mieluiten pH:ssa noin 8. Suositeltavimmin mooliylimäärä (genomista nukleiinihappoa varten, tavallisesti noin 10^6:1 aluke:templaatti) aluketta lisätään sekoittaen puskuriin, joka sisältää templaattisäikeen. Suuri mooliylimäärä on suositeltava menetelmän hyötysuhteen parantamiseksi.

PCR-puskuri sisältää myös deoksiribonukleotiditrifosfaatteja dATP, dCTP, dGTP ja dTTP ja jotakin polymeraasia, yleensä lämmön suhteen stabiilia, kaikkia sopivina määrinä alukkeen avulla tapahtuvaa pidennysreaktiota (polynukleotidisynteesiä) varten. Saatu liuos (PCR-seos) kuumennetaan noin 90-100 °C:seen 1-10 minuutiksi, mieluiten 1-4 minuutiksi. Tämän kuumennusjakson jälkeen liuoksen annetaan jäähtyä 54 °C:seen, joka on suositeltavin alukehybridisaatiolle. Synteesireaktio voi tapahtua lämpötilassa, joka on huoneenlämpötilasta lämpötilaan, jonka yläpuolella polymeraasi (indusoiva aine) ei enää toimi tehokkaasti. Niinpä esimerkiksi jos käynnistävänä aineena käytetään DNA-polymeraasia, lämpötila on yleensä enintään noin 40 °C. Eräs esimerkinomainen PCR-puskuri käsittää seuraavat: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; pH 8,3; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,001 % (paino/tilavuus) gelatiinia; 200 µM dATP; 200 µM dTTP; 200 µM dCTP; 200 µM dGTP; ja 2,5 yksikköä Thermus aquaticus DNA-polymeraasi I:tä (US-patentti nro 4889818) per 100 mikrolitraa puskuria.

Käyntiinpanoaineena voi olla mikä tahansa yhdiste tai ysteemi, joka toimii niin, että alukepidennystuotteiden synteesi tapahtuu, entsyymit mukaanluettuina. Sopivia entsyymejä tähän tarkoitukseen ovat esimerkiksi E. coli DNA-polymeraasi I, E. coli DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentti, T4-DNA-polymeraasi, muut saatavissa olevat DNA-polymeraasit, käänteistransskriptaasi ja muut entsyymit, mukaanluettuina lämmön suhteen stabiilit entsyymit, jotka helpottavat nukleotidien yhdistymistä oikealla tavalla muodostaakseen alukepidennystuotteita, jotka ovat komplementaarisia kullekin alukepidennyssäikeelle. Yleensä synteesi aloitetaan kunkin alukkeen 3'-päästä ja se etenee 5'-suunnassa pitkin templaattisäiettä, kunnes synteesi päättyy, tuottaen eripituisia molekyylejä. Mukana voi kuitenkin olla käynnistysaineita, jotka käynnistävät synteesin 5'-päässä ja etenevät edellä mainittuun suuntaan samaa prosessia käyttäen, kuten edellä kuvattiin.

Indusoivana aineena voi olla myös jokin yhdiste tai systeemi, joka toimii niin, että tapahtuu RNA-alukepidennystuotteiden synteesi, mukaanlukien entsyymit. Suositeltavissa toteutusmuodoissa indusoivana aineena voi olla jokin DNA-riippuvainen RNA-polymeraasi, kuten T7 RNA-polymeraasi, T3 RNA-polymeraasi tai SP6 RNA-

polymeraasi. Nämä polymeraasit tuottavat komplementaarisen RNA-polynukleotidin. RNA-polymeraasin suuri vaihtuvuusnopeus kasvattaa lähtöpolynukleotidia, kuten ovat kuvanneet Chamberlin ym., The Enzymes, toim. P. Boyer, ss. 87-108, Academic Press, New York (1982). Toinen T7 RNA-polymeraasin etu on, että polynukleotidisynteesiin voidaan syöttää mutaatioita korvaamalla osa cDNA:sta yhdellä tai useammalla mutageenisellä oligodeoksinukleotidilla (polynukleotideilla) ja transskriboimalla osittain epäsopiva templaatti suoraan, kuten ovat kuvanneet Joyce ym., Nuc. Acid Res., 17:711-722 (1989). Transskriptioon perustuvia monistussysteemejä ovat kuvanneet Gingeras ym., julkaisussa PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, ss. 245-252, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990).

Jos indusoiva aine on jokin DNA-riippuvainen RNA-polymeraasi ja sen vuoksi sisältää ribonukleotiditrifosfaatteja, riittäviä määriä ATP:tä, CTP:tä, GTP:tä ja UTP:tä sekoitetaan alukepidennysreaktioseokseen ja saatu seos käsitellään kuten edellä kuvattiin.

Vastasyntetisoitu säie ja sen komplementaarinen nukleiinihapposäie muodostavat kaksisäikeisen molekyylin, jota voidaan käyttää menetelmän seuraavissa vaiheissa.

Edellä käsiteltyä ensimmäistä ja/tai toista PCR-reaktiota voidaan käyttää edullisesti sisällyttämään reseptoriin jokin ennalta valittu epitooppi, jota voidaan käyttää detektoimaan ja/tai eristämään immunologisesti jokin reseptori. Tämä toteutetaan käyttämällä ensimmäistä tai toista polynukleotidisynteesialuketta tai ilmentämisvektoria jonkin ennalta määritellyn aminohappotähdesekvenssin sisällyttämiseen reseptorin aminohappotähdesekvenssiin.

Kun on tuotettu V_H- ja V_L-koodaavia DNA-homologeja suurta määrää erilaisia V_H- ja V_L-koodaavia geenejä varten valikoimassa, DNA-molekyylejä monistetaan yleensä edelleen. Koska DNA-molekyylejä voidaan monistaa klassisilla tekniikoilla, kuten sisällyttämällä johonkin itsenäisesti replikoituvaan vektoriin, on suositeltavaa ensiksi monistaa molekyylit alistamalla ne polymeraasiketjureaktiolle (PCR) ennen niiden insertoimista johonkin vektoriin. PCR suoritetaan yleensä lämpöjaksotuksen avulla, so. toistuvasti nostamalla ja laskemalla PCR-reaktioseoksen lämpötilaa lämpötila-alueella, jonka alaraja on noin 10 °C - noin 40 °C ja jonka yläraja on noin 90 °C - noin 100 °C. Nostaminen ja laskeminen voi tapahtua jatkuvana, mutta se on suositeltavimmin vaiheittaista niin, että kussakin lämpöti-

lassa on suhteellisen stabiilin lämpötilan jakso, mikä edistää polynukleotidisynteesiä, denaturointia ja hybridisoitumista.

PCR-monistusmenetelmiä kuvataan yksityskohtaisesti US-patenteissa nro 4683195, 4683202, 4800159 ja 4965188 ja ainakin useissa teksteissä, joihin kuuluvat "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", H. Erlich, toim., Stockton Press, New York (1989) ja "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis ym., toim., Academic Press, San Diego, Kalifornia (1990).

Suositeltavissa toteutusmuodoissa käytetään ainoastaan yhtä ensimmäisen ja toisen alukkeen paria monistusreaktiota kohti. Monista eri monistuksista, joissa kussakin käytetään monia erilaisia alukepareja, saadut monistusreaktiotuotteet yhdistetään sitten.

Tässä keksinnössä tarkastellaan kuitenkin myös DNA-homologien tuottamista komonistuksella (käyttäen kahta alukeparia) ja multippeli-monistuksella (käyttäen enintään noin 8, 9 tai alukeparia).

Suositeltavissa toteutusmuodoissa PCR-menetelmää ei käytetä ainoastaan tuottamaan DNA-molekyylikirjastoa, vaan myös indusoimaan mutaatioita kirjastoon tai luomaan erilaisuutta yhdestä ainoasta emokloonista ja sillä tavoin tuottamaan kirjasto, jonka heterogeenisyys on suurempi. Ensiksikin olisi huomattava, että PCR-prosessi on itse luonteensa mukaisesti mutageeninen monien alalla tunnettujen tekijöiden vuoksi. Toiseksi edellä mainitussa US-patentissa nro 4683195 kuvattujen mutaatiota aiheuttavien variaatioiden lisäksi voidaan käyttää muita mutaation aiheuttavia PCR-variaatioita. Esimerkiksi PCR-reaktioseos voidaan muodostaa käyttämällä eri määriä yhtä tai useampaa pidennystuotteeseen sisällytettävää nukleotidia. Tällaisissa olosuhteissa PCR-reaktio etenee tuottaen nukleotidisubstituutioita pidennystuotteeseen yksittäisen emäksen harvaan esiintymisen vuoksi. Samaten suunnilleen samat moolimäärät nukleotideja voidaan sisällyttää lähtö-PCR-reaktioseokseen määränä, joka tehokkaasti suorittaa X jaksoa, ja sitten kierrättää seos lukumäärässä jaksoja, joka on enemmän kuin X, kuten esimerkiksi 2X.

Vaihtoehtoisesti mutaatioita voidaan aiheuttaa PCR-reaktion aikana sisällyttämällä reaktioseokseen nukleotidijohdoksia, kuten inosiinia, jota ei normaalisti tavata monistettavan valikoiman nukleiinihapoissa. Myöhemmässä in vivo DNA-syn-

teesissä ja nukleiinihappojen replikaatiossa jossakin isäntäsolussa nukleotidijohdos korvautuu jollakin substituuttinukleotidilla aiheuttaen näin mutaatiopisteen.

5. Lineaariset DNA-ilmentämisvektorit

DNA-ilmentämisvektori, joka on tarkoitettu käytettäväksi keksinnön mukaisessa menetelmässä DNA-molekyylikirjaston tuottamiseen, on lineaariseksi tehty DNA-molekyyli, kuten edellä kuvattiin, jossa on kaksi (ylävirran ja alavirran) kohesiivista päätä, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon johonkin polypeptidigeeniin.

Lineaarinen DNA-ilmentämisvektori valmistetaan yleensä tämän keksinnön mukaisen rengasmaisen DNA-ilmentämisvektorin restriktioendonukleaasidigeroinnilla kahden ennalta valitun restriktiokohdan, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon, leikkaamiseksi vektorin nukleotidien sekvenssiin lineaarisen DNA-molekyylin tuottamiseksi, jolla on vaaditut kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon. Suunnattu ligaatio viittaa kahden kohesiivisen pään läsnäoloon vektorilla tai valittuun vektoriin ligatoitavalla insertti-DNA-molekyylillä, niin että päät yhdessä molekyylissä eivät ole keskenään komplementaariset. Vektorin ensimmäinen pää on komplementaarinen insertin ensimmäiselle päälle ja vektorin toinen pää on komplementaarinen insertin toiselle päälle.

6. Ligaatioreaktiot geenikirjastojen tuottamiseksi

Valmistettaessa tämän keksinnön mukaista DNA-geenikirjastoa valmistetaan ligaatioseos kuten edellä kuvattiin ja seos saatetaan ligaatio-olosuhteisiin riittäväksi ajaksi, jotta polypeptidigeenien sekavalikoima ligatoituu (tulee operatiivisesti liitetyksi) moniin DNA-ilmentämisvektoreihin kirjaston muodostamiseksi.

Ligaatio-olosuhteet ovat olosuhteet, jotka on valittu edistämään ligaatioreaktiota, jossa DNA:n vierekkäisten 3'-hydroksyyli- ja 5'-fosforyylipäiden väliin muodostuu fosfodiesterisidos. Ligaatioreaktio katalysoidaan suositeltavimmin entsyymi T4 DNA-ligaasilla. Ligaatio-olosuhteet voivat vaihdella ajan, lämpötilan, puskureiden konsentraation, ligatoitavien DNA-molekyylien ja ligaasin määrien suhteen, kuten hyvin tiedetään. Suositeltavimmissa ligaatio-olosuhteissa ligaatioseos pidetään 4 °C - 12 °C:ssa 1-24 tuntia 1-10 yksikön T4 DNA-ligaasia per millimetri (ml) ja noin 1-2 mikrogrammaa (µg) DNA:ta ollessa läsnä. Ligaatiopuskuri ligaatioseoksessa sisältää yleensä 0,5 M Tris-HCl:a (pH 7,4), 0,01 M $MgCl_2$:a, 0,01 M ditiotrietolia, 1 mM spermidiiniä, 1 mM ATP ja 0,1 mg/ml naudan seerumialbumiinia (BSA). Muitakin ligaatiopuskureita voidaan käyttää.

Esimerkinomaisia ligaatioreaktioita kuvataan esimerkissä 2.

7. Dikistronisten geenikirjastojen valmistus

Eräässä erityisen suositeltavassa toteutusmuodossa esillä oleva keksintö koskee menetelmiä dikistronisten DNA-molekyylien kirjaston valmistamiseksi. Dikistroninen DNA-molekyyli on yksinkertainen DNA-molekyyli, jolla on kyky ilmentää kahta erillistä polypeptidiä kahdesta erillisestä kistronista. Suositeltavissa toteutusmuodoissa kaksi kistronia ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin paikkoihinsa DNA-molekyylin pinnalla, niin että molemmat kistronit ovat yhden promoottorin transskriptionaalisen ohjauksen alaisina. Kumpikin dikistroninen molekyyli kykenee ilmentämään ensimmäistä ja toista polypeptidiä ensimmäisestä ja vastaavasti toisesta kistronista, jotka voivat jossakin sopivassa isännässä muodostaa heterodimeerisen reseptorin filamenttifaagipartikkelin pinnalle.

Menetelmään dikistronisten DNA-molekyylien kirjaston valmistamiseksi kuuluvat seuraavat vaiheet:

(a) muodostetaan ensimmäinen ligaatioseos yhdistämällä ligaatiopuskuriin:

(i) valikoima ensimmäisiä polypeptidigeenejä dsDNA:n muodossa, joissa kussakin on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon, ja

(ii) monia lineaarisessa muodossa olevia DNA-ilmentämisvektoreita, joilla kullakin on ylävirran ja alavirran puoleiset ensimmäiset kohesiiviset päät, jotka (a) soveltuvat suunnatusti vastaanottamaan ensimmäiset polypeptidigeenit yhteisessä lukukehyksessä, ja (b) ovat operatiivisesti liitetyt vastaavasti ylävirran ja alavirran transloituviin DNA-sekvensseihin. Ylävirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa pelB-sekreetiosignaalia, alavirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa filamenttifaagin pintaproteiinin kalvoankkuria ja transloituvat DNA-sekvenssit ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran DNA-ilmentämistä ohjaaviin sekvensseihin;

(b) seos saatetaan ligaatio-olosuhteisiin riittäväksi ajaksi, jotta ensimmäiset polypeptidigeenit liittyvät operatiivisesti vektoreihin ja tuottavat paljon rengasmaisia DNA-molekyylejä, joista kussakin on ensimmäinen kistroni ensimmäisen polypeptidin ilmentämistä varten;

(c) paljon rengasmaisia DNA-molekyylejä käsitellään DNA-pilkkomisolosuhteissa monien lineaarisessa muodossa olevien DNA-ilmentämisvektoreiden tuottamisek-

si, joista kussakin on ylävirran ja alavirran toiset kohesiiviset päät, jotka (i) soveltuvat suunnatusti vastaanottamaan toisten polypeptidigeenien valikoiman yhteisessä lukukehyksessä ja (ii) ovat operatiivisesti liittyneet vastaaviin ylävirran ja alavirran DNA-sekvensseihin. Ylävirran DNA-sekvenssi on transloituva sekvenssi, joka koodaa sekreetiosignaalia, alavirran DNA-sekvenssissä on ainakin yksi stopkodoni lukukehyksessään ja transloituva DNA-sekvenssi on operatiivisesti liitetty DNA-ilmentämistä ohjaavaan sekvenssiin;

(d) muodostetaan toinen ligaatioseos yhdistämällä ligaatiopuskuriin:

(i) paljon vaiheessa (c) muodostettuja DNA-ilmentämisvektoreita ja

(ii) toisten polypeptidigeenien valikoima dsDNA:itten muodossa, joista kussakin on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon moniin DNA-ilmentämisvektorehin; ja

(e) toinen seos saatetaan ligaatio-olosuhteisiin riittäväksi ajaksi, jotta toiset polypeptidigeenit liittyvät operatiivisesti mainittuihin vektoreihin ja tuottavat monia rengasmaisia DNA-molekyylejä, joissa kussakin on toinen kistroni toisen polypeptidin ilmentämistä varten, jolloin muodostuu kirjasto.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa sekreetiosignaali on pelB-sekreetiosignaali. Suositeltavaa on myös käyttää filamenttifaagin kalvoankkuria, joka on johdettu cpIII:sta tai cpVIII:sta, kuten tässä kuvattiin.

Edellä mainitun menetelmän toteuttamiseen käytännössä käyttökelpoisia DNA-ilmentämisvektoreita ovat dikistroniset ilmentämisvektorit, joita kuvattiin edellä yksityiskohtaisemmin.

Toteutettaessa käytännössä dikistronisten DNA-molekyylien kirjaston valmistusmenetelmää on suositeltavaa, että ylävirran ja alavirran ensimmäisillä kohesiivisilla päillä ei ole samaa nukleotidisekvenssiä kuin ylävirran ja alavirran toisilla kohesiivisilla päillä. Tässä suoritusmuodossa käsittelyvaihe (c) rengasmaisten DNA-molekyylien linearisoimiseksi käsittää yleensä restriktioendonukleaasien käytön, jotka ovat spesifisiä tuottamaan mainitut toiset päät, mutta eivät pilko rengasmaista DNA-molekyyliä kohdista, jotka muodostivat ensimmäiset päät. Esimerkinomaisia ja suositeltavia ensimmäisiä ja toisia päitä ovat päät, jotka on muodostettu pilkkomalla pCBAK8 Xhi I:llä ja Spe I:llä ylävirran ja alavirran ensimmäisten päiden muodostamiseksi ja jotka on muodostettu pilkkomalla pCBAK8 Sac I:llä ja Xba I:llä ylävirran ja alavirran toisien päiden muodostamiseksi. Tässä toteutusmuodos-

sa muita kohesiivisten päiden pareja voidaan käyttää vastaavissa ensimmäisen ja toisen pään pareissa, kunhan vain nämä neljä päätä ovat kukin erillisiä, ei-komplementaarisia päitä. Esimerkkejä näistä ovat päät, joita esiintyy tässä kuvatuilla vektoreilla pCOMB3, pCOMB2-3, pCOMB2-3', pCOMB8 ja pCOMB2-8.

Menetelmät monien rengasmaisten DNA-molekyylien käsittelemiseksi DNA:ta pilkkovissa olosuhteissa lineaaristen DNA-molekyylien muodostamiseksi ovat yleisesti tunnettuja ja ne riippuvat pilkottavasta nukleotidisekvenssistä ja pilkkomismekanismista. Suositeltavissa käsittelyissä sekoitetaan DNA-molekyylit restriktioendonukleaasiin, joka on spesifinen jollekin endonukleaasin tunnistuskohdalle halutussa pilkkomispaikassa, riittävässä määrin, jotta restriktioendonukleaasi pilkkoo DNA-molekyylin. Puskurit, pilkkomisolosuhteet ja substraattikonsentraatiot restriktioendonukleaasipilkkomista varten ovat tunnettuja ja ne riippuvat käytettävästä erityisentsyymistä. Esimerkki restriktioentsyymillä pilkkomisen olosuhteista on kuvattu esimerkissä 2.

Eräässä edellistä toteutusmuotoa läheisesti muistuttavassa toteutusmuodossa keksintö tuo käyttöön DNA-molekyylien, joilla on yksi kistroni, kirjaston tuottamismenetelmän, jossa noudatetaan edellä kuvattua menettelyä ja pysähdytään vaiheen (b) toteuttamisen jälkeen. Tällainen kirjasto sisältää DNA-molekyylejä, joista kukin sisältää yhden kistronin tämän keksinnön mukaisen polypeptidin ilmentämiseksi.

8. Menetelmiä kirjaston diversiteetin muuttamiseksi

Esillä oleva keksintö tuo käyttöön menetelmiä tämän keksinnön mukaisen filamenttifaagikirjaston diversiteetin muuttamiseksi. Nämä menetelmät yleensä lisäävät kirjaston diversiteettiä samalla lisäten mahdollisten epitoopin sitovien kompleksien poolia, josta seuloa jonkin toivotun sitomisaktiivisuuden suhteen. Vaihtoehtoisesti menetelmät voidaan suunnata jonkin epitoopin sitovan kompleksien luokan rikastamiseen. Luokan yleensä määrittää kyky sitoa jokin erityinen epitooppi tai epitooppiperhe, joka on läsnä jollakin ennalta valitulla antigeenilla tai antigeeniryhmällä.

a. Kirjaston diversiteetin lisääminen mutaation avulla

Eräs erityisen suositeltava menetelmä diversiteetin lisäämiseksi on muuttaa epitoopin sitovan kompleksin yhden tai useamman polypeptidin aminohappotähdesekvenssiä tämän keksinnön mukaisen faagin genomilla. Muutokset voidaan kätevästi toteuttaa nukleiinihappotasolla mutatoimalla aminohappoa. Menetelmä

voidaan toteuttaa yhdelle nukleiinihappolajille, joka koodaa tämän keksinnön mukaista polypeptidiä, tai se voidaan toteuttaa nukleiinihappokirjastoon, joka on läsnä tämän keksinnön mukaisessa faagikirjastossa.

Nukleiinihapon mutatoiminen voidaan suorittaa erilaisilla tavoilla, mutta kaikkein kätevimmin se toteutetaan PCR-reaktiossa tämän keksinnön mukaisen PCR-prosessin aikana. PCR-mutageneesi voi olla sattumanvarainen tai suunnattu spesifisiin nukleotidisekvensseihin, kuten yleisesti tiedetään. PCR-reaktion toteuttaminen olosuhteissa, jotka suosivat sattumanvaraista mutageneesia, on kuvattu aikaisemmin ja sitä nimitetään "virhealttiiksi PCR:ksi". Samoin suunnatussa mutageneesissa käytetään PCR-alukkeita, jotka ovat suunnitellut kohdistamaan erityistyyppisen mutaation johonkin nukleotidisekvenssin erityisalueeseen.

Eräässä toteutusmuodossa keksintö koskee yhden tai useamman epitoopin sitovan kompleksin diversiteetin lisäämistä jossakin tämän keksinnön mukaisessa epitoopin sitovassa kompleksipolypeptidissä olevan vasta-aineen variaabelin alueen komplementaarisuutta määrittävällä alueella (CDR) PCR-suunnatulla mutaatiolla. CDR-mutageneesia on kuvattu aikaisemmin yleistermein jonkin vasta-aineen "humanisoimiseksi" tuomalla humaani-sekvenssejä jonkin muriinivasta-aineen CDR-alueeseen. Katso europpalainen patenttihakemus nro EP-239400.

Keksintö siis koskee mutageneesimenetelmää jossakin tämän keksinnön mukaisessa DNA-vektorissa läsnä olevan kloonatun immunoglobuliinigeenin immunologisen spesifisyyden muuttamiseksi. Menetelmällä saadaan aikaan suunnattu mutageneesi jonkin immunoglobuliinigeenin ennaltavalitussa CDR:ssa ja menetelmässä saatetaan yhdistelmä-DNA-molekyyli (rDNA), joka sisältää kloonatun immunoglobuliinigeenin, jossa kohde-DCR on, sopiviin PCR-olosuheisiin CDR:n ennaltavalitun alueen monistamiseksi. Menetelmässä rDNA saatetaan PCR-olosuhteisiin, joihin sisältyy allakuvatunkaltainen PCR-alukeoligonukleotidi, joka muodostaa ensimmäisen alukkeen PCR-alukeparissa, kuten hyvin tiedetään, monistetun PCR-tuotteen valmistamiseksi, joka on johdettu ennalta valitusta CDR-alueesta, mutta joka sisältää PCR-alukkeen nukleotidisekvenssin. Toinen oligonukleotidi PCR-monistusolosuhteissa voi olla mikä tahansa PCR-aluke, joka on johdettu mutagenoitavasta immunoglobuliinigeenistä, kuten tässä kuvataan.

Suositeltavia ovat menetelmät, joissa käytetään jotakin tämän keksinnön mukaista oligonukleotidia, kuten alla kuvataan.

Eräässä läheisesti tätä muistuttavassa toteutusmuodossa kysymykseen tulee siten oligonukleotidi, jota voidaan käyttää alukkeena polymeraasiketjureaktiossa (PCR), joka indusoi mutageneesin jonkin immunoglobuliinigeenin komplementaarisuutta määrittävään alueeseen (CDR). Oligonukleotidillä on 3'- ja 5'-päät ja (1) sen 3'-päässä on nukleotidisekvenssi, joka kykenee hybridisoitumaan jonkin immunoglobuliinigeenin ensimmäiseen kehysalueeseen, (2) sen 5'-päässä on nukleotidisekvenssi, joka kykenee hybridisoitumaan jonkin immunoglobuliinigeenin toiseen kehysalueeseen, ja (3) 3'- ja 5'-päiden välissä on nukleotidisekvenssi, joka soveltuu tuomaan mutaatioita PCR:n aikana CDR-alueeseen immunoglobuliinigeenin ensimmäisen ja toisen kehysalueen väliin mutagenoimalla sillä tavoin CDR-alueen.

Mikäli immunoglobuliinigeeneissä on kolme CDR-aluetta sekä immunoglobuliinin raskaassa ketjussa että kevyessä ketjussa, joita kutakin erottaa erillinen kehysalue, on selvää, että edellä esitelty esimerkki on helposti sovellettavissa mutaatioiden tuomiseen johonkin spesifiseen CDR:ään valikoimalla edellä mainitut 5'- ja 3'-nukleotidisekvenssit niin, että ne hybridisoituvat kohde-CDR:n vieressä oleviin kehysalueisiin. Siten edellä mainitut ensimmäinen ja toinen kehyssekvenssi voivat olla säilyneitä sekvenssejä, jotka ovat CDR1:n, CDR2:n tai CDR3:n vieressä joko raskaassa tai kevyessä ketjussa. Esimerkki ja suositeltava on ihmisen immunoglobuliinin raskaan ketjun CDR3.

Kysymyksessä olevan mutagenoivan oligonukleotidin 3'- ja 5'-terminaalisten nukleotidisekvenssien pituus voi vaihdella, kuten hyvin tiedetään, kunhan vain pituus takaa nukleotidialueen, joka on komplementaarinen kohteena oleville kehyssekvensseille hybridisoituakseen niihin. Kun kysymyksessä on terminaalinen nukleotidisekvenssi, sen tulee olla riittävän pitkä ja komplementaarinen kohdekehysalueelle, joka sijaitsee mutagenisoitavan CDR-alueen 3'-päässä, hybridisoituakseen ja tuottaakseen 3'-hydroksyylipään alukkeen avulla tapahtuvan pidennysreaktion initioimiseksi. Kun kysymyksessä on 5'-terminaalinen nukleotidisekvenssi, sen tulee olla riittävän pitkä ja komplementaarinen kohdekehysalueelle, joka sijaitsee mutagenisoitavan CDR-alueen 5'-päässä toimiakseen hybridisoitumisvälineenä päällekkäin menevässä PCR-pidennysreaktiossa, kuten edellä kuvataan, koko immunoglobuliinin raskaan tai kevyen ketjun kokoamiseksi.

CDR:n vieressä olevia kehysalueita on karakterisoitu immunologian alalla ja ne sisältävät tunnettuja nukleotidisekvenssejä tai konsensussekvenssejä, kuten toisaalla tässä selityksessä kuvataan. Kun on määrä mutagenisoida jokin yksittäinen ennalta valittu immunoglobuliinigeeni, jonkin tietyn CDR:n vieressä olevat

kehyksen määrittämät sekvenssit tunnetaan tai ne voidaan helposti määrittää nukleotidisekvenssimenetelmien avulla. Kun mutagenisoitavana on immunoglobuliinigeenien valikoima, kehyksestä johdetut sekvenssit ovat mieluiten säilyneitä, kuten toisaalla tässä selityksessä kuvataan.

3'- ja 5'-terminaaliset nukleotidisekvenssit ovat suositeltavimmin vähintään 6 nukleotidin pituisia ja ne voivat olla jopa 50 tai useammankin nukleotidin pituisia, vaikkakin tällaiset pituudet ovat tarpeettomia tarkan ja toistettavan hybridisoitumisen turvaamiseksi. Suositeltavia pituuksia ovat 12-30 nukleotidia ja yleensä ne ovat noin 18 nukleotidia.

Eräs erityisen suositeltava kehyksen määrittämä nukleotidisekvenssi käytettäväksi 3'-pään nukleotidisekvenssinä on nukleotidisekvenssi 5'-TGGGGCCAAGGGACCACG-3' (SEQ ID NO 122).

Eräs erityisen suositeltava kehyksen määrittämä nukleotidisekvenssi käytettäväksi 5'-pään nukleotidisekvenssinä on nukleotidisekvenssi 5'-GTGTATTATTGTGCGAGA-3' (SEQ ID NO 123).

Nukleotidisekvenssi, joka sijaitsee 3'- ja 5'-päiden välissä ja soveltuu CDR:n mutagenisointiin, voi olla mikä tahansa nukleotidisekvenssi, mikäli uusi sekvenssi tuodaan mukaan edellä mainituilla menetelmillä. Esillä oleva lähestymistapa antaa kuitenkin käyttöön keinon tuottaa suuri populaatio mutanegisoituja CDR:iä yhdessä PCR-reaktiossa, kun käytetään ylimääräisten sekvenssien, jotka määrittävät satunnaisia tai lähes satunnaisia nukleotideja mutagenisoitavassa CDR-alueessa, populaatiota.

Eräs suositeltava oligonukleotidi käsittää edellä kuvattujen 3'- ja 5'-päiden välissä nukleotidisekvenssin, jota edustaa kaava $[NNR]_n$, jossa N voi olla muista riippumatta mikä tahansa nukleotidi, R voi olla S, K tai jokin niiden analogi, joissa S on G tai C, K on G tai T, ja jossa n on 3 - noin 24. Suositeltavissa toteutusmuodoissa oligonukleotidillä on kaava:

5'-GTGTATTATTGTGCGAGA$[NNR]_n$TGGGGCCAAGGGACCACG-3' (SEQ ID NO 124).

Eräs esimerkki ja erityisen suositeltava on oligonukleotidi, jossa R on S ja n on 16, jolloin oligonukleotidi edustaa laajaa populaatiota ylimääräisiä oligonukleotidisekvenssejä.

Keksintö siis koskee menetelmää filamenttifaagipartikkeleiden kirjaston diversiteetin lisäämiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa: a) tuotetaan käyttöön esillä olevan keksinnön mukainen filamenttifaagipartikkelikirjasto ja b) mutatoidaan immunoglobuliinin variaabelia aluetta koodaava nukleotidisekvenssi, joka on läsnä kirjastossa olevassa kussakin DNA-ilmentämisvektorissa, sellaisten faagipartikkeleiden, joista kukin sisältää jonkin mutatoidun immunoglobuliinin variaabelin alueen nukleotidisekvenssin, kirjaston muodostamiseksi.

Käyttöön tuottamiseen voi sisältyä kirjastossa olevien faagipartikkelien genomien mainipulointi nukleiinihappojen eristämiseksi mutagenisoivan PCR-reaktion valmistelemiseksi. Faagikirjaston manipulaatioita faagigenomin eristämiseksi PCR-reaktiossa käyttöä varten kuvataan toisaalla tässä selityksessä.

Eräässä toteutusmuodossa mutatointi käsittää immunoglobuliinin variaabelia aluetta koodaavan nukleotidisekvenssin saattamisen virhealttiiseen polymeraasiketjureaktioon. Eräässä toisessa toteutusmuodossa mutatointi käsittää immunoglobuliinin variaabelia aluetta koodaavan nukleotidisekvenssin saattamisen alttiiksi menetelmälle immunoglobuliinin variaabelia aluetta koodaavan nukleotidisekvenssin CDR:n mutatoimiseksi käyttäen jotakin CDR-suunnattua oligonukleotidia, kuten tässä kuvataan.

Esimerkkejä menetelmistä jonkin erityisen epitoopin sitovaa kompleksia koodaavan nukleiinihapon CDR-alueen mutatoimiseksi käyttämällä edellä mainittua CDR-suuntaavaa oligonukleotidia tai käyttämällä virhealtista PCR-reaktiota erilaisten kompleksien laajan kirjaston tuottamiseksi kuvataan esimerkeissä.

b. Kirjaston rikastaminen

Keksinnössä kuvataan menetelmää kirjaston diversiteetin muuttamiseksi rikastamalla kirjastoa jotakin ennalta valittua epitoopin sitovien kompleksien luokkaa varten. Tavallisesti menetelmässä valitaan affiniteetin mukaan ne kirjastossa olevat faagipartikkelit, jotka kykenevät sitomaan jonkin ennalta valitun antigeenin. Valintaa affiniteetin mukaan eli huuhtomista kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkeissä.

Keksintö siis koskee filamenttifaagipartikkelikirjaston diversiteetin muuttamismenetelmää, joka käsittää vaiheet, joissa a) saatetaan käyttöön esillä olevan keksinnön mukainen filamenttifaagipartikkelikirjasto, b) saatetaan tämä kirjasto kosketukseen jonkin ennalta valitun ligandin kanssa olosuhteissa, jotka riittävät siihen, että kirjaston jäsenet sitoutuvat ligandiin ja muodostavat ligandi-faagipartikkelikomplek-

sin, ja c) eristetään kompleksissa olevat faagipartikkelit pois ei-sitoutuneista kirjaston jäsenistä ligandilla rikastetun kirjaston, joka sisältää faagipartikkeleja, joilla on sitoutumisspesifisyys ennalta valittuun ligandiin nähden, muodostamiseksi.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa ennalta valittu ligandi kiinnitetään johonkin kiinteään matriksiin ja ligandi-faagipartikkelikompleksi muodostetaan kiinteässä faasissa. Tämä toteutusmuoto käsittää lisäksi vaiheet, joissa i) kiinteä alusta pestään kosketusvaiheen jälkeen sitoutumattomien kirjaston jäsenten huuhtomiseksi kiinteästä alustasta, ja ii) eluoidaan mahdolliset kiinteään faasiin sitoutuneet faagipartikkelit irti kiinteästä alustasta. Eluoidut faagipartikkelit otetaan talteen, jolloin muodostuu eristettyjä faagipartikkeleita, jotka käsittävät rikastetun kirjaston.

Eluointi voidaan suorittaa erilaisissa olosuhteissa, jotka keskeyttävät ligandi-epitoopin sitovan kompleksin interaktion. Tyypillisiin olosuhteisiin kuuluvat runsassuolaiset tai alhaisen pH:n omaavat puskurit. Erityisen suositeltavia ovat puskurit, joiden pH on 1-5, mieluiten noin 2-3. Vaihtoehtoisesti interaktio voidaan keskeyttää luomalla kilpailutilanne ennalta valitun ligandin ylimäärällä eluointipuskurissa. Molempia eluointimenetelmiä kuvataan esimerkeissä.

Eräässä läheisesti edellistä muistuttavassa toteutusmuodossa yhdistetään sekä kirjaston diversiteetin lisääminen mutaation avulla että kirjaston rikastaminen seulomalla "kypsän" epitoopin sitovan kompleksin affiniteetit johonkin ennalta valittuun ligandiin. Näin on mahdollista kehittää uusia sitomisspesifisyyksiä ja voimakkaampia sitoutumisspesifisyyksiä käyttämällä esillä olevia menetelmiä kirjaston diversiteetin muuttamiseen.

Näiden menetelmien yhdistelmä voidaan rakentaa eri tavoin, mikä on selvää alaan perehtyneelle. Esimerkiksi voidaan eristää kirjasto, mutagenisoida (diversifioida) se ja sitten seuloa (rikastaa) jonkin erityisen sitomisaktiivisuuden suhteen. Vaihtoehtoisesti voidaan rikastaa jonkin erityisaktiivisuuden suhteen kirjastosta spesifinen epitoopin sitova kompleksi, mutagenisoida se ja edelleen rikastaa mutageneesin avulla tuotettu kirjasto.

Eräässä toisessa tämän teeman muunnoksessa voidaan käyttää hyödyksi kirjastojen välisiä eroavuuksia, jotka perustuvat cpIII- ja cpVIII-johdettuihin kalvoankkureihin johtuen niille ominaisista valenssieroista. Koska faagikirjasto, jossa on cpIII:sta johdettu kalvoankkuri, sisältää yleensä vain 1-4 epitoopin sitovan kompleksin kopiota kunkin faagipartikkelin pinnalla, faagi edustaa sitomiskompleksia, jonka valenssi on suhteellisen "alhainen", lähellä 1:tä. Sitä vastoin faagikirjasto,

jossa on cpVIII:sta johdettu kalvoankkuri, sisältää yleensä 20-1 000 epitoopin sitovan kompleksin kopiota kunkin faagipartikkelin pinnalla, partikkeli edustaa suhteellisen "korkeata" valenssia. Siten cpIII-perustaisia kirjastoja nimitetään yksivalenssisiksi ja cpVIII-perustaisia kirjastoja monivalenssisiksi.

Hyvin tunnettujen vasta-aine-affiniteetin ja -valenssin periaatteiden mukaan on selvää, että cpIII-perustainen kirjasto voidaan rikastaa suorittamalla seulonta yleensä suuremman affiniteetin sitomisinteraktioiden suhteen (sitoutumisvakiot 10^6-10^9 M^{-1}) verrattuna leveämpään affiniteettialueeseen (sitoutumisvakiot 10^4-10^9 M^{-1}), joka voidaan eristää käyttämällä jotakin cpVIII-perustaisessa kirjastossa olevaa monivalensista reagenssia. Sen vuoksi cpVIII-perustaista kirjastoa voidaan käyttää epitoopin sitovien kompleksien laajan affiniteettialueen eristämiseen alhaisesta korkeaan, kun taas cpIII-perustaista kirjastoa voidaan käyttää korkeamman affiniteetin omaavien epitoopin sitovien kompleksien kapeamman alueen eristämiseen.

Keksintö siis koskee ensimmäisen rikastetun kirjaston tuottamista rikastamalla jotakin cpVIII-perustaista kirjastoa. Sen jälkeen epitoopin sitovan kompleksin polypeptidejä koodaavat geenit siirretään johonkin cpIII-perustaiseen vektoriin ja sen jälkeen rikastetaan suuremman affiniteetin ja sitoutumisen interaktion suhteen. Eräässä toteutusmuodossa voidaan käyttää mutaatiovaihetta ennen geenien siirtämistä cpIII-perustaiseen vektoriin.

Eräässä toisessa toteutusmuodossa kyky kypsyttää uusi affiniteetti osoitetaan eräällä tässä selityksessä olevalla esimerkillä, jossa kloonattu V_H/V_L heterodimeeriä koodaava geeni, joka kykenee ilmentämään heterodimeerin, joka sitoo tetanustoksoidi(TT)-ligandin, mutagenisoidaan käyttäen CDR-suunnattua PCR-mutageneesia ja tästä syntyvä mutagenisoitu nukleiinihappopopulaatio insertoidaan cpIII-perustaiseen kirjastoon ja seulotaan johonkin eri ligandiin, fluoreseiiniin, sitoutumisen suhteen. Tällä tavoin identifioitiin suuren affiniteetin omaava epitoopin sitova kompleksi, joka sitoo fluoreseiinia.

Eräässä edellistä läheisesti muistuttavassa toteutusmuodossa natiivi (immunisoimaton) kirjasto kloonattiin cpVIII-perustaiseen kirjastoon ja seulottiin progesteroniantigeenin suhteen. Alhaisen affiniteetin omaavia sitojia kloonattiin cpIII-perustaiseen kirjastoon ja identifioitiin kolme suuren affiniteetin omaavaa sitovaa kloonia, jotka sitovat progesteronia. Kolme kloonia koottiin pooliksi ja poolille suoritettiin virhealtis PCR-mutageneesi ja saatu mutagenoitu nukleiinihappokirjasto kloonattiin cpIII-perustaiseen vektoriin ja seulottiin progesteronia vastaan, jolloin saa-

tiin suuren affiniteetin omaava epitoopin sitova kompleksi, joka sitoo progesteronia. Tällä tavalla korkean affiniteetin omaava kompleksi "kypsytettiin" natiivikirjastosta.

Esillä oleva keksintö koskee siis menetelmää tämän keksinnön mukaisen filamenttifaagin koodaaman epitoopin sitovan kompleksin affiniteetin kypsyttämiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheet, joissa a) saatetaan käyttöön filamenttifaagin genomi, b) mutatoidaan tässä genomissa oleva immunoglobuliinin variaabelia aluetta koodaava nukleotidisekvenssi faagipartikkelikirjaston, joka sisältää mutatoidun immunoglobuliinin variaabelin alueen nukleotidisekvenssin, muodostamiseksi, c) saatetaan vaiheessa b) muodostettu kirjasto kosketukseen jonkin ennalta valitun ligandin kanssa olosuhteissa, jotka riittävät kirjaston jäsenien stoutumiseen ligandiin ja ligandi-faagipartikkelikompleksin muodostumiseen, ja d) eristetään mainitussa kompleksissa olevat faagipartikkelit sitoutumattomista kirjaston jäsenistä ligandilla rikastetun kirjaston, joka käsittää faagipartikkeleita, joilla on sitoutumisspesifisyys ennalta valittuun ligandiin nähden, muodostamiseksi.

F. Faagikirjastot

Esillä oleva keksintö koskee DNA-molekyylien, joista kukin molekyyli koodaa jotakin tämän keksinnön mukaista fuusiopolypeptidiä, kirjastoa, joka kirjasto on erilaisten filamenttifaagipartikkeleiden, joista kukin sisältää jonkin tämän keksinnön mukaisen erilaisen rDNA-molekyylin, populaation muodossa. Erilaisella rDNA-molekyylillä tarkoitetaan rDNA-molekyyliä, joka eroaa nukleotidiemässekvenssin, joka koodaa tämän keksinnön mukaista polypeptidiä, osalta verrattuna jonkin toisen kirjastossa olevan rDNA-molekyylin nukleotidisekvenssiin.

Faagikirjasto on siis filamenttifaagin, suositeltavimmin f1-, fd- tai M13-filamenttifaagin populaatio, jossa kunkin faagipartikkelin sisään on pakattuna jokin tämän keksinnön mukainen rDNA-ilmentämisvektori, rDNA:n ollessa faagipartikkelissa kapseloituina faagin matriksiproteiineihin. Toisin sanottuna faagikirjasto sisältää paljon filamenttifaagipartikkeleita, joista kukin eri faagipartikkeli sisältää vähintään yhden epitoopin sitovan kompleksin pinnallaan, kuten tässä on kuvattu. Eräs suositeltava kirjasto muodostuu faagipartikkeleista, jotka sisältävät DNA-molekyylejä, jotka koodaavat vähintään 10^6, mieluummn 10^7 ja mieluiten 10^{8-9} erilaista tämän keksinnön mukaista fuusiopolypeptidiä. Erilaisilla fuusiopolypeptideillä tarkoitetaan fuusiopolypeptidejä, jotka eroavat toisistaan aminohappotähdesekvenssin osalta. Vielä monimuotoisempia kirjastoja voidaan saada, kun käytetään

satunnaiskombinaatio- tai mutageneesimenetelmiä, joita tässä kuvataan, kirjaston diversiteetin lisäämiseksi.

Silloin kun pakattu ilmentämisvektori koodaa jonkin autogeenisesti kokoontuvan reseptorin ensimmäistä ja toista polypeptidiä, esim. V_H- ja V_L-polypeptidejä, jotka muodostavat Fab-palasen, kirjaston voidaan myös karakterisoida sisältävän tai ilmentävän monia reseptorispesifisyyksiä. Siten kirjastot ilmentävät vähintään 10^5, mieluummin vähintään 10^6 ja mieluiten vähintään 10^7 erilaista reseptoria, kuten erilaisia vasta-aineita, T-solureseptoreja, integriinejä ja vastaavia.

Kirjaston koko voi vaihdella riippuen useista tekijöistä, erityisesti menetelmästä, jolla kirjasto tuotetaan. Tässä käytettynä koko tarkoittaa kirjaston monimuotoisuutta tai diversiteettiä, toisin sanoen pikemminkin kirjaston muodostavien eri lajien lukumäärää kuin kirjastossa olevien partikkelien absoluuttista lukumäärää.

Niinpä kun kirjasto tuotetaan ensiksi erikseen kloonaamalla kaksi geenivalikoimaa, jotka vastaavat ensimmäistä ja toista polypeptidiä, tuloksena olevan kirjaston koko näiden kahden valikoiman sattumanvaraisen dikistronisen vektorin muotoon yhdistämisen jälkeen kasvaa kovasti. Tarkastellaan esimerkiksi kevyen ketjun ja raskaan ketjun variaabelin vasta-ainegeenin valikoimia, joissa kussakin on 10^6 erilaista jäsentä. Kahden valikoiman yhdistäminen tuottaa teoreettisesti kirjaston, jossa on 10^{12} mahdollista erilaista dikistronista vektorilajia.

Eräs kokeellinen systeemi rakennettiin edellä kuvatun kahden valikoiman kyvyn "sekoittua" arvioimiseksi, tarkoituksena kehittää suurempi diversiteetti. Systeemissä käytettiin kombinatorista Fab-kirjastoa, joka oli johdettu hiirestä, joka oli immunisoitu hapteeniparanitrofenyylifosfonamidaatilla (NPN). 22 erilaista kloonia eristettiin ja raskasta ja kevyttä ketjua koodaavat nukleiinihapot eristettiin ja sekvenoitiin sen määrittämiseksi, että 21 22:sta parista oli erilaisia nukleiinihapposekvenssin tasolla. 22 NPN-ligandin sitovaa kloonia sekoitettiin (vatkattiin) sattumanvaraisesti ja seulottiin uudelleen NPN:n sitomisen suhteen.

Jos oletetaan että raskaat ja kevyet ketjut voivat muodostaa vain ligandin sitovia heterodimeerisiä reseptorimolekyylejä, mikäli alkuperäiset parit yhdistetään, malli antaa odottaa, että 4,6 prosenttia kokonaiskombinaatioista tuottaisi ligandin sitovia kombinaatioita. Mikä tahansa suurempi prosenttiosuus osoittaa, että muutkin parikit kuin alkuperäiset parit pystyvät sitomaan NPN:ää. Tulokset osoittivat, että 27 prosenttia eristetyistä klooneista sitoi NPN:ää, mikä osoitti 5,8-kertaista kasvua kirjaston koossa NPN:ää sitomaan kykenevien reseptoreiden osalta sekoittamisen

jälkeen. Tämä osoitettu nousu rajoittuu klooneihin, jotka sitovat NPN:ää. Muilla sattumanvaraisesti sekoitetun kirjaston jäsenillä on kyky sitoa erilaisia, muita kuin NPN ligandeja. Sekoittamisen osoitettiin siis lisäävän diversiteettiä.

Kirjaston monimutkaisuutta voidaan myös lisätä käyttämällä tässä kuvattuja menetelmiä nukleotidisekvenssien mutatoimiseen jossakin ennalta olemassa olevassa sekvenssikirjastossa. Ilmennetyn fuusiopolypeptidin aminohappotähde-eroina määriteltynä kirjaston kokoa voidaan potentiaalisesti lisätä kaksikymmenkertaisesti kunkin aminohappotähdeaseman osalta, joka on sattumanvaraisen mutaation kohteena.

Esimerkiksi käyttämällä vasta-ainegeenien komplementaarisuutta määrittävään alueeseen (CDR)-suunnattua mutageneesiä, kuten esimerkeissä kuvataan, sattumanvarainen mutaatio kohdennettiin 16 aminohappotähteen muodostamaan lineaariseen alueeseen. Lähtemällä yhdestä lajista ja mutatoimalla kaikki 16 tähdeasemaa kaikilla mahdollisilla yhdistelmillä valitsemalla 20 erilaista aminohappoa saataisiin teoreettisesti 20^{16} eri lajin kirjasto eli 6×10^{20} lajia.

Kuten tässä on kuvattu, eräs erityisetu tämän keksinnön mukaisessa filamenttifaagissa on, että faagipartikkelissa läsnä oleva DNA-molekyyli, joka koodaa heterodimeerisen reseptorin yhtä tai molempia jäseniä, voidaan eristää muista kirjastossa olevista DNA-molekyyleistä sen perusteella, onko faagipartikkelin pinnalla kysymyksessä olevaa ilmennettyä fuusiopolypeptidiä.

Heterodimeerisen reseptorin toista tai molempia jäseniä koodaavan DNA-molekyylin eristäminen (segregaatio) suoritetaan eristämällä filamenttifaagi, joka sisältää kysymyksessä olevan geenin tai geenit, kirjaston muodostavien muiden faagipartikkelien populaatiosta. Faagipartikkelien segregaatio merkitsee yksittäisten faagipartikkelien fyysistä erottamista ja siirtämistä pois muista kirjastossa olevista partikkeleista. Menetelmät filamenttifaagipartikkelien fyysiseksi erottamiseksi yksittäisten partikkelien muodostamista varten ja yksittäisten partikkelien lisääminen tuloksena olevien faagipopulaatioiden, jotka on johdettu yksittäisistä eristetyistä partikkeleista, muodostamiseksi ovat tunnettuja filamenttifaagien alalla.

Eräässä suositeltavassa erotusmenetelmässä identifioidaan faagipartikkelin pinnalla ilmentynyt heterodimeeri faagipartikkelin ja jonkin ennalta valitun ligandin välisen ligandinsitomisspesifisyyden avulla. Esimerkki menettelytavoista ja suositeltava on "seulonta"-menetelmien käyttö, jolloin faagipartikkeliliite saatetaan kosketukseen kiinteäfaasiligandin (antigeenin) kanssa ja sen sallitaan spesifisesti

sitoutua (tai reagoida immunologisesti, kun heterodimeeri sisältää immunoglobuliinin variaabelin alueen). Sitoutumisen jälkeen sitoutumattomat partikkelit pestään pois kiinteästä faasista ja sitoutuneet faagipartikkelit ovat niitä, jotka sisältävät ligandispesifisen heterodimeerisen reseptorin (heterodimeerin) pinnallaan. Sitoutuneet partikkelit voidaan sitten ottaa talteen eluoimalla sitoutunut partikkeli kiinteästä faasista, yleensä käyttämällä vesipitoisia liuotteita, jotka häiritsevät ligandin ja reseptorin välistä vuorovaikutusta. Tyypillisiä liuotteita ovat puskurit, joilla on suuri ionivoima, alhainen pH tai sellainen määrä liukoista kilpailevaa ligandia, joka on riittävä keskeyttämään reseptorin ja ligandin välisen vuorovaikutuksen.

Eräs vaihtoehtoinen menetelmä, joka perustuu pinnalla ekspressoidun heterodimeerin ligandispesifisyyteen, faagipartikkelin erottamiseksi partikkelipopulaatiosta on faagipartikkelien saostaminen liuosfaasista ristiinsitomalla ligandin kanssa. Erästä esimerkinomaista ja suositeltavaa ristiinsitomis- ja saostusmenetelmää kuvataan yksityiskohtaisesti esimerkissä 4c.

Käyttämällä edellä mainittuja partikkelin erotusmenetelmiä saadaan keino tämän keksinnön mukaisessa faagikirjastossa läsnä olevan filamenttifaagipartikkelipopulaation seulomiseksi. Faagikirjastoon sovellettuna seulomista voidaan käyttää kirjaston rikastamiseen yhden tai useamman partikkelin osalta, joka ilmentää jonkin heterodimeerin, jolla on ennalta valittu ligandinsitomisspesifisyys. Kun kirjasto rakennetaan sisältämään monia heterodimeerilajeja, joilla kaikilla on jonkinlainen detektoitava määrä ligandinsitomisaktiivisuutta, mutta jotka eroavat toisistaan proteiinirakenteen, antigeenispesifisyyden, ligandinsitomisaffiniteetin tai -aviditeetin ja vastaavien ominaisuuksien suhteen, seulontamenetelmiä voidaan käyttää sekventiaalisesti ensiksi jonkin ennalta valitun sitomisspesifisyyden kannalta rikastetun kirjaston tuottamiseen ja sitten toisen kirjaston, joka on rikastettu edelleen seulomalla ja joka sisältää yhden tai useampia eristettyjä faagipartikkeleita, tuottamiseen. Menetelmät ligandinsitomisaktiivisuuksien, antigeenispesifisyyksien ja vastaavien vuorovaikutusten mittaamiseksi jonkin ligandin ja reseptorin välillä ovat yleisesti hyvin tunnettuja eikä niitä käsitellä tässä enempää, koska ne eivät ole tämän keksinnön olennaisia tunnusmerkkejä.

Niinpä eräässä toteutusmuodossa faagikirjasto on partikkelipopulaatio, joka on rikastettu jonkin ennalta valitun ligandinsitomisspesifisyyden suhteen.

Eräässä toisessa toteutusmuodossa faagikirjasto käsittää partikkelipopulaation, jossa kukin partikkeli sisältää vähintään yhden tämän keksinnön mukaisen fuusiopolypeptidin faagipartikkelin pinnalla. Faagipartikkelin pinnalla olevan fuusiopo-

lypeptidin todellinen määrä riippuu, osaksi, fuusiopolypeptidissä olevan kuoriproteiinin kalvoankkurin valinnasta.

Kun ankkuri on johdettu cpIII:sta, faagipartikkelia kohti on yleensä 1-4 fuusiopolypeptidiä. Kun ankkuri on johdettu suositeltavammasta cpVIII:sta, partikkelin pinnalla voi olla satoja fuusiopolypeptidejä riippuen kasvuolosuhteista ja muista tässä käsitellyistä tekijöistä. Faagipartikkelin pinnalla olevien fuusiopolypeptidien todellista määrää voidaan säädellä säätelemällä faagipartikkelin "sieppaamaa" määrää, kun sitä ollaan syntetisoimassa jossakin isäntäsolussa.

Tavallisesti tämän keksinnön mukaisessa kirjastossa oleva faagipartikkeli sisältää noin 10 - noin 500 cpVIII-johdettua fuusiopolypeptidiä kunkin partikkelin pinnalla ja vielä suositeltavammin noin 20 - 50 fuusiopolypeptidiä per partikkeli. Esimerkkejä pintafuusiopolypeptidien määrästä esitetään elektronimikrografeissa, joita kuvataan esimerkissä 4a, joka kuvaa partikkeleita, joissa on noin 20-24 cpVIII-johdettua fuusiopolypeptidiä per partikkeli.

Eräässä toisessa toteutusmuodossa esillä oleva keksintö koskee yhdestä partikkelista johdettujen faagipartikkeleiden populaatiota ja sen vuoksi kaikki ilmentävät samaa heterodimeeriä partikkelin pinnalla. Sellainen faagipopulaatio on homogeeninen ja kloonaamalla johdettu ja sen vuoksi se tuo käyttöön lähteen jonkin erityisen fuusiopolypeptidin suurien määrien ilmentämiseksi. Erästä esimerkkiä kloonaamalla johdetusta homogeenisesta faagipopulaatiosta kuvataan esimerkissä 4.

Tämän keksinnön mukaisessa kirjastossa oleva filamenttifaagipartikkeli tuotetaan standardin mukaisilla filamenttifaagipartikkelin valmistusmenetelmillä, ja riippuu filamenttifaagin replikaatiolähteen läsnäolosta tämän keksinnön mukaisessa DNA-ilmentämisvektorissa, kuten tässä on kuvattu, syntyykö signaaleja, jotka tarvitaan (1) yksisäikeisen filamenttifaagin replikoituvan muodon tuottamiseen ja (2) replikoituvan muodon pakkaamiseen filamenttifaagipartikkeliin. Sellainen DNA-molekyyli voidaan pakata, kun se on läsnä jossakin bakteeri-isäntäsolussa, kun geneettinen komplementti on tuotu siihen infektiöösien faagipartikkelien tuottamiseen vaadittujen filamenttifaagipartikkelien aikaansaamiseksi. Eräs tyypillinen ja suositeltava geneettinen komplementtimenetelmä on infektoida jokin bakteeri-isäntäsolu, joka sisältää tämän keksinnön mukaisen DNA-ilmentämisvektorin, jollakin auttaja-filamenttifaagilla, jolloin saadaan geneettiset elementit, jotka tarvitaan faagipartikkelin kokoontumiseen. Esimerkkejä auttajia käyttävistä menetel-

mistä kuvataan tässä esimerkissä 2 ja niitä kuvaavat Short ym., Nuc. Acids Res., 16:7583-7600 (1988).

Heterodimeerireseptorin, joka siepataan filamenttifaagipartikkelin pinnalle faagipartikkelin ekstruusiotapahtuman aikana isäntä-solusta, tasoa voidaan säädellä eri tavoin. Eräässä toteutusmuodossa fuusiopolypeptidien tasoja säädellään käyttämällä voimakkaita promoottoreja ensimmäisessä ja toisessa kistronissa polypeptidien ilmentämiseksi, niin että fuusiopolypeptidikistronien transskriptio tapahtuu suhteellisesti suuremmalla nopeudella kuin cpVIII-geenin transskriptio auttaja-faagin pinnalla. Eräässä toisessa toteutusmuodossa auttaja-faagissa voi olla "amber"-mutaatio geenissä cpVIII:n ilmentämiseksi, niin että isäntäsolussa transskriboituu vähemmän villin tyyppinen cpVIII kuin fuusiopolypeptidit, mikä johtaa siihen, että fuusiopolypeptidien määrät kasvavat verrattuna cpVIII:aan ekstruusiotapahtuman aikana.

Eräässä toisessa toteutusmuodossa heterodimeerisen reseptorin määrää faagipartikkelin pinnalla voidaan säätää säätelemällä ajoitusta fuusiopolypeptidien ilmentymisen ja auttaja-faagin aiheuttaman superinfektion välillä. Kun ilmentämisvektori on viety isäntäsoluun, pitemmät aikaviiveet ennen auttaja-faagin lisäämistä sallivat fuusiopolypeptidien suuremman kumuloitumisen isäntäsolussa, jolloin ekstrudoituvan faagipartikkelin sieppaama fuusiopolypeptidimäärä kasvaa.

C. Diagnostiset menetelmät

Esillä olevassa keksinnössä kuvataan myös diagnostista systeemiä, suositeltavimmin reagenssipakkauksen muodossa olevaa, jonkin ennalta valitun ligandin tai antigeenin läsnäolon määrittämiseksi jossakin näytteessä, jolloin on suotavaa detektoida ligandin tai antigeenin läsnäolo, ja suositeltavimmin määrä, näytteessä tässä kuvattujen diagnostisten menetelmien mukaisesti.

Näyte voi olla kudos, kudosuute, nestemäinen näyte tai kehonestenäyte, kuten veri, plasma tai seerumi.

Diagnostiseen systeemiin kuuluu määränä, joka riittää ainakin yhden määrityksen suorittamiseen, tämän keksinnön mukainen filamenttifaagi tai ligandin sitova heterodimeerinen reseptori erikseen pakattuna reagenssina.

Esimerkeissä kuvataan esimerkkejä diagnostisista systeemeistä jonkin ennalta valitun ligandin ilmaisemiseksi kiinteässä faasissa ja tämän keksinnön mukaisen filamenttifaagin käyttämiseksi.

Ohjeet pakatun reagenssin tai pakattujen reagenssien käyttämiseksi on yleensä liitetty mukaan.

Tässä käytettynä termi "pakkaus" viittaa kiinteään matriisiin tai materiaaliin, kuten lasiin, muoviin (esim. polyeteeniin, polypropeeniin tai polykarbonaattiin), paperiin, kelmuun tai vastaavaan, joka kykenee pitämään määrätyissä rajoissa jonkin tämän keksinnön mukaisen heterodimeerisen reseptorin, filamenttifaagin tai faagikirjaston. Siten esimerkiksi pakkaus voi olla lasinen pullo, jota käytetään sisältämään milligramman suuruisia määriä jotakin kysymyksessä olevaa leimattua faagivalmistetta, tai se voi olla mikrotitrauslevyn kuoppa, johon on operatiivisesti kiinnitetty, so. liitetty niin, että ligandi voi sitoutua siihen, mikrogramman suuruisia määriä kysymyksessä olevaa reseptoria tai faagipartikkeli tai -partikkeleita.

"Käyttöohjeet" sisältävät yleensä konkreettisen ilmaisun, jossa kuvataan reagenssikonsentraatiota tai vähintään yhtä koemenetelmäparametria, kuten esimerkiksi lisättävän reagenssin ja näytteen suhteellisia määriä, reagenssi/näyteseoksien viipymisaikoja, lämpötilaa, puskuriolosuhteita ja vastaavia.

Tämän keksinnön mukainen diagnostinen systeemi sisältää mielellään myös jonkin leiman tai ilmaisuvälineen, joka kykenee osoittamaan sitomisreaktiokompleksin, joka sisältää ligandin sitovan heterodimeerisen reseptorin tai faagin, johon ennalta valittu ligandi on kompleksoitu, muodostumisen.

Sana "kompleksi" tässä käytettynä viittaa spesifisen sitoutumisreaktion, kuten faagi-ligandireaktion tai reseptori-ligandireaktion, tuotteeseen. Esimerkkejä komplekseista ovat immuunireaktiotuotteet.

Tässä käytettynä termit "leima" ja "ilmaisuväline" eri kieliopillisissa muodoissaan viittaavat yksittäisiin atomeihin ja molekyyleihin, jotka ovat joko suoraan tai epäsuorasti mukana detektoitavan signaalin tuottamisessa jonkin kompleksin läsnäolon osoittamiseksi. Mikä tahansa leima tai ilmaisuväline voidaan liittää tai sisällyttää johonkin ekspressoituun popypeptidiin tai faagipartikkeliin, jota käytetään diagnostisessa menetelmässä. Sellaiset leimat ovat sinänsä tunnettuja kliinisessä diagnostisessa kemiassa ja muodostavat osan tätä keksintöä vain mikäli niitä käytetään muutoin uusien proteiinimenetelmien ja/tai -systeemien kanssa.

Leima-aine voi olla jokin fluoresoiva leimausaine, joka sitoutuu kemiallisesti vasta-aineisiin tai antigeeneihin denaturoimatta niitä, fluorikromin (värin) muodostamiseksi, joka on käyttökelpoinen immunofluoresoivana merkkiaineena. Sopivia

fluoresoivia leimausaineita ovat fluorokromit kuten fluoreseiini-isosyanaatti (FIC), fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC), 5-dimetyyliamiini-1-naftaleenisulfonyylikloridi (DANSC), tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti (TRITC), lissamiini, rodamiini-8200-sulfonyylikloridi

(RB 200 SC) ja vastaavat. Eräs kuvaus immunofluoresenssianalyysitekniikoista löytyy artikkelista DeLuca, "Immunofluorescense Analysis", julkaisussa Antibody As a Tool, Marchalonis ym., toim., John Wiley & Sons, Ltd., ss. 189-231 (1982), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa ilmaisevana ryhmänä on jokin entsyymi, kuten piparjuuriperoksidaasi (HRP), glukoosioksidaasi tai jokin vastaava. Sellaisissa tapauksissa, joissa pääasiallisena ilmaisevana ryhmänä on jokin entsyymi, kuten HRP tai glukoosioksidaasi, tarvitaan lisäreagensseja visualisoimaan se seikka, että reseptori-ligandikompleksi (immunoreaktantti) on muodostunut. Tällaisia HRP:n kanssa käytettäviä lisäreagensseja ovat vetyperoksidi ja jokin hapetusväri-aineen prekursori kuten diaminobentsidiini. Eräs lisäreagenssi, jota voidaan käyttää glukoosioksidaasin kanssa, on 2,2'-aminodi-(3-etyylibentstiatsoliini-G-sulfonihappo) (ABTS).

Radioaktiivisia alkuaineita voidaan myös käyttää leimausaineina ja niitä kuvataan tässä havainnollisuuden vuoksi. Eräs esimerkki radioleimausaineista on jokin radioaktivinen alkuaine, joka tuottaa gammasäde-emissiota. Alkuaineet, jotka itse emittoivat gammasäteitä, kuten ^{124}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{132}I ja ^{51}Cr, edustavat yhtä luokkaa gammasäde-emissiota tuottavia radioaktiivisia alkuaineilmaisuryhmiä. Erityisen suositeltava on ^{125}I. Toinen luokka käyttökelpoisia leimausaineita ovat sellaiset alkuaineet, kuten ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O ja ^{13}N, jotka itse emittoivat positroneja. Tällä tavoin emittoidut positronit tuottavat gammasäteitä laskimissa, kun eläimen ruumiissa on elektroneja läsnä. Käyttökelpoinen on myös beeta-emitteri, kuten ^{3}H:n ^{111}indium.

Leimausaineiden kytkeminen, so. polypeptidien ja proteiinien leimaaminen on alalla tunnettua. Esimerkiksi proteiineja ja faagi voidaan leimata metabolisesti sisällyttämällä niihin radioisotooppeja sisältäviä aminohappoja viljelyväliaineessa olevana komponenttina. Katso esimerkiksi Galfre ym., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). Aktivoitujen funktionaalisten ryhmien avulla toteutettavat proteiinikonjugointi- tai -kytkentätekniikat ovat erityisen soveliaita. Katso esimerkiksi Aurameas ym., Scand J. Immunol., osa 8, lisäys 7:7-23 (1978), Rodwell ym., Biotech., 3:889-894, (1984) ja US-patentti nro 4493795.

Diagnostiset systeemit voivat myös sisältää, mieluiten erillisenä pakkauksena, jonkin spesifisen sitomisaineen. "Spesifinen sitomisaine" on jokin molekulaarinen yksikkö, joka pystyy selektiivisesti sitomaan jonkin tämän keksinnön mukaisen reagenssilajin tai kompleksin, joka sisältää tällaisen lajin, mutta joka yksikkö ei ole itse tämän keksinnön mukainen polypeptidi tai faagi. Esimerkkejä spesifisistä sitomisaineista ovat vasta-ainemolekyylit, komplementtiproteiinit tai niiden palaset, S. aureuksen proteiini A ja vastaavat. Suositeltavimmin spesifinen sitomisaine sitoo reagenssilajin, kun tämä laji on läsnä jonkin kompleksin osana.

Suositeltavissa toteutusmuodoissa spesifinen sitomisaine on leimattu. Kuitenkin kun diagnostinen systeemi sisältää jonkin spesifisen sitomisaineen, joka ei ole leimattu, ainetta käytetään yleensä monistusaineena tai -reagenssina. Näissä toteutusmuodoissa leimattu spesifinen sitomisaine pystyy spesifisesti sitomaan monistusaineen, kun monistusaine on sitoutunut reagenssilajin sisältävään kompleksiin.

Tämän keksinnön mukaisia diagnostisia reagenssipakkauksia voidaan käyttää "ELISA"-formaatissa jonkin ennalta valitun ligandin määrän ilmaisemiseen nestemäisessä näytteessä. "ELISA" viittaa entsyymisidonnaiseen immunosorbenttianalyysiin, jossa käytetään jotakin kiinteään faasiin sidottua vasta-ainetta tai antigeenia ja entsyymi-antigeeni- tai entsyymi-vasta-ainekonjugaattia ilmaisemaan jotakin näytteessä olevaa antigeenia ja sen määrän määrittämiseen ja sitä voidaan helposti soveltaa keksinnön mukaisiin menetelmiin. Eräs kuvaus ELISA-tekniikasta löytyy D.P. Sites ym. julkaisusta "Basic and Clinical Immunology", 4. painoksen luvusta 22, jonka on julkaissut Lange Medical Publications of Los Altos, CA, vuonna 1982, ja US-patenteista nro 3654090, nro 3850752 ja nro 4016043, jotka kaikki sisällytetään tähän viitejulkaisuina.

Niinpä eräissä toteutusmuodoissa jokin polypeptidi tai jokin esillä olevan keksinnön mukainen faagi voidaan kiinnittää kiinteään matriisiin kiinteän alustan, joka käsittää pakkauksen kysymyksessä olevissa diagnostisissa systeemeissä, muodostamiseksi.

Jokin reagenssi kiinnitetään yleensä johonkin kiinteään matriksiin adsorboimalla vesipitoisesta väliaineesta, vaikka muitakin kiinnitysmuotoja, joita voidaan soveltaa proteiineihin ja polypeptideihin ja jotka ovat alalla tunnettuja, voidaan käyttää. Tässä selityksessä kuvataan esimerkkejä adsorbointimenetelmistä.

Alalla tunnetaan hyvin käyttökelpoisia kiinteitä matrikseja. Sellaiset materiaalit ovat veteen liukenemattomia ja niihin kuuluu verkkoutettu dekstraani, jota on saatavissa tavaramerkillä SEPHADEX Pharmacia Fine Chemicals'ilta (Piscataway, NJ); agaroosi, polystyreenihelmet, joiden läpimitta on noin 1 mikronista noin 5 millimetriin ja joita on saatavissa firmasta Abbott Laboratories of North Chicago, IL; polyvinyylikloridi, polystyreeni, verkkoutettu polyakryyliamidi, nitroselluloosa- tai nailonperustaiset kudokset, kuten arkit, liuskat tai lusikat; tai putket, levyt tai mikrotitrauslevyn kuopat, kuten polystyreenistä tai polyvinyylikloridista valmistetut.

Tässä kuvattujen diagnostisten systeemien reagenssilajit, leimatut spesifiset sitomisaineet tai monistusaineet voidaan toimittaa käyttöön liuoksena, kuten nestemäisenä dispersiona, tai olennaisesti kuivana jauheena, esim. lyofilisoidussa muodossa. Kun ilmaisuaineena on jokin entsyymi, entsyymin substraatti voidaan myös toimittaa systeemissä erillisessä pakkauksessa. Jokin kiinteä alusta, kuten edellä kuvattu mikrotitrauslevy, ja yksi tai useampi puskuri voidaan myös sisällyttää erikseen pakattuina osina tähän diagnostiseen koesysteemiin.

Pakkausmateriaalit, jotka tulevat tässä kysymykseen diagnostisten systeemeiden yhteydessä, ovat sellaisia, joita tavallisesti käytetään diagnostisissa systeemeissä.

H. Määritysmenetelmät

Esillä oleva keksintö koskee erilaisia määritysmenetelmiä jonkin ennalta valitun ligandin, jota on yleensä läsnä vesipitoisessa seoksessa, kuten jossakin biologisessa nestemäisessä näytteessä, läsnäolon ja suositeltavimmin määrän määrittämiseksi käyttäen jotakin tämän keksinnön mukaista heterodimeeristä reseptoria tai faagia ligandi-reseptorireagenssina sitoutumisreaktiotuotteen muodostamiseksi, jonka määrä on sidoksissa joko suoraan tai epäsuorasti näytteessä olevan ennalta valitun ligandin määrään.

Alaan perehtyneet ymmärtävät, että on olemassa lukemattomia tunnettuja kliinisiä diagnostisia kemiallisia menettelytapoja, joissa tämän keksinnön mukaista sitomisreagenssia voidaan käyttää sitoutumisreaktiotuotteen, jonka määrä on sidoksissa näytteessä olevan ligandin määrään, muodostamiseen. Siten vaikka tässä kuvataan esimerkkejä määritysmenetelmistä, keksintö ei rajoitu niihin.

Erilaisia heterogeenisiä tai homogeenisiä menettelytapoja, joko kompetitiivisia tai ei-kompetitiivisia, voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisen määritysmenetelmän toteuttamiseen.

Erään toteutusmuodon mukaan keksintö koskee suoraa sitomismääritystä, jossa käytetään jotakin tämän keksinnön mukaista ligandin sitovaa heterodimeeristä reseptoria sitomisaineena jonkin ennalta valitun ligandin, johon reseptori sitoutuu, läsnäolon ilmaisemiseksi. Menetelmä käsittää vaiheet, joissa a) sekoitetaan näyte, jonka epäillään sisältävän jonkin ennalta valitun antigeenin, johonkin tämän keksinnön mukaiseen ligandin sitovaan heterodimeeriseen reseptoriin, joka sitoutuu ennalta valittuun ligandiin sitoutumisolosuhteissa, jotka ovat riittävät, jotta ligandin sitova heterodimeerinen reseptori sitoo ligandin ja muodostaa ligandi-reseptorikompleksin; ja b) ilmaistaan ligandi-reseptorikompleksin tai kompleksissa olevan ligandin sitovan heterodimeerisen reseptorin läsnäolo.

Sitomisolosuhteet ovat sellaiset, jotka pitävät yllä reseptorin ligandinsitomisaktiivisuutta. Näihin olosuhteisiin kuuluu lämpötila-alue noin 4-50 °C, pH-alue noin 5-9 ja ionivahvuus, joka vaihtelee noin tislatun veden ionivahvuudesta noin 1-moolisen natriumkloridin ionivahvuuteen.

Ilmaisuvaihe voidaan suunnata, kuten immunologian alalla hyvin tiedetään, joko kompleksiin tai sitomisreagenssiin (kompleksin reseptorikomponenttiin). Niinpä voidaan käyttää jotakin sekundaarista sitomisreagenssia, kuten jotakin reseptorille spesifistä vasta-ainetta.

Vaihtoehtoisesti kompleksi voidaan ilmaista käyttämällä jotakin leimattua reseptorimolekyyliä, jolloin kompleksi leimautuu. Ilmaisu käsittää tässä tapauksessa kompleksissa olevan leimausaineen ilmaisun.

Eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa ligandin sitova heterodimeerinen reseptori saatetaan käyttöön filamentti-faagipartikkeliin, so. faagin pintaan kiinnitettynä. Erästä esimerkkimääritystä, jossa käytetään tämän keksinnön mukaista filamenttifaagia, kuvataan ELISA-formaatissa esimerkeissä.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa filamenttifaagipartikkeli voidaan ilmaista leimattuna, esimerkiksi jollakin radioisotoopilla, jotka on liitetty faagin proteiiniin tai nukleiinihappoon, kuten tässä kuvataan. Tässä suoritusmuodossa ilmaisu käsittää leimausaineen ilmaisun kompleksissa ja tällä tavalla ligandin läsnäolon ilmaisun kompleksissa.

Eräässä toisessa diagnostisessa menetelmässä käytetään filamenttifaagipartikkelin monivalenssisuutta ligandin ristiinsitomiseen, jolloin muodostuu useiden ligandien ja faagipartikkeleiden yhteenkokouma, josta saadaan saostuva aggregaatti. Tämä suoritusmuoto on vertailukelpoinen hyvin tunnettujen immunosaostusmene-

telmien kanssa. Tämä toteutusmuoto käsittää vaiheet, joissa sekoitetaan näyte moniin tämän keksinnön mukaisiin faagipartikkeleihin sitomisseoksen muodostamiseksi sitomisolosuhteissa, minkä jälkeen seuraa erotusvaihe, jossa muodostuneet sitomiskompleksit eristetään. Yleensä eristäminen suoritetaan sentrifugoimalla tai suodattamalla, jotta seoksesta saadaan aggregaatti. Sitomiskompleksien läsnäolo osoittaa ilmaistavan ennalta valitun ligandin läsnäolon.

Esimerkit

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on havainnollistaa, vaan ei rajoittaa keksinnön alaa.

1. Dikistronisen ilmentämisvektorin rakentelu heterodimeerisen reseptorin tuottamiseksi faagipartikkeleilla

Vektorisysteemin saamiseksi suuren määrän Fab-vasta-ainepalasien, jotka voidaan seuloa suoraan, kehittämiseksi ekspressiokirjastoja bakteriofaagi lambdassa on rakenneltu aikaisemmin, kuten kuvaavat Huse ym., Science, 246:1275-1281 (1089). Nämä systeemit eivät sisältäneet design-ominaisuuksia, joiden avulla ekspressoitu Fab saadaan kohdentumaan filamenttifaagipartikkelin pintaan.

Tärkein kriteeri, jota käytettiin valittaessa vektorisysteemiä, oli tarve kehittää suurin mahdollinen määrä Fab-palasia, jotka voitaisiin seuloa suoraan. Bakteriofaagi lambda valittiin lähtökohdaksi ilmentämisvektorin kehittämistä varten kolmesta syystä. Ensiksikin faagi-DNA:n pakkaaminen in vitro oli tehokkain menetelmä DNA:n viemiseksi takaisin isäntäsoluihin. Toiseksi oli mahdollista ilmaista proteiiniekspressio yhden faagiplakin tasolla. Lopuksi faagikirjastojen seulominen kävi yleensä helpommin ei-spesifisellä sitoutumisella. Vaihtoehto, plasmidikloonausvektorit, on edullinen ainoastaan analysoitaessa klooneja sen jälkeen kun ne on identifioitu. Tätä etua ei menetetty esillä olevassa systeemissä, koska käytettiin dikistronista ilmentämisvektoria, kuten pCombVIII:aa, jolloin voitiin leikata plasmidi, joka sisälsi raskasta ketjua, kevyttä ketjua tai Fab'ia ilmaisevia inserttejä.

a. Dikistronisen ilmentämisvektori pCOMB:in rakentelu

(i) Lambda Zap™ II:n valmistus

Lambda Zap™ on alkuperäisen Lambda Zapin (ATCC nro 40298) johdos, jossa ovat säilyneet kaikki alkuperäisen Lambda Zapin ominaisuudet, mukaanlukien 6 uniikkia kloonauspaikkaa, fuusioproteiinin ekspressio ja kyky nopeasti leikata

insertti fagomidin muodossa (Bluescript SK-), mutta siinä ei ole SAM 100 –mutaatiota, jolloin se sallii kasvun monissa non-Sup F -kannoissa, mukaanlukien XL1-Blue. Lambda Zap™ II rakennettiin kuten kuvaavat Short ym., Nuc. Acids Res., 16:7583-7600, 1988, korvaamalla Lambda S geeni, joka sisältyy 4254 emäsparin (bp) DNA-palaseen, joka on tuotettu digeroimalla Lambda Zapia restriktioentsyymi Nco I:llä. Tämä 4254 emäsparin DNA-palanen korvattiin 4254 emäsparin DNA-palasella, joka sisälsi Lambda S geenin ja oli eristetty Lambda gt10:stä (ATCC nro 40179), kun vektori oli digeroitu restriktioentsyymi Nco I:llä. 4254 emäsparin DNA-palanen, joka oli eristetty Lambda gt10:stä, ligatoitiin alkuperäiseen Lambda Zap -vektoriin käyttäen T4 DNA -ligaasia ja standardimenettelyjä, jollaisia kuvataan julkaisussa Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel ym., toim., John Wiley and Sons, NY, 1987, Lambda Zap™ II:n muodostamiseksi.

(ii) Lambda Hc2:n valmistaminen

Monien V_H-koodaavien DNA-homologien ilmentämiseksi E. coli -isäntäsolussa rakennettiin vektori, joka nimitettiin Lambda Hc2:ksi. Vektori antoi käyttöön seuraavaa: mahdollisuuden sijoittaa V_H-koodaavat DNA-homologit oikeaan lukukehykseen; ribosomin sitomiskohdan, kuten kuvaavat Shine ym., Nature, 254:34, 1975; johtosekvenssin, joka ohjaa ilmentyneen proteiinin periplasmatilaan ja joka nimitettiin pelB-sekreetiosignaaliksi; polynukleotidisekvenssin, joka koodasi tunnettua epitooppia (epitooppi tag); ja myös polynukleotidin, joka koodasi väliproteiinia V_H-koodaavan DNA-homologin ja epitooppi tagia koodaavan polynukleotidin välissä. Lambda Hc2:ta ovat aikaisemmin kuvanneet Huse ym., Science, 246:1275-1281 (1989).

Lambda Hc2:n valmistamiseksi rakennettiin synteettinen DNA-sekvenssi, joka sisälsi kaikki edellä mainitut ominaisuudet, konstruoimalla yksisäikeisiä 20-40 emäksen polynukleotidipalasia, jotka hybridisoituisivat toisiinsa ja muodostaisivat kaksisäikeisen synteettisen DNA-sekvenssin, joka on esitetty kuviossa 3. Yksittäiset yksisäikeiset polynukleotidisegmentit on esitetty taulukossa 3.

Polynukleotidit N2, N3, N9-4, N11, N10-5, N6, N7 ja N8 (taulukko 3) käsiteltiin kinaasilla lisäämällä 1 µl kutakin polynukleotidia 0,1 mikrogrammaa/mikrolitra (µg/µl) ja 20 yksikköä T_4-polynukleotidikinaasia liuokseen, joka sisälsi 70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ditiotreitolia (DTT), 10 mM beeta-merkaptoetanolia, 500 mikrogrammaa/mikrolitra (µg/µl) naudan seerumialbumiinia (BSA). Liuosta pidettiin 37 Celsius-asteessa (37 °C) 30 minuuttia ja reaktio keskeytettiin pitämällä liuosta 65 °C:ssa 10 minuuttia. Kahta päätepolynukleotidia, 20 ng poly-

nukleotideja N1 ja polynukleotideja N12, lisättiin edellä mainittuun kinaasireaktioliuokseen yhdessä 1/10 tilavuusosan kanssa liuosta, joka sisälsi 20,0 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2,0 mM $MgCl_2$ ja 50,0 mM NaCl. Tätä liuosta kuumennettiin 70 °C:seen 5 minuuttia ja sen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, noin 25 °C:seen, 1,5 tunnin kuluessa 500 ml:n vesipullossa. Tänä aikana kaikki 10 polynukleotidia avautuivat muodostaakseen kaksisäikeisen synteettisen DNA-insertin, joka on esitetty kuvossa 3. Yksittäiset polynukleotidit liitettiin kovalenttisesti toisiinsa synteettisen DNA-insertin stabiloimiseksi lisäämällä 40 µl edellä mainittua reaktioliuosta liuokseen, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM adenosiinitrifosfaattia (ATP) ja 10 yksikköä T4-DNA-ligaasia. Tätä liuosta pidettiin 37 °C:ssa 30 minuuttia ja sitten T4-DNA-ligaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 65 °C:ssa 10 minuuttia. Päätepolynukleotidit kinasoitiin sekoittamalla 52 µl edellä mainittua reaktioliuosta, 4 µl liuosta, joka sisälsi 10 mM ATP ja 5 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Tätä liuosta pidettiin 37 °C:ssa 30 minuuttia ja sitten T4-polynukleotidikinaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 65 °C:ssa 10 minuuttia.

Taulukko 3

SEQ

ID NO.

(22) N1) 5' GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCAT 3'
(23) N2) 5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(24) N3) 5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCC 3'
(25) N6) 5' CAGTTTCACCTGGGCCATGGCTGGTTGGG 3'
(26) N7) 5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(27) N8) 5' GTATTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGAATTTGC 3'
(28) N9-4) 5' AGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTTACCCGTAC 3'
(29) N10-5) 5' CGGAACGTCGTACGGGTAACTAGTCTAGAAATCTCGAG 3'
(30) N11) 5' GACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTCG 3'
(31) N12) 5' TCGACGAATTCTATTAAGAACCGTAGTC 3'

Valmiiksi saatu synteettinen DNA-insertti ligatoitiin suoraan Lambda Zap™ II -vektoriin, jota kuvattiin esimerkissä 1a(i) ja joka oli aikaisemmin pilkottu restriktioentsyymeillä Not I ja Xho I. Ligaatioseos pakattiin toimittajien ohjeiden mukaan käyttäen Gigapack II Gold pakkausuutetta, jota on saatavissa firmalta Stratagene, La Jolla, Kalifornia. Pakattu ligaatioseos siveltiin levyihin XL1-Blue-solujen päälle (Stratagene). Yksittäisistä lambda-plakeista poistettiin kuori ja insertit leikattiin

valmistajan (Stratagene) Lambda Zap™ II:ta varten toimittaman in vivo leikkausmenettelyn mukaan. Tämä in vivo leikkausmenettely siirsi kloonatun insertin Lambda Hc2 -vektorista fagomidivektoriin manipuloinnin ja sekvenoinnin helpottamiseksi. Edellä esitettyjen kloonausvaiheiden tarkkuus vahvistettiin sekvenoimalla insertti käyttäen Sangerin dideoksimenetelmää, jota kuvaavat Sanger ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467, (1977) ja käyttäen AMV Reverse Transscriptase ^{35}S-ATP -sekvenointipakkauksessa olevia valmistajan ohjeita (Stratagene). Tuloksena saadun V_H-ilmentämisvektorissa (Lambda Hc2) olevan kaksisäikeisen synteettisen DNA-insertin sekvenssi on esitetty kuviossa 3. Lambda Hc2:n kummankin säikeen (ala- ja yläsäikeen) sekvenssi on lueteltu sekvenssiluettelossa tunnuksilla SEQ ID NO 1 ja SEQ ID NO 2, vastaavasti. Saatu Lambda Hc2 -ilmentämisvektori on esitetty kuviossa 4.

(iii) Lambda Lc2:n valmistus

Monien V_L-koodaavien DNA-homologien ilmentämiseksi E. coli -isäntäsolussa rakennettiin Lambda Lc2:ksi merkitty vektori, jolla oli kyky sijoittaa V_L-koodaavat DNA-homologit oikeaan lukukehykseen, joka antoi ribosomin sitomiskohdan, kuten kuvaavat Shine ym., Nature, 254:34 (1975), joka antoi pelB geenin johtosekvenssisekreetiosignaalin, jota ovat aikaisemmin käyttäneet menestyksekkäästi erittämään Fab-palasia E. colissa Lei ym., J. Bac., 169:4379 (1987) ja Better ym., Science, 240:1041 (1988), ja joka myös antoi käyttöön polynukleotidin, joka sisälsi restriktioentsyymikohdan kloonausta varten. Lambda Lc2:ta ovat aikaisemmin kuvanneet Huse ym., Science, 246:1275-1281 (1989).

Rakennettiin synteettinen DNA-sekvenssi, joka sisälsi kaikki edellä mainitut ominaisuudet, konstruoimalla yksisäikeisiä 20-60 emäksen polynukleotidipalasia, jotka hybridisoituisivat toisiinsa ja muodostaisivat kaksisäikeisen synteettisen DNA-sekvenssin, joka on esitetty kuviossa 5. Kunkin yksittäisen yksisäikeisen polynukleotidipalasen (01-08) sekvenssi kaksisäikeisen synteettisen DNA-sekvenssin sisällä on esitetty taulukossa 3.

Polynukleotidit 02, 03, 04, 05, 06 ja 07 (taulukko 4) käsiteltiin kinaasilla lisäämällä 1 µl (0,1 µg/µl) kutakin polynukleotidia ja 20 yksikköä T_4-polynukleotidikinaasia liuokseen, joka sisälsi 70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl, 5 mM DTT, 10 mM beeta-merkaptoetanolia, 500 mg/ml BSA. Liuosta pidettiin 37 °C 30 minuuttia ja reaktio pysäytettiin pitämällä liuosta 65 °C:ssa 10 minuuttia. 20 ng kutakin kahdesta päätepolynukleotidista, 01 ja 08, lisättiin edellä mainittuun kinaasireaktioliuokseen yhdessä 1/10 tilavuusosan kanssa liuosta, joka sisälsi 20,0 mM Tris-

HCl, pH 7,4, 2,0 mM MgCl ja 50,0 mM natriumkloridia (NaCl). Tätä liuosta kuumennettiin 70 °C:seen 5 minuutiksi ja sen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, noin 25 °C:seen, 1,5 tunnin kuluessa 500 ml:n vesipullossa. Tänä aikana kaikki 8 polynukleotidia avautuivat muodostaakseen kaksisäikeisen synteettisen DNA-insertin, joka on esitetty kuviossa 5. Yksittäiset polynukleotidit liitettiin kovalenttisesti toisiinsa synteettisen DNA-insertin stabiloimiseksi lisäämällä 40 µl edellä mainittua reaktioliuosta liuokseen, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7 mM MgCl, 1 mM DTT, 1 mM ATP ja 10 yksikköä T4-DNA-ligaasia. Tätä liuosta pidettiin 37 °C:ssa 30 minuuttia ja sitten T4-DNA-ligaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 65 °C:ssa 10 minuuttia. Päätepolynukleotidit kinasoitiin sekoittamalla 52 µl edellä mainittua reaktioliuosta, 4 µl liuosta, joka sisälsi 10 mM ATP ja 5 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Tätä liuosta pidettiin 37 °C:ssa 30 minuuttia ja sitten T4-polynukleotidikinaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 65 °C:ssa 10 minuuttia.

Taulukko 4

SEQ

ID NO.

(32) 01) 5' TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCAT 3'
(33) 02) 5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(34) 03) 5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCC 3'
(35) 04) 5' GAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG 3'
(36) 05) 5' GTATTTCATTATGACTGTCTCCTTGGCGACTAGTTTAGAA-TTCAAGCT 3'
(37) 06) 5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(38) 07) 5' TGACGAGCTCGGCCATGGCTGGTTGGG 3'
(39) 08) 5' TCGACGGCCGCTTAACTCTAGAAC 3'

Valmiiksi saatu synteettinen DNA-insertti ligatoitiin suoraan Lambda Zap™ II –vektoriin, jota kuvattiin esimerkissä 1a(i) ja joka oli aikaisemmin digeroitu restriktioentsyymeillä Sac I ja Xho I. Ligaatioseos pakattiin toimittajien ohjeiden mukaan käyttäen Gigapack II Gold pakkausuutetta (Stratagene). Pakattu ligaatioseos siveltiin levyihin XL1-Blue-solujen päälle (Stratagene). Yksittäisistä lambda-plakeista poistettiin kuori ja insertit leikattiin valmistajan (Stratagene) Lambda Zap™ II:ta varten toimittaman in vivo leikkausmenettelyn mukaan. Tämä in vivo leikkausmenettely siirsi kloonatun insertin Lambda Lc2 -vektorista plasmidifagomidivektoriin manipuloinnin ja sekvenoinnin helpottamiseksi. Edellä esitettyjen kloonausvaiheiden tark-

kuus vahvistettiin sekvenoimalla insertti käyttäen AMV Reverse Transscriptase ^{35}S-ATP -sekvenointipakkauksessa olevia valmistajan ohjeita (Stratagene). Tuloksena saadun Lc2-ilmentämisvektorin (Lambda Lc2) sekvenssi on esitetty kuviossa 5. Kumpikin säie on erikseen lueteltu sekvenssiluettelossa tunnuksilla SEQ ID NO 3 ja SEQ ID NO 4. Saatu Lc2-vektori on esitetty kaavamaisesti kuviossa 6.

Eräs suositeltava vektori, joka on merkitty Lambda Lc3:ksi, käytettäväksi tässä keksinnössä on edellä kuvatun Lambda Lc2:n johdos. Lambda Lc2 sisältää Spe I -restriktiokohdan (ACTAGT), joka sijaitsee 3' - EcoR I -restriktiokohta ja 5' - Shine-Dalgarno -ribosomin sitomispaikka, kuten on esitetty kuvion 5 sekvenssissä ja SEQ ID NO 3:ssa. Spe I -restriktiokohta on myös läsnä Lambda Hc2:ssa, kuten on osoitettu kuvioissa 3 ja 4 ja kohdassa SEQ ID NO 1. Kombinatorinen vektori, joka merkittiin pComb:iksi, rakennettiin yhdistämällä osia Lambda Hc2:sta ja Lc2:sta yhteen, kuten kuvataan esimerkissä 1a(iv) tuonnempana. Saatu kombinatorinen pComb-vektori sisälsi kaksi Spe I -restriktiokohtaa, joista toisen antoi Lambda Hc2 ja toisen Lambda Lc2, ja niiden välissä oli EcoR I -kohta. Huolimatta kahden Spe I -restriktiokohdan läsnäolosta DNA-homologit, joissa oli Spe I ja EcoR I kohesiiviset päät, saatiin onnistuneesti suunnatusti ligatoiduiksi pComb-ilmentämisvektoriin, joka oli aikaisemmin digeroitu Spe I:llä ja EcoR I:llä, kuten kuvataan esimerkissä 1b tuonnempana. EcoR I restriktiokohdan läheisyys 3'-pään Spe I -kohtaan, joka saatiin Lc2-vektorista, esti 3'-pään Spe I -kohdan täydellisen digestion. Siten pCombin digeroinnin Spe I:llä ja EcoR I:llä tuloksena ei ollut EcoR I -kohdan poistuminen kahden Spe I -kohdan välistä.

Toisen Spe I -restriktiokohdan läsnäolo saattaa olla epäsuotavaa ligaatioiden kannalta pComb-vektoriin, joka on digeroitu ainoastaan Spe I:llä, sillä kahden kohdan välinen alue eliminoituisi. Sen vuoksi tuotetaan Lambda Lc2:n johdos, josta puuttuu toinen eli 3'-Spe I -kohta ja joka merkitään Lambda Lc3:ksi, ensiksi digeroimalla Lambda Lc2 Spe I:llä linearisoidun vektorin muodostamiseksi. Päät täytetään tylppien päiden muodostamiseksi, jotka sitten ligatoidaan yhteen, jolloin saadaan Lambda Lc3, josta puuttuu yksi Spe I -kohta. Lambda Lc3 on suositeltavin vektori käytettäväksi kombinatorisen vektorin konstruoimisessa, kuten tuonnempana kuvataan.

(iv) pCombin valmistus

Fagomideja leikattiin ilmentämisvektoreista Lambda Hc2 tai Lambda Lc2 käyttäen edellä kuvattua in vivo leikkausmenettelyä. Kaksisäikeinen DNA valmistettiin fagomidin sisältävistä soluista menetelmien mukaan, joita ovat kuvanneet Holmes

ym., Anal. Biochem., 114:193 (1981). In vivo leikkauksesta saadut fagomidit sisälsivät samat nukleotidisekvenssit vasta-ainefragmenttien kloonausta ja ekspressiota varten kuin emovektorit ja ne nimetään fagomidi Hc2:ksi ja Lc2:ksi, vastaten Lambda Hc2:ta ja Lc2:ta, vastaavasti.

Kombinatorisen fagomidivektorin pComb, joka tuotettiin yhdistämällä osia fagomidista Hc2 ja fagomidista Lc2, rakentamiseksi fagomidi Hc2 digeroitiin ensiksi Sac I:llä restriktiokohdan, joka sijaitsi 5'-päästä LacZ-promoottoriin, poistamiseksi. Linearisoitu fagomidi tehtiin sitten tylppäpäiseksi T4-polymeraasilla ja ligatoitiin, jolloin saatiin Hc2-fagomidi, josta puuttui yksi Sac I -kohta. Muunnettu Hc2-fagomidi ja Lc2-fagomidi restriktiodigeroitiin sitten erikseen Sca I:llä ja EcoR I:llä, jolloin saatiin tulokseksi Hc2-fragmentti, jossa oli suunnassa 5' → 3' Sca I, Not I, Xho I, Spe I ja EcoR I -restriktiokohdat, ja Lc2-fragmentti, jossa oli suunnassa 5' → 3' EcoR I, Sac I, Xba I ja Sac I -restriktiokohdat. Lineaarisiksi tehdyt fagomidit liitettiin sitten yhteen vastaavista kohesiivisista päistään pCombin, rengasmaiseksi tehdyn fagomidin, jossa restriktiokohdat Not I, Xho I, Spe I, EcoR I, Sac I, Xba I, Not I, Apa I ja Sca I ovat lineaarisessa järjestyksessä, muodostamiseksi. Ligatoitu fagomidivektori insertoitiin sitten sopivaan bakteeri-isäntään ja transformantit valittiin ampisilliini-antibiootilla.

Valikoidut ampisilliinille resistentit transformantit seulottiin kahden Not I -kohdan perusteella. Saatu ampisilliinille resistentti kombinatorinen fagomidivektori merkittiin pComb:iksi, jonka kaavamainen järjestys on esitetty kuviossa 7. Saatu kombinatorinen vektori, pComb, muodostui DNA-molekyylistä, jossa oli kaksi kasettia kahden fuusioproteiinin ilmentämiseksi ja jolla oli nukleotiditähdesekvenssit seuraavia operatiivisesti liitettyjä elementtejä varten lueteltuina suunnassa 5' → 3': ensimmäinen kasetti, joka muodostui indusoituvasta LacZ-promoottorista LacZ-geenistä ylävirtaan, Not I -restriktiokohta, ribosomin sitomiskohta, pelB-johtosekvenssi, välisekvenssi, kloonausalue, jota reunustavat 5' Xho ja 3' Spe I –restriktiokohdat, dekapeptidi-tag, jota seuraavat ekspressiota säätelevät lopetussekvenssit, EcoR I -restriktiokohta, joka sijaitsee 5'-päästä toiseen kasettiin, joka muodostuu ekspressiota säätelevästä ribosomin sitomiskohdasta, pelB-johtosekvenssistä, välialueesta, kloonausalueesta, jota reunustaa 5' Sac I -restriktiokohta ja 3'-Xba I -restriktiokohta ja jota seuraa ekspressiota sääteleviä lopetussekvenssejä ja toinen Not I -restriktiokohta.

Eräs tässä keksinnössä käytettäväksi suositeltava kombinatorinen vektori, joka merkittiin pComb2:ksi, rakennetaan yhdistämällä osia fagomidi Hc2:sta ja fagomidi Lc3:sta, kuten edellä kuvattiin pCombin valmistuksen yhteydessä. Saatu kom-

binatorinen vektori, pComb2, muodostuu DNA-molekyylistä, jossa on kaksi kasettia, jotka ovat identtisiä pCombin kanssa, kahden fuusioproteiinin ilmentämiseksi samalla tavoin pCombin kanssa paitsi että toinen Spe I -restriktiokohta on toisessa kasetissa eliminoitu.

b. Vektoreiden pCombVIII ja pCombIII rakentelu fuusioproteiinien, joissa on bakteriofaagin kuoriproteiinin kalvoankkuri, ilmentämiseksi

Monien endonukleaasirestriktiokloonauskohtien vuoksi edellä valmistettu pComb-fagomidi-ilmentämisvektori on käyttökelpoinen kloonausvektori modifiointia varten tämän keksinnön mukaista ilmentämisvektoria valmistettaessa. Tätä tarkoitusta varten pComb digeroidaan Ecor I:llä ja Spe I:llä ja käsitellään sen jälkeen fosfataasilla linearisoidun pComb'in tuottamiseksi.

(i) pCombVIII:n valmistus

PCR-tuote, joka on tuotettu esimerkissä 2g ja jolla on nukleotidisekvenssi, joka määrittää filamenttifaagin kuoriproteiinin VIII (cpVIII) kalvoankkuridomeenin, ja kohesiiviset Spe I ja EcoR I -päät, lisättiin sekoittaen linearisoituun pCombiin ligaatioseoksen muodostamiseksi. cpVIII-kalvoankkuridomeenia koodaava PCR-fragmentti liitettiin suunnatusti pComb-fagomidi-ilmentämisvektoriin vastaavissa kohesiivisissa päissä, minkä tuloksena muodostui pCombVIII (nimitetään myös pComb8:ksi). pCombVIII sisältää kasetin, jonka määrittää nukleotidisekvenssi, joka on esitetty SEQ ID NO 116:ssa nukleotidiemäksestä 1 emäkseen 259, ja joka sisältää pelB-sekreetiosignaalin, joka on operatiivisesti liitetty cpVIII-kalvoankkuriin.

Eräs tässä keksinnössä käytettäväksi suositeltava fagomidi-ilmentämisvektori, jota nimitetään joko pComb2-VIII:ksi tai pComb2-8:ksi, valmistettiin kuten edellä kuvattiin liittämällä suunnatusti cpVIII-kalvoankkuria koodaava PCR-fragmentti pComb2-fagomidi-ilmentämisvektoriin Spe I ja EcoR I kohesiivisten päiden kautta. pComb2-8:lla oli ainoastaan yksi Spe I -restriktiokohta.

(ii) pCombIII:n valmistus

Erillinen fagomidi-ilmentämisvektori rakennettiin käyttäen sekvenssejä, jotka koodaavat bakteriofaagin cpIII-kalvoankkuridomeenia. cpIII-kalvoankkuridomeenia määrittävä PCR-tuote, joka sisältää LacZ-promoottorialuesekvenssin 3'-päästä kalvoankkuriin kevyen ketjun ilmentämistä varten ja Spe I ja EcoR I kohesiiviset päät, valmistettiin kuten kuvattiin cpVIII:n, jonka yksityiskohdat kuvataan esimer-

kissä 2g, yhteydessä. cpIII-johdettu PCR-tuote ligatoitiin sitten linearisoituun pComb2-vektoriin, jossa oli vain yksi Spe I -kohta, vektorin pComb2-3:n (nimitetään myös pComb2-III:ksi) muodostamiseksi.

Eräs tässä keksinnössä käytettäväksi vielä suositeltavampi fagomidi-ilmentämisvektori, jossa on lisärestriktioentsyymikloonauskohtia ja jota nimitetään pComb-III':ksi tai pComb2-3':ksi, valmistettiin kuten edellä kuvattiin pComb2-3:n yhteydessä lisäämällä 51 emäsparin fragmentti pBlue-scriptistä, kuten kuvaavat Sort ym., Nuc. Acids Res., 16:7583-7600 (1988) ja joka on saatavissa Stratageneltä. pComb2-3':n valmistamiseksi pComb2-3:a digeroitiin ensiksi Xho I ja Spe I –restriktioentsyymeillä linearisoidun pComb2-3:n muodostamiseksi. Vektori pBluescript digeroitiin samoilla entsyymeillä, jolloin irtosi 51 emäsparin fragmentti, joka sisälsi restriktioentsyymikohdat Sal I, Acc I, Hinc II, Cla I, Hind III, EcoR V, Pst I, Sma I ja BamH I. 51 emäsparin fragmentti liitettiin linearisoituun pComb2-3 -vektoriin kohesiivisten Xho I ja Spe I -päitten kautta pComb2-3':n muodostamiseksi.

c. pCBAK-vektoreiden, joissa on kloramfenikoliresistenssin merkkiaine, rakentelu

Erilaisten valikoitavien merkkigeenien, kuten kloramfenikoliasetyylitransferaasin (CAT), käyttämiseksi bakteerien, jotka on transformoitu tämän keksinnön mukaisella vektorilla, valikoimiseksi kehitettiin pCombiin perustuvia ilmentämisvektoreita, joissa on CAT:a koodaava geeni ja joita nimitetään pCBAK-vektoreiksi. pCBAK-vektorit valmistetaan yhdistämällä osia pCB:stä ja pComb:ista.

(i) pCB:n valmistaminen

pBlueScript-fagomidivektoreita, pBC SK(-) ja pBS SK(-), (Stratagene), muunnettiin ja yhdistettiin kolmannen vektorin, jota nimitetään pCB:ksi, valmistamiseksi alla kuvatulla tavalla.

pBC SK(-), joka sisältää jonkin kloramfenikoliresistanssin mukaan valikoitavan merkkiainegeenin, digeroitiin Bst BI:llä ja ja päät tehtiin tylpiksi T4-polymeraasilla. Toinen digerointi Pvu I:llä antoi mahdollisuuden poistaa 1 kiloemäksen (kb) kokoinen palanen, jolloin jäljelle jäi lineaariseksi tehty 2,4 kb linearisoitu vektori, jossa säilyi CAT-valikoituva resistenssiä varten merkitty geeni ja indusoituva LacZ-promoottori ylävirtaan LacZ-geenistä ja ColE1-alkuperäisalue. 2,4 kb palanen otettiin talteen.

pBS SK(-)-vektoria digeroitiin Aat II:lla ja tehtiin tylppäpäiseksi T4-polymeraasilla. Toinen digerointi Pvu I:llä antoi mahdollisuuden eristää 800 emäsparin (bp) fragmentti, joka sisälsi f1-replikointilähteen. Kun 800 bp:n f1-fragmentista johdettu pBS ligatoitiin 2,4 kb:n pBC-fragmenttiin, syntyi pCB-prekursorivektori, joka sisälsi Sac I -kohdan, f1-replikointilähteen, CAT valikoituvan resistenssiä varten merkityn geenin, ColE1-lähteen, multippelikloonauskohdan (MCS), jonka sivustoilla oli T_3- ja T_7-promoottorit ja indusoituvan LacZ-promoottorin ylävirtaan LacZ-geenistä.

pCB-prekursorivektori digeroitiin sitten Sac I:llä ja tehtiin tylppäpäiseksi T4-polymeraasilla. T4-polymeraasilla käsitelty pCB-vektori liitettiin sitten uudelleen pCB-vektorin muodostamiseksi ja siitä puuttui yksi Sac I -kohta.

(ii) pCBAKO:n valmistaminen

pCB-vektori, joka sisälsi CAT:n mukaan valikoituvan resistenssimarkkerigeenin, digeroitiin Sac II:lla ja Apa I:llä ja käsiteltiin fosfataasilla uudelleenligatoitumisen estämiseksi ja linearisoidun pCB-vektorin muodostamiseksi. Esimerkissä 1(a)(iv) valmistettu pComb-vektori restriktiodigeroitiin Sac II:lla ja Ape I:llä fragmentin, joka sisälsi nukleotidijäännössekvenssejä, jotka alkoivat LacZ-promoottorin 5'-päästä ja ulottuivat ohi toisen Not I -kohdan 3'-pään, irrottamiseksi. Sac II- ja Apa I-pComb-DNA-pätkä ligatoitiin sitten suunnatusti samalla tavoin digeroituun pCB-vektoriin fagomidi-ilmentämisvektorin pCBAKO muodostamiseksi. Suositeltavia pCBAK-ilmentämisvektoreita rakennetaan pComb2:n avulla. Saatu pCBAK-ilmentämisvektori sisälsi ainoastaan yhden Spe I -restriktiokohdan.

(iii) pCBAK8:n valmistaminen

pCBAK-perustaisen fagomidi-ilmentämisvektorin, joka koodaa bakteriofaagin kuoriproteiinin kalvoankkuridomeenia ilmennetyssä fuusioproteiinissa, valmistamiseksi pCB-fagomidikloonausvektori, joka valmistettiin esimerkissä 1c(ii), linearisoitiin digeroimalla Sac II:lla ja Apa I:llä. pCombVIII-fagomidi-ilmentämisvektori, joka valmistettiin esimerkissä 1b(i), restriktiodigeroitiin Sac II:lla ja Apa I:llä fragmentin, joka sisälsi nukleotiditähdesekvenssin, joka alkoi 5'-päästä LacZ-promoottoriin ja ulottui toisen Not -kohdan 3'-pään ohi, muodostamiseksi. Fragmentti ligatoitiin suunnatusti linearisoituun pCB-kloonausvektoriin fagomidi-ilmentämisvektorin pCBAK8 muodostamiseksi.

(iv) pCBAK3:n valmistaminen

Fuusioproteiinien, joissa on cpIII-kalvo-ankkuridomeenit, ilmentämiseen tarkoitettu fagomidi-ilmentämisvektori rakennettiin samalla tavoin ligatoimalla suunnatusti Sac II:lla ja Apa I:lla restriktiodigeroitu fragmentti pCombIII:sta Sac II:lla ja Apa I:llä linearisoituun pCB-kloonausvektoriin.

2. Dikistronisten ilmentämisvektorien rakentelu anti-NPN-heterodimeerin ilmentämiseksi faagien pinnoilla

Sovellettaessa tätä keksintöä käytäntöön vasta-aineiden raskas (Fd, joka muodostui V_H:sta ja C_H1:stä) ja kevyt (kappa) ketju (V_L, C_L) kohdennettiin ensiksi E. colin periplasmaan heterodimeeristen Fab-molekyylien saamiseksi kokoontumaan. Vasta-aine-Fab-kirjastojen saamiseksi ilmentymään faagin pinnalla nukleotiditähdesekvenssit, jotka koodaavat Fd:tä tai kevyitä ketjuja, täytyy liittää operatiivisesti nukleotiditähdesekvenssiin, joka koodaa filamenttibakteriofaagin kuoriproteiinin kalvoankkuria. Kaksi suositeltavinta pintaproteiinia käytettäväksi tässä keksinnössä kalvoankkurin saamiseksi käyttöön ovat VIII ja III (cpVIII ja vastaavasti cpIII). Tässä kuvatuissa esimerkeissä kuvataan menetelmiä nukleotiditähdesekvenssin, joka koodaa Fd-ketjua, liittämiseksi operatiivisesti joko cpVIII- tai cpIII-kalvoankkuriin jossakin tämän keksinnön mukaisessa fuusioproteiinissa.

Fagomidivektorissa ensimmäinen ja toinen kistroni, jotka muodostuvat transloituvista DNA-sekvensseistä, liitetään operatiivisesti yhteen dikistronisen DNA-molekyylin muodostamiseksi. Kumpikin kistroni dikistronisessa DNA-molekyylissä liitetään DNA-ekspressiota säätteleviin sekvensseihin fuusioproteiinin Fd-cpVIII tai Fd-cpIII ja kappa-kevytketjun koordinoitua ekspressiota varten.

Ensimmäinen kistroni koodaa periplasman sekreetiosignaalia (pelB-johtaja), joka on operatiivisesti liitetty fuusioproteiiniin, joko Fd-cpVIII:aan tai Fd-cpIII:een. Toinen kistroni koodaa toista pelB-johtosekvenssiä, joka on operatiivisesti liitetty kappa-kevytketjuun. PelB-johtosekvenssin läsnäolo helpottaa molempien fuusioproteiinien ja kevyen ketjun koordinoitua, mutta erillistä sekretoitumista bakteerin sytoplasmasta periplasmatilaan.

Edellä kuvattu tapahtuma on esitetty kaavamaisesti kuviossa 8. Lyhyesti sanottuna fagomidi-ilmentämisvektori kuljettaa kloramfenikoliasetyylitransferaasin (CAT) perusteella valikoituvan resistenssimarkkerigeenin Fd-cpVIII-fuusioproteiinin ja kappaketjun lisäksi. Replikoinnin alkuperänä oleva f1-faagi helpottaa yksisäikeisen fagomidin muodostumista. Tiogalaktopyranosidin (IPTG) indusoiman dikistronisen

lähetin, joka koodaa Fd-cpVIII-fuusioproteiinia (V_H, C_{H1}, cpVIII) ja kevyttä ketjua (V_L, C_L), ilmentyminen johtaa raskaiden ja kevyiden ketjujen muodostumiseen. Kunkin ketjun ohjaa periplasmatilaan pelB-johtosekvenssi, joka sen jälkeen pilkotaan pois. Raskas ketju ankkuroituu kalvoon cpVIII-kalvoankkuridomeenin avulla, kun taas kevyt ketju sekretoituu periplasmaan. Raskas ketju kokoontuu kevyen ketjun läsnäollessa muodostaakseen Fab-molekyylejä. Samaan tulokseen päästään, jos vaihtoehtoisesti kevyt ketju ankkuroidaan kalvoon kevyen ketjun fuusioproteiinin, jossa on kalvoankkuri, kautta ja raskas ketju sekretoituu pelB-johtosekvenssin kautta periplasmaan.

Kun E. coli sitten infektoituu auttaja-faagilla filamenttibakteriofaagin kokoontumisen edetessä, kuoriproteiini VIII liittyy filamenttifaagipartikkeleiden koko pituudelle, kuten kuvioissa 8 ja 9 on osoitettu. Jos käytetään cpIII:a, kumuloituminen tapahtuu bakteriofaagin häntään. cpVIII:sta johdettujen kalvoankkureiden käytöstä saatava etu cpIII:sta johdettujen käyttöön verrattuna on kaksinkertainen. Ensiksikin partikkelin pinnalla on paljon sitomiskohtia, jotka muodostuvat suunnilleen 2700 cpVIII-monomeerista, jotka ovat kokoontuneet putkimaiseen järjestykseen. Toiseksi rakenne ei häiritse faagin infektiivisyyttä.

a. Polynukleotidin valitseminen

Nukleotidisekvenssit, jotka koodaavat immunoglobuliiniproteiinin CDR:iä, ovat erittäin variaabeleita. On kuitenkin useita säilyneiden sekvenssien alueita, jotka ovat esimerkiksi joko kevyen tai raskaan ketjun V-domeenien vieressä ja jotka sisältävät olennaisesti säilyneitä nukleotidisekvenssejä, so. sekvenssejä, jotka hybridisoituvat samaan alukesekvenssiin. Sen vuoksi rakennettiin polynukleotidisynteesin (monistumisen) alukkeita, jotka hybridisoituvat säilyneisiin sekvensseihin ja sisällyttävät tuotettuun DNA-homologiin restriktiokohtia, jotka soveltuvat syntetisoitujen DNA-fragmenttien liittämiseen operatiivisesti vektoriin. Tarkemmin sanottuna alukkeet rakennetaan siten, että tuotetut DNA-homologit voidaan insertoida tämän keksinnön mukaiseen ilmentämisvektoriin lukukehykseen, jossa on ylävirtaan transloituva DNA-sekvenssi sillä vektorialueella, joka sisältää suunnattuun liittämiseen tarkoitetut välineet.

(i) V_H-alukkeet

V_H-domeenien monistamiseksi rakennellaan alukkeita kohesiivisten päiden, jotka sopivat suunnattuun ligaatioon, viemiseksi fagomidi Hc2 ilmentämisvektorin uniikkeihin Xho I ja Spe I -kohtiin. Esimerkiksi 3'-aluke (aluke 12A taulukossa 5) raken-

nettiin komplementaariseksi mRNA:lle J_H-alueella. Kaikissa tapauksissa 5'-alukkeet (alukkeet 1-10, taulukko 5) valittiin komplementaarisiksi ensimmäisen säikeen cDNA:lle säilyneellä N-pään alueella (anti-sense-säie). Alunperin monistaminen suoritettiin 32 alukkeen, jotka olivat degeneroituneet viidestä asemasta, seoksella (aluke 1, taulukko 5). Hybridoma-mRNA voitaisiin monistaa seka-alukkeilla, mutta ensimmäiset yritykset monistaa mRNA:ta pernasta tuottivat vaihtelevia tuloksia. Sen vuoksi vertailtiin useita monistusvaihtoehtoja käyttäen seka-5'-alukkeita.

Ensimmäinen vaihtoehto oli rakentaa monia alukkeita, joista 8 on esitetty taulukossa 5 ja jotka vastaavat sekoitetun alukepoolin yksittäisiä jäseniä. Taulukon 5 yksittäiset alukkeet 2-9 rakennettiin sisällyttämällä toinen kahdesta mahdollisesta nukleotidista kolmeen viidestä degeneroituneesta asemasta.

Toinen vaihtoehto oli rakentaa aluke, joka sisältää inosiinia (aluke 10, taulukko 5) neljässä vaihtelevista asemista, perustuen julkistettuun työhön Takahashi ym., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:1931-1935 (1985) ja Ohtsuka ym., J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985). Tämän alukkeen etuna on, että se ei ole degeneroitunut ja samalla se minimoi ei-säilyneisiin asemiin epäsopivuuksien negatiiviset vaikutukset, kuten Martin ym. selostavat julkaisussa Nuc. Acids Res., 13:8927 (1985). Ei kuitenkaan tiedetty, seuraisiko inosiininukleotidien läsnäolosta ei-toivottujen sekvenssien sisältymistä kloonattuihin V_H-alueisiin. Sen vuoksi inosiinia ei sisällytetty yhteen asemaan, joka jää jäljelle monistettuihin fragmentteihin restriktiokohtien pilkkomisen jälkeen. Seurauksena oli, että inosiinia ei ollut kloonatussa insertissä.

Lisää V_H-monistusalukkeita, mukaanlukien uniikki 3'-aluke, rakenneltiin komplementaarisiksi osalle gamma 1 -raskasketjun mRNA:n ensimmäistä konstanttia domeenia (alukkeet 16 ja 17, taulukko 5). Nämä alukkeet tuottavat DNA-homologeja, jotka sisältävät polynukleotideja, jotka koodaavat V_H:n ja raskaan ketjun ensimmäisen konstantin alueen domeenien aminohappoja. Näitä DNA-homologeja voidaan sen vuoksi käyttää pikemminkin Fab-palasten kuin F_V-palasten tuottamiseen.

Vielä otetaan mahdollisina lukuun ainutlaatuisia 3'-alukkeita, jotka on rakennettu hybridisoitumaan jonkin toisen immunoglobuliiniluokan, kuten IgM:n, IgE:n ja IgA:n raskaan ketjun samanlaisiin alueisiin. Muitakin 3'-alukkeita, jotka hybridisoituvat CH_1-konstanstin alueen spesifisen luokan spesifiseen alueeseen ja jotka soveltuvat monistettujen V_H-domeenien siirtämiseen tätä aluketta käyttäen ilmentämis-

vektoriin, joka kykenee ilmentämään näitä V_H-domeeneja, joilla on eri luokan raskaan ketjun tai kevyen ketjun konstantti alue, otetaan mahdollisina lukuun.

Pernasta tai hybridoma-mRNA:sta monistamisen vertailuna rakennettiin sarja alukkeita, jotka hybridisoituvat erittäin säilyneeseen alueeseen IgG:n konstantin alueen raskaan ketjun geenissä. 5'-aluke (aluke 11, taulukko 5) on komplementaarinen cDNA:lle C_H2-alueella, kun taas 3'-aluke (aluke 13, taulukko 5) on komplementaarinen mRNA:lle C_H3-alueella. Uskotaan, että epäsopivuuksia ei ollut näiden alukkeiden ja niiden templaattien välillä.

Alukkeet, joita käytetään raskaan ketjun Fd-palasten monistamiseen Fab-palasten rakentamiseksi on esitetty ainakin taulukossa 5. Monistaminen suoritettiin kahdeksassa erillisessä reaktiossa, joista jokaiseen sisältyi yksi 5'-pään alukkeista (alukkeet 2-9) ja yksi 3'-pään alukkeista (aluke 16). Loput 5'-alukkeista, joita on käytetty monistamiseen yhdessä reaktiossa, ovat joko degeneroitunut aluke (aluke 1) tai aluke, joka sisältää inosiinia neljässä degeneroituneessa asemassa (aluke 10, taulukko 5, ja alukkeet 17 ja 18, taulukko 6). Jäljelle jäävää 3'-aluketta (aluke 14, taulukko 6) käytettiin F_v-palasten rakentamiseen. Monet 5'-alukkeista sisältävät Xho I -kohdan ja 3'-alukkeet sisältävät Spe I -restriktiokohdan V_H-DNA-homologin insertoimiseksi fagomidi-Hc2-ilmentämisvektoriin (kuvio 4).

V_H-monistusalukkeita, jotka on rakenneltu ihmisen raskaan ketjun variaabeleiden alueiden monistamiseen, on esitetty taulukossa 6. Yksi 5'-pään raskaan ketjun alukkeista sisältää inosiinitähteitä degeneroituneissa nukleotidiasemissa, jolloin yksi aluke pääsee hybridisoitumaan suureen määrään variaabelin alueen sekvenssejä. Alukkeita, jotka on rakenneltu hybridsoitumaan eri IgG-mRNA:iden konstantin alueen sekvensseihin, on myös esitetty taulukossa 6.

(ii) V_L-alukkeet

Nukleotidisekvenssit, jotka koodaavat V_L-CDR:iä, ovat kovin vaihtelevia. On kuitenkin useita säilyneiden sekvenssien alueita, jotka sijaitsevat V_L-CDR-domeenien vieressä, mukaanlukien J_L, V_L-kehysalueet ja V_L-johtosekvenssit/promoottorit. Sen vuoksi rakennettiin monistusalukkeita, jotka hybridisoituvat säilyneisiin sekvensseihin ja sisältävät restriktiokohtia, jotka mahdollistavat monistettujen fragmenttien kloonaamisen fagomidi Lc2-vektoriin, joka on pilkottu Sac I:llä tai Xba I:llä.

V_L-CDR-domeenien monistamiseksi rakenneltiin 5'-alukkeita (alukkeet 1-8 taulukossa 6) komplementaarisiksi ensimmäisen säikeen cDNA:lle säilyneellä N-pään alueella. Nämä alukkeet sisälsivät myös Sac I -restriktioendonukleaasikohdan,

joka salli V_L-DNA-homologin kloonaamisen fagomidi Lc2 ilmentämisvektoriin. 3'-V_L-monistusaluke (aluke 9 taulukossa 6) rakenneltiin komplementaariseksi mRNA:lle J_L-alueilla ja sisältämään Xba I -restriktioendonukleaasipaikan, joka tarvitaan V_L-DNA-homologin insertoimiseen fagomidi Lc2 ilmentämisvektoriin (kuvio 6).

Lisää 3'-V_L-monistusalukkeita rakenneltiin hybridisoitumaan joko kappa- tai lambda-mRNA:n konstanttiin alueeseen (alukkeet 10 ja 11 taulukossa 6). Nämä alukkeet antavat mahdollisuuden tuottaa DNA-homologi, joka sisältää polynukleotidisekvenssejä, jotka koodaavat joko kappa- tai lambdaketjun konstantin alueen aminohappoja. Nämä alukkeet tekevät mahdolliseksi tuottaa pikemminkin Fab-palanen kuin F_v.

Alukkeet, joita käytettiin kappa-kevytketjun sekvenssien monistukseen Fab-palasten rakentamiseksi, on esitetty ainakin taulukossa 6. Monistaminen näillä alukkeilla suoritettiin 5 erillisessä reaktiossa, joista jokaiseen sisältyi yksi 5'-aluke (alukkeet 3-6 ja 12) ja yksi 3'-alukkeista (aluke 13). Jäljelle jäävää 3'-aluketta (aluke 9) on käytetty F_V-palasten rakentamiseen. 5'-alukkeet sisältävät Sac I -restriktiokohdan ja 3'-alukkeet sisältävät Xba I -restriktiokohdan.

V_L-monistusalukkeita, jotka rakenneltiin ihmisen sekä lambda- että kappa-isotyyppiä olevien kevyen ketjun variaabelien alueiden monistamiseen, on myös esitetty taulukossa 6.

Kaikki tässä kuvatut alukkeet ja syntetisoidut polynukleotidit, mukaanlukien taulukoissa 3-7 esitetyt, joko ostettiin Research Genetics'iltä, Huntsville, Alabama, tai syntetisoitiin Applied Biosystems DNA-syntetisaattorilla, malli 381A, valmistajan ohjeita käyttäen.

Taulukko 5

(1) 5'AGGT(C/G)(C/A)A(G/A)CT(G/T)CTCGAGTC(T/A)GG 3'	degeneroitunut 5'-aluke hiiren ja ihmisen raskaan ketjun vaihtelevien alueiden (V_H) monistamiseen
(2) 5'AGGTCCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	uniikki 5'-aluke hiiren ja ihmisen V_H:n monistamiseen
(3) 5'AGGTCCAGCTGCTCGAGTCAGG 3'	"
(4) 5'AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG 3'	"
(5) 5'AGGTCCAGCTTCTCGAGTCAGG 3'	"
(6) 5'AGGTCCAACTGCTCGAGTCTGG 3'	"
(7) 5'AGGTCCAACTGCTCGAGTCAGG 3'	"
(8) 5'AGGTCCAACTTCTCGAGTCTGG 3'	"
(9) 5'AGGTCCAACTTCTCGAGTCAGG 3'	"
(10) 5'AGGTIIAICTICTCGAGTC(T/A)GG 3'	5'-pään degeneroitunut aluke, joka sisältää inosiinia 4 degeneroituneessa asemassa hiirenV_H:n monistamiseen
(11) 5'GCCCAAGGATGTGCTCACC 3'	5'-aluke monistamiseen hiiren IgG1:n C_H2-alueella
(12) 5'CTATTAGAATTCAACGGTAACAGTGGTGCCTTGGCCCCA 3'	3'-aluke V_H:n monistamiseen ja 3'-Eco RI-kohdan tuomiseen
(12A) 5'CTATTAACTAGTAACGGTAACAGTGGTGCCTTG CCCCA 3'	3'-aluke V_H:n monistamiseen käyttäen 3'-pään Spe I -kohtaa
(13) 5'CTCAGTATGGTGGTTGTGC 3'	3'-aluke monistamiseen hiiren IgG1:n C_H3-alueella
(14) 5'GCTACTAGTTTTGATTTCCACCTTGG 3'	3'-aluke hiiren kappa-kevytketjun vaihtelevien alueiden (V_L) monistamiseen
(15) 5'CAGCCATGGCCGACATCCAGATG 3'	5'-aluke hiiren kappa-kevytketjun vaihtelevien alueiden monistamiseen
(16) 5'AATTTTACTAGTCACCTTGGTGCTGCTGGC 3'	uniikki 3'-aluke V_H:n, joka sisältää osan hiiren gamma 1:n ensimmäisestä konstantista alueesta, monistamiseen
(17) 5'TATGCAACTAGTACAACCACAATCCCTGGGCACAATTTT 3'	uniikki 3'-aluke Fd:n, joka sisältää osan hiiren IgG1:n ensimmäisestä konstantista alueesta ja sarana-alueesta, monistamiseen
(18) 5'AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT 3'	3'-aluke hiiren Fd:n, joka sisältää osan hiiren IgG1:n ensimmäisestä konstantista alueesta ja osan sarana-alueesta, monistamiseen

Taulukko 6

(1) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT 3'	Uniikki 5'-aluke kappa-kevytketjun vaihtelevien alueiden monistamiseen
(2) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTGTTGACGCAGCCGCCC 3'	"
(3) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCA 3'	"
(4) 5' CCAGTTCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCCA 3'	"
(5) 5' CCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGACTCCA 3'	"
(6) 5' CCAGATGTGAGCTCGTCATGACCCAGTCTCCA 3'	"
(7) 5' CCAGATGTGAGCTCTTGATGACCCAAACTCAA 3'	"
(8) 5' CCAGATGTGAGCTCGTGATAACCCAGGATGAA 3'	"
(9) 5' GCAGCATTCTAGAGTTTCAGCTCCAGCTTGCC 3'	Uniikki 3'-aluke kappa-kevytketjun vaihtelevien alueiden monistamiseen
(10) 5' CCGCCGTCTAGAACACTCATTCCTGTTGAAGCT 3'	Uniikki 3'-aluke hiiren kappa-kevytketjun, joka sisältää konstantin alueen, monistamiseen
(11) 5' CCGCCGTCTAGAACATTCTGCAGGAGACAGACT 3'	Uniikki 3'-aluke hiiren lambda-kevytketjun, joka sisältää konstantin alueen, monistamiseen
(12) 5' CCAGTTCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA 3'	Uniikki 5'-aluke V_L:n monistamiseen
(13) 5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA 3'	Uniikki 3'-aluke kappa-kevytketjun monistamiseen
(14) 5' CTATTAACTAGTAACGGTAACAGTGGTGCCTTGCCCCA 3'	Uniikki 3'-aluke hiiren F_V:n monistamiseen
(15) 5' AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT 3'	Uniikki 3'-aluke hiiren IgG:n Fd:n monistamiseen
(16) 5' GCCGCTCTAGAACACTCATTCCTGTTGAA 3'	Uniikki 3'-aluke hiiren kappa-kevytketjun monistamiseen
(17) 5' AGGTIIAICTICTCGAGTCTGC 3'	Degeneroitunut 5'-aluke, joka sisältää inosiinia 4 degeneroituneessa asemassa, hiiren V_H:n monistamiseen
(18) 5' AGGTIIAICTICTCGAGTCAGC 3'	"
(19) 5' GTGCCAGATGTGAGCTCGTGATGACCCAGTCTCCA 3'	Uniikki 5'-aluke ihmisen ja hiiren kappa V_L:n monistamiseen
(20) 5' TCCTTCTAGATTACTAACACTCTCCCCTGTTGAA 3'	Uniikki 3'-aluke kappa-V_L:n monistamiseen
(21) 5' GCATTCTAGACTATTATGAACATTCTGTAGGGGC 3'	Uniikki 3'-aluke ihmisen, hiiren ja kaniinin lambda-V_L:n monistamiseen
(22) 5' CTGCACAGGGTCCTGGGCCGAGCTCGTGGTGACTCAG 3'	Uniikki 5'-aluke ihmisen lambda V_L:n monistamiseen
(23) 5' AGITGCAIITGCTCGAGTCTGG 3'	5'-pään degeneroitunut aluke, joka sisältää inosiinia 3 degeneroituneessa asemassa, ihmisen V_H:n monistamiseen
(24) 5' GTGGGCATGTGTGAGTTGTGTCACTAGTTGGGGTTTTGAGCTC 3'	Uniikki 3'-aluke ihmisen V_H:n monistamiseen
(25) 5' AGCATCACTAGTACAAGATTTGGGCTC 3'	Uniikki 3'-aluke ihmisen IgG1-Fd:n monistamiseen
(26) 5' AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG 3'	Uniikki 5'-aluke ihmisen vaihtelevien alueiden (V_H) monistamiseen
(27) 5' AGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG 3'	"

Taulukko 6 - jatkosivu 1

(28) 5' AGGTGCAACTGCTCGAGTCTGG 3'	"
(29) 5' AGGTGCAACTGCTCGAGTCGGG 3'	"
(30) 5' TCCTTCTAGATTACTAACACTCTCCCCTGTTGAA 3'	3'-aluke ihmisen kappa-kevytketjun konstantilla alueella
(31) 5' CTGCACAGGGTCCTGGGCCGAGCTCGTGGTGACTCAG 3'	5'-aluke ihmisen lambda-kevytketjun vaihtelevien alueiden monistamiseen
(32) 5' GCATTCTAGACTATTAACATTCTGTAGGGGC 3'	3'-aluke ihmisen lambda-kevytketjun konstantilla alueella
(33) 5' ACCCAAGGACACCCTCATG 3'	Vertailualuke, joka hybridisoituu ihmisen CH_2-alueeseen
(34) 5' CTCAGTATGGTGGTTGTGC 3'	Vertailualuke, joka hybridisoituu ihmisen CH_3-alueeseen
(35) 5' GTCTCACTAGTCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC 3'	5'-aluke ihmisen IgG:n raskaan ketjun ensimmäisen konstantin alueen monistamiseen
(36) 5' ATATACTAGTGAGACAGTGACCAGGGTTCCTTGGCCCCA 3'	3'-aluke ihmisen raskaan ketjun vaihtelevien alueiden monistamiseen
(37) 5' ACGTCTAGATTCCACCTTGGTCCC 3'	3'-aluke ihmisen kappaketvytketjun vaihtelevien alueiden monistamiseen
(38) 5' GCATACTAGTCTATTAACATTCTGTAGGGGC 3'	5'-aluke ihmisen kappa-kevytketjun konstantin alueen monistamiseen
(39) 5' CCGGAATTCTTATCATTTACCCGGAGA 3'	3'-aluke, joka sijaitsee ihmisen IgG1:n CH3-alueella, koko raskaan ketjun monistamiseen
(40) 5' TCTGCACTAGTTGGAATGGGCACATGCAG 3'	3'-aluke hiiren IgM:n Fd-alueen monistamiseen

Taulukossa 5 luetellut 19 aluketta on listattu sekvenssiluetteloon ja niille on annettu seuraavat SEQ ID numerot:

(1) = SEQ ID NO 40
(2) = SEQ ID NO 41
(3) = SEQ ID NO 42
(4) = SEQ ID NO 43
(5) = SEQ ID NO 44
(6) = SEQ ID NO 45
(7) = SEQ ID NO 46
(8) = SEQ ID NO 47
(9) = SEQ ID NO 48
(10) = SEQ ID NO 49
(11) = SEQ ID NO 50
(12) = SEQ ID NO 51
(12A)= SEQ ID NO 52
(13) = SEQ ID NO 53
(14) = SEQ ID NO 54
(15) = SEQ ID NO 55
(16) = SEQ ID NO 56
(17) = SEQ ID NO 57
(18) = SEQ ID NO 58

40 aluketta, jotka on lueteltu numeroilla (1)-(40) taulukossa 6, on myös yksittäisesti ja peräkkäin listattu sekvenssiluetteloon alkaen SEQ ID NO 59:stä ja jatkuen SEQ ID NO 98:aan, vastaavasti.

b. Immunoglobuliinin vaihtelevaa aluetta koodaavien geenivalikoimien valmistaminen

Nitrofenyylifosfonamidaatti (NPN) valittiin ligandiksi reseptoriin sitoutumista varten valmistettaessa heterodimeeristä reseptoria keksinnön mukaisilla menetelmillä.

Avaimenreikäsimpukan hemosyaniinia (KHL) konjugoitiin NPN:ään NPN-KHL-konjugaatin muodostamiseksi, jota käytettin hiiren immunisointiin anti-NPN-immuunivasteen aikaansaamiseksi ja siten heterodimeerisille reseptorigeeneille spesifisen ligandilähteen saamiseksi käyttöön.

NPN-KHL-konjugaatti valmistettiin sekoittamalla 250 µl liuosta, joka sisälsi 2,5 mg NPN dimetyyliformamidissa, 750 µl:aan liuosta, joka sisälsi 2 mg KLH:ta 0,01

molaarisessa (M) natriumfosfaattipuskurissa (pH 7,2). Nämä kaksi liuosta sekoitettiin lisäämällä hitaasti NPN-liuos KLH-liuokseen samalla kun KLH-liuosta sekoitettiin pyörivällä sekoitustangolla. Sen jälkeen seosta pidettiin 4 °C:ssa 1 tunti sekoittaen samalla tavoin, jotta konjugoituminen pääsi etenemään. Konjugoitu NPN-KLH eristettiin konjugoitumattomasta NPN:stä ja KLH:sta geelisuodatuksella Sephadex G-25:n läpi. Eristetty NPN-KLH-konjugaatti injisoitiin hiiriin kuten tuonnempana kuvataan.

NPN-KLH-konjugaatti valmistettiin hiiriin injisointia varten lisäämällä 100 µg konjugaattia 250 µl:aan fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS). Sama tilavuusmäärä täydellistä Freundin adjuvanttia lisättiin ja se emulgoi koko liuoksen 5 minuutissa. 129 G_{1X+}-hiiri injisoitiin 300 µl:lla emulsiota. Injektiot annettiin ihon alle useisiin kohtiin käyttäen kokoa 21 olevaa neulaa. Toinen immunisointi NPN-KLH:lla annettiin kaksi viikkoa myöhemmin. Tämä injektio valmistettiin seuraavasti: 50 mikrogrammaa (µg) NPN-KLH:ta laimennettiin 250 µl:aan PBS:ää ja sama tilavuusmäärä alunaa sekoitettiin NPN-KLH-liuokseen. Hiiri injisoitiin intraperitoneaalisesti 500 µl:lla liuosta käyttäen neulakokoa 23. Kuukautta myöhemmin hiiret injisoitiin viimeisen kerran 50 µl:lla NPN-KLH-konjugaattia laimennettuna 200 µl:aan PBS:ää. Tämä injektio annettiin intravenöösisti kyljen häntälaskimoon käyttäen neulakokoa 30. Viiden päivän kuluttua tästä viimeisestä injektiosta hiiret tapettiin ja kokonaissolu-RNA eristettiin niiden pernasta.

Kokonaissolu-RNA valmistettiin yhden edellä kuvatulla tavalla NPN-KLH:lla immunisoidun hiiren pernasta käyttäen RNA:n valmistusmenetelmiä, joita kuvaavat Chomczynski ym., Anal. Biochem., 162:156-159 (1987) ja käyttäen RNA-eristysreagenssipakkausta (Stratagene) valmistajan ohjeiden mukaan. Lyhyesti sanottuna heti sen jälkeen kun perna oli otettu immunisoidusta hiirestä, kudos homogenisoitiin 10 ml:ssa denaturointiliuosta, joka sisälsi 4,0 M guaniini-isotiosyanaattia, 0,25 M natriumsitraattia pH:ssa 7,0 ja 0,1 M beeta-merkaptoetanolia, käyttäen lasista homogenisaattoria. 1 ml natriumasetaattia, jonka konsentraatio oli 2 M ja pH 4,0, lisättiin homogenisoituun pernaan. 1 ml fenolia, joka oli oli aikaisemmin kyllästetty H_2O:lla, sekoitettiin myös denaturointiliuokseen, joka sisälsi homogenisoidun pernan. 2 ml kloroformi:isoamyyli-alkoholiseosta (24:1 til./til.) lisättiin tähän homogenaattiin. Homogenaattia sekoitettiin voimakkaasti 10 sekuntia ja sitä pidettiin jään päällä 15 minuuttia. Sitten homogenaatti siirrettiin paksuseinäiseen 50 ml:n polypropeenia olevaan sentrifugiputkeen (Fisher Scientific Company, Pittsburg, PA). Liuosta sentrifugoitiin keskipakoisvoimalla 10 000 x g 20 minuuttia 4 °C:ssa. Ylempi RNA:n sisältävä vesiker-

ros siirrettiin tuoreeseen 50 ml:n polypropeenisentrifugiputkeen ja sekoitettiin samaan tilavuusmäärään isopropyylialkoholia. Tätä liuosta pidettiin -20 °C:ssa vähintään tunnin ajan RNA:n saostamiseksi. Liuosta, joka sisälsi saostuneen RNA:n, sentrifugoitiin keskipakoisvoimalla 10 000 x g 20 minuuttia 4 °C:ssa. Pelletoitu kokonaissolu-RNA otettiin talteen ja liuotettiin 3 ml:aan edellä kuvattua denaturointiliuosta. 3 ml isopropyylialkoholia lisättiin uudelleen lietettyyn kokonaissolu-RNA:han ja sekoitettiin voimakkaasti. Tätä liuosta pidettiin -20 °C:ssa vähintään 1 tunnin ajan RNA:n saostamiseksi. Liuosta, joka sisälsi saostuneen RNA:n, sentrifugoitiin keskipakoisvoimalla 10 000 x g 10 minuuttia 4 °C:ssa. Pelletoitu RNA pestiin kerran liuoksella, joka sisälsi 75 % etanolia. Pelletoitua RNA:ta kuivattiin vakuumissa 15 minuuttia ja sitten se lietettiin uudelleen dimetyylipyrokarbonaattiin (DEPC), joka oli käsitelty H_2O:lla (DEPC-H_2O).

Lähetti-RNA (mRNA), joka oli rikastettu sekvensseillä, jotka sisälsivät pitkiä poly A pätkiä, valmistettiin kokonaissolu-RNA:sta käyttäen menetelmiä, joita kuvataan julkaisussa Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis ym., toim., Cold Spring Harbor, NY, (1982). Lyhyesti sanoen puolet yhdestä immunisoidun hiiren pernasta eristetystä kokonais-RNA:sta, joka valmistettiin edellä kuvatulla tavalla, lietettiin uudelleen 1 ml:aan DEPC-H_2O:ta ja sitä pidettiin 65 °C:ssa 5 minuuttia. 1 ml x 2 erittäin suolapitoista puskuria, joka muodostui 100 mM:sta Tris-HCl (Tris[hydroksimetyyli]aminometaanihydrokloridia), 1 M:sta natriumkloridia (NaCl), 2,0 mM:sta dinatriumeteenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA) pH:ssa 7,5 ja 0,2 % natriumdodekyylisulfaattia (SDS) lisättiin uudelleen lietettyyn RNA:han ja seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan. Seosta käytettiin sitten oligo-dT-pylväässä (Collaborative Research Type 2 tai Type 3), joka oli aikaisemmin valmisteltu pesemällä oligo-dT liuoksella, joka sisälsi 0,1 M natriumhydroksidia ja 5 mM EDTA ja sitten tasapainottamalla pylväs DEPC-H_2O:lla. Eluaatti koottiin steriiliin polypropeeniputkeen ja käytettiin uudelleen samassa pylväässä, kun eluaattia oli kuumennettu 5 minuuttia 65 °C:ssa. Oligo-dT-pylväs pestiin sitten 2 ml:lla erittäin suolaista puskuria, joka muodostui 50 mM:sta Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM:sta natriumkloridia, 1 mM:sta EDTA pH:ssa 7,5 ja 0,1 % SDS. Oligo-dT-pylväs pestiin sitten 2 ml:lla 1 x keskisuolaista puskuria, joka muodostui 50 mM:sta Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM:sta EDTA ja 0,1 % SDS. Lähetti-RNA eluoitiin oligo-dT-pylväästä 1 ml:lla puskuria, joka muodostui 10 mM:sta Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM:sta EDTA, pH:ssa 7,5, ja 0,05 % SDS. Lähetti-RNA puhdistettiin uuttamalla tämä liuos fenoli/kloroformilla ja sen jälkeen yhdesti uuttamalla 100 %-prosenttisella kloroformilla. Lähetti-RNA konsentroitiin etanolisaostuksella ja lietettiin uudelleen DEPC-H_2O:hon.

Edellä kuvatulla menetelmällä eristetty lähetti-RNA (mRNA) sisältää paljon erilaisia V_H-koodaavia polynukleotideja, so. enemmän kuin noin 10^4 erilaista V_H-koodaavaa geeniä, ja se sisältää samanlaisen määrän V_L-koodaavia geenejä. Siten mRNA-populaatio edustaa vaihtelevaa aluetta koodaavien geenien valikoimaa.

c. DNA-homologien valmistaminen

PCR-monistusta valmisteltaessa edellä valmistettua mRNA:ta käytetään templaattina syntetisoitaessa cDNA:ta alukkeen avulla tapahtuvalla pidennysreaktiolla. Tyypillisessä 50 µl:n transskriptioreaktiossa hybridisoidaan (paahdetaan) ensiksi 5-10 µg perna-mRNA:ta vedessä 500 ng:aan (50,0 pmol) 3'-V_H-aluketta (aluke 12A, taulukko 5) 65 °C:ssa 5 minuuttia. Sen jälkeen seos säädetään sisältämään 1,5 mM dATP, dCTP, dGTP ja dTTP, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl ja 2 mM spermidiiniä. Moloney-Murine Leukemia virus -käänteistransskriptaasia (Stratagene), 26 yksikköä, lisätään ja liuosta pidetään 1 tunti 37 °C:ssa.

PCR-monistaminen suoritetaan 100 µl:n reaktiossa, joka sisältää käänteistransskriptaasireaktiotuotteet (noin 5 µg cDNA/RNA-hybridiä), 300 ng 3'-V_H-aluketta (aluke 12A, taulukko 5), 300 ng kutakin 5'-V_H-alukkeista (alukkeet 2-10 taulukossa 5), 200 mM dNTP-seosta, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Hcl, pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$, 0,1 % gelatiinia ja 2 yksikköä Thermus aquaticus (Taq) DNA-polymeraasia (Perkin-Elmer-Cetus, Emeryville, Kalifornia). Reaktioseoksen päälle kaadetaan mineraaliöljyä ja sille suoritetaan 40 monistusjaksoa. Kukin monistusjakso sisältää 1 minuutin pituisen denaturoinnin 92 °C:ssa, 2 minuutin paahtamisen 52 °C:ssa ja polynukleotidisynteesin aluke-ekstensiolla (pidentämällä) 1,5 minuutin ajan 72 °C:ssa. Monistettu V_H-koodaava DNA-homologi, joka sisältää näytteet, uutetaan sitten kahdesti fenoli/kloroformilla, kerran kloroformilla, saostetaan etanolilla ja varastoidaan -70 °C:ssa 10 mM Tris-HCl:ssä, pH 7,5, ja 1 mM EDTA:ssa.

Käyttämällä uniikkeja 5'-alukkeita (2-9, taulukko 5) saadaan aikaan tehokas V_H-koodaavien DNA-homologien synteesi ja monistus perna-mRNA:sta, kuten osoittaa agaroosigeelielektroforeesi. Monistettu cDNA (V_H-koodaava DNA-homologi) nähtiin suurimpana, odotetun kokoisena (360 emäsparia) nauhana. Monistetun V_H-koodaavan polynukleotidifragmentin määrä on jokaisessa reaktiossa samanlainen, mikä osoittaa, että kaikki nämä alukkeet olivat suunnilleen yhtä tehokkaita monistuksen aloituksessa. Monistuksen saanto ja laatu näillä alukkeilla on toistettavissa.

Aluke, joka sisältää inosiinia, syntetisoi myös toistettavasti monistettuja V_H-koodaavia DNA-homologeja perna-mRNA:sta johtaen odotetun kokoisen fragmentin tuottamiseen intensiteetillä, joka on samanalainen kuin muiden monistettujen cDNA:itten. Inosiinin läsnäolo antaa myös mahdollisuuden tehokkaaseen DNA-homologien synteesiin ja monistukseen, mikä selvästi osoittaa, että tällaiset alukkeet ovat käyttökelpoisia luotaessa paljon V_H-koodaavia DNA-homologeja. Monistustuotteet, jotka saadaan konstantin alueen alukkeista (alukkeet 11 ja 13, taulukko 5), ovat voimakkaampia, mikä osoittaa, että monistuminen on tehokkaampaa, mahdollisesti templaatin ja alukkeiden välisen korkeamman homologisuusasteen vuoksi. Edellä esitettyjä menettelytapoja noudattaen rakennetaan V_H-koodaava geenikirjasto kahdeksan monistuksen, joista kukin suoritettiin eri 5'-alukkeella, tuotteista. Yhtä suuret osat kustakin alukepidennysreaktiosta saadusta tuotteesta sekoitetaan ja sekoitettua tuotetta käytetään sitten V_H-koodaavien DNA-homologeja sisältävien vektoreiden kirjaston kehittämiseen.

V_L-alueen DNA-homologit valmistetaan myös puhdistetusta mRNA:sta, joka valmistettiin edellä kuvatulla tavalla. PCR-monistukseen valmistauduttaessa käytetään edellä olevien esimerkkien mukaisesti valmistettua mRNA:ta templaattina cDNA-synteesissä. Tyypillisessä 50 µl:n transskriptioreaktiossa hybridisoidaan ensiksi 5-10 µg perna-mRNA:ta vedessä 300 ng:aan (50,0 pmol) 3'-V_L-aluketta (aluke 14, taulukko 5) 65 °C:ssa 5 minuuttia. Sen jälkeen seos säädetään sisältämään 1,5 mM dATP, dCTP, dGTP ja dTTP, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl ja 2 mM spermidiiniä. Moloney-Murine Leukemia virus -käänteistransskriptaasia (Stratagene), 26 yksikköä, lisätään ja liuosta pidetään 1 tunti 37 °C:ssa. PCR-monistaminen suoritetaan 100 µl:n reaktiossa, joka sisältää noin 5 µg edellä kuvatulla tavalla valmistettua cDNA/RNA-hybridiä, 300 ng 3'-V_L-aluketta (aluke 14, taulukko 5), 300 ng 5'-V_L-aluketta (aluke 16 taulukossa 5), 200 mM dNTP-seosta, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Hcl, pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$, 0,1 % gelatiinia ja 2 yksikköä Taq-DNA-polymeraasia. Reaktioseoksen päälle kaadetaan mineraaliöljyä ja sille suoritetaan 40 monistusjaksoa. Kukin monistusjakso sisältää 1 minuutin pituisen denaturoinnin 92 °C:ssa, 2 minuutin paahtamisen 52 °C:ssa ja pidennyksen 1,5 minuutin ajan 72 °C:ssa. Monistetut näytteet uutetaan sitten kahdesti fenoli/kloroformilla, kerran kloroformilla, saostetaan etanolilla ja varastoidaan -70 °C:ssa 10 mM:ssa Tris-HCl, pH 7,5, ja 1 mM:ssa EDTA.

d. DNA-homologien insertoiminen DNA-ilmentämisvektoriin

V_H-Sekvensseillä rikastetun ilmentämiskirjaston valmistamiseksi valmistetaan V_H-sekvensseillä rikastettuja DNA-homologeja esimerkin 2c mukaisesti käyttäen

samaa sarjaa 5'-alukkeita, mutta aluketta 12A (taulukko 5) 3'-alukkeena. Saatuja PCR-monistettuja tuotteita (2,5 µg/30 µl 150 mM NaCl, 8 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM $MgSO_4$, 1 mM DTT, 200 µg/ml BSA) pilkotaan 37 °C:ssa restriktioentsyymeillä Xho I (125 yksikköä) ja Spe I (125 yksikköä). Kloonauskokeissa, jossa tarvitaan monistusreaktiotuotteiden seos, yhdistetään samanlaiset tilavuusmäärät (50 µl, 1-10 µg konsentraatio) kutakin reaktioseosta monistuksen jälkeen, mutta ennen restriktiodigerointia. V_H-homologit puhdistetaan 1 % agaroosigeelillä käyttäen standardielektroeluutiotekniikkaa, jota kuvataan julkaisussa Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Maniatis ym., toim., Cold Spring Harbor, NY (1982). Pilkotun PCR-monistetun perna-mRNA:n geelielektroforeesin jälkeen geelin se alue, joka sisältää suunnilleen 350 bp DNA-fragmentit, katkaistaan, elektroeluoidaan dialyysimembraaniin, saostetaan etanolilla ja resuspendoidaan TE-liuokseen, joka sisältää 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, ja 1 mM EDTA lopulliseen konsentraatioon 50 ng/µl. Saadut V_H-DNA-homologit edustavat polypeptidigeenien, joilla on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligatoimiseen vektoriin Lambda Hc2, kirjastoa. Nämä valmistetut V_H-DNA-homologit insertoidaan sitten suoraan suunnatun ligaation avulla linearisoituun Lambda Hc2 ilmentämisvektoriin, joka on valmistettu alla kuvatulla tavalla.

DNA-homologin insertoimiseen tarkoitettu Lambda Hc2 ilmentämis-DNA-vektori valmistetaan sekoittamalla 100 µg tätä DNA:ta liuokseen, joka sisältää 250 yksikköä kumpaakin restriktioendonukleaasia Xho I ja Spe I (molemmat Boehringer Mannheim'ilta, Indianapolis, IN) ja valmistajan suosittelemaa puskuria. Tätä liuosta pidetään 37 °C:ssa 1,5 tuntia. Liuosta kuumennetaan 65 °C:ssa 15 minuuttia resktriktioendonukleaasien inaktivoimiseksi. Liuos jäähdytetään 30 °C:seen ja 25 yksikköä lämmöllä tapettavaa (HK) fosfataasia (Epicenter, Madison, WI) ja $CaCl_2$ sekoitetaan siihen valmistajan ohjeiden mukaisesti. Tätä liuosta pidetään 30 °C:ssa 1 tunti. DNA puhdistetaan uuttamalla liuos fenolin ja kloroformin seoksella ja sen jälkeen saostamalla etanolilla. Lambda Hc2 ilmentämisvektori on nyt valmis ligatoitavaksi edellä olevissa esimerkeissä valmistettuihin V_H-DNA-homologeihin. Nämä valmistetut V_H-DNA-homologit insertoidaan sitten suoraan Xho I ja Spe I restriktioentsyymeillä digeroituun lambda Hc2 -ilmentämisvektoriin, joka valmistettiin edellä, ligatoimalla 3 moolia V_H-DNA-homologi-inserttejä kunkin moolin kanssa Hc2 -ilmentämisvektoria yön yli 5 °C:ssa. Noin 3,0 x 10^5 plakkia muodostavaa yksikköä saadaan, kun DNA on pakattu Gigapack II Goldia (Stratagene) käyttäen, josta 50 % on rekombinantteja. Ligaatioseos, joka sisältää V_H-DNA-homologit, pakataan valmistajan ohjeita noudattaen käyttäen Gigapack Gold

II Packing Extractia (Stratagene). Saadut Lambda Hc2 -ilmentämiskirjastot muutetaan sitten XL1-Blue -soluiksi.

V_L-Sekvensseillä rikastetun kirjaston valmistamiseksi V_L-sekvensseillä rikastettuja PCR-monistettuja tuotteita valmistetaan esimerkin 2c mukaisesti. Nämä V_L-DNA-homologit pilkotaan restriktioentsyymeillä Spe I ja Xba I ja pilkotut V_L-DNA-homologit puhdistetaan 1 % agaroosigeelillä, kuten edellä kuvattiin V_H-DNA-homologien yhteydessä, V_L-polypeptidigeenien, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon, valikoiman muodostamiseksi. Valmistetut V_L-DNA-homologit ligatoidaan sitten suunnatusti Lambda Lc2 ilmentämisvektoriin, joka on etukäteen pilkottu restriktioentsyymeillä Sac I ja Xba I, kuten kuvattiin Lambda Hc2:n yhteydessä. Ligaatioseos, joka sisältää V_L-DNA-homologit, pakataan Lambda Lc2 -ilmentämiskirjaston muodostamiseksi, kuten edellä kuvattiin, ja se on valmis levitettäväksi XL1-Blue -soluille.

e. V_H- ja V_L-DNA-homologien yhdistäminen sattumanvaraisesti samaan ilmentämisvektoriin

Kirjaston, joka sisältää vektoreita kahden raskaita ja kevyitä ketjuja ilmentävän kistronin ilmentämiseksi, rakentaminen suoritetaan kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa rakennetaan erilliset raskaan ja kevyen ketjun kirjastot ilmentämisvektoreihin Lambda Hc2 ja Lambda Lc2, vastaavasti, kuten kuvattiin, käyttäen geenivalikoimaa, jotka on saatu NPN-KLH:lla immunisoidusta hiirestä. Toisessa vaiheessa nämä kaksi kirjastoa yhdistetään antisymmetrisistä EcoR I -kohdista, jollainen on kussakin vektorissa. Tuloksena on kirjasto, jonka klooneista jokainen potentiaalisesti koekspressoi raskasta ja kevyttä ketjua. Todelliset yhdistelmät ovat sattumanvaraisia eivätkä välttämättä heijasta kantaeläimessä olevassa B-solupopulaatiossa olevia yhdistelmiä.

Edellä (esimerkki 2b) kuvatuista immunisoinneista saatu perna-mRNA eristetään ja sitä käytetään V_H-geenisekvenssien primaarisen kirjaston luomiseen käyttäen Lambda Hc2 -ilmentämisvektoria. Primaarikirjasto sisältää 1,3 x 10^6 plakkia muodostavaa yksikköä (pfu) ja se voidaan seuloa dekapeptidi tag'in ilmentämiseksi V_H- ja C_H1- (Fd)-sekvenssejä ilmentävien kloonien prosenttimäärän määrittämiseksi. Tätä peptidiä määrittävä sekvenssi on kehyksessä vain ilmentämistä varten Fd (tai V_H) -fragmentin vektoriin kloonauksen jälkeen. Vähintään 80 % kirjastossa olevista klooneista ilmentää Fd-fragmentteja dekapeptidi tag'in immunodetektion perusteella.

Kevyen ketjun kirjasto muodostetaan samalla tavalla kuin raskaan ketjun kirjasto ja se sisältää 2,5 x 10^6 jäsentä. Plakin seulonta käyttäen anti-kappaketjun vasta-ainetta osoittaa, että 60 % kirjaston jäsenistä ilmentää kevyen ketjun inserttejä. Inserttien pieni prosentuaalinen osuus on tulosta vektorin epätäydellisestä defosforyloitumisesta entsyymeillä Sac I ja Xba I pilkkomisen jälkeen.

Kun nämä kaksi kirjastoa on saatu valmiiksi, niitä käytetään yhdistelmäkirjaston rakentamiseen ristiliittämällä ne EcoR I -kohdasta. Ristiliittämisen toteuttamiseksi DNA puhdistetaan ensiksi kummastakin kirjastosta.

Esimerkissä 2d valmistettu Lambda Lc2 -kirjasto monistetaan ja 500 µg Lambda Lc2 -ilmentämiskirjaston faagi DNA:ta valmistetaan monistetusta faagivarastosta käyttäen menettelytapoja, joita kuvataan julkaisussa Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis ym., toim., Cold Spring Harbor, NY (1982). 50 µg tätä monistettua ilmentämiskirjaston faagi-DNA:ta pidetään liuoksessa, joka sisältää 100 yksikköä MLu I -restriktioendonukleaasia (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 200 µl:ssa puskuria, jonka oli toimttanut endonukleaasin valmistaja, 1,5 tuntia 37 °C:ssa. Sitten liuos uutetaan fenolin ja kloroformin seoksella. Sen jälkeen DNA saostetaan etanolilla ja resuspendoidaan 100 µl:aan vettä. Tähän liuokseen sekoitetaan 100 yksikköä restriktioendonukleaasia EcoR I (Boehringer) lopulliseen tilavuuteen 200 µl puskuria, joka sisältää valmistajan mainitsemat komponentit. Tätä liuosta pidetään 37 °C:ssa 1 tunti ja sitten liuos uutetaan fenolin ja kloroformin seoksella. DNA saostetaan etanolilla ja resuspendoidaan TE:hen.

Esimerkissä 2d valmistettu Lambda Hc2 -ilmentämiskirjasto monistetaan ja 500 µg Lambda Hc2 -ilmentämiskirjaston faagi-DNA:ta valmistetaan käyttäen edellä yksityskohtaisesti kuvattuja menetelmiä. 50 µg tätä monistettua kirjaston faagi-DNA:ta pidetään liuoksessa, joka sisältää 100 yksikköä Hind III -restriktioendonukleaasia (Boehringer) 200 µl:ssa endonukleaasin valmistajan toimittamaa puskuria, 1,5 tuntia 37 °C:ssa. Sitten liuos uutetaan fenolin ja kloroformin seoksella, joka on kyllästetty 0,1 M Tris-HCl:llä, pH 7,5. Sitten DNA saostetaan etanolilla ja resuspendoidaan 100 µl:aan vettä. Tämä seos sekoitetaan 100 yksikköön re-striktioendonukleaasia EcoR I (Boehringer) lopullisessa tilavuudessa 200 µl puskuria, joka sisältää valmistajan mainitsemat komponentit. Tätä liuosta pidetään 37 °C:ssa 1,5 tuntia ja sitten liuos uutetaan fenolin ja kloroformin seoksella. DNA saostetaan etanolilla ja DNA resuspendoidaan TE:hen.

Restriktiodigeroidut Hc2 ja Lc2 -ilmentämiskirjastot ligatoidaan yhteen. Tätä tarkoitusta varten DNA-seos, joka sisältää 1 µg Hc2- ja 1 µg Lc2-faagikirjaston DNA:ta,

valmistetaan 10 µl:n reaktiossa käyttäen ligaatioreagenssipakkauksessa (Stratagene) toimitettuja reagensseja. DNA-seos lämmitetään 45 °C:seen 4 minuutiksi mahdollisten kohesiivisten päiden, jotka ovat saattaneet hajota uudelleen, sulattamiseksi. Sitten seos jäähdytetään 0 °C:seen sidoksen irtoamisen estämiseksi. Bakteriofaagi-T4 DNA-ligaasia (0,1 Weissin yksikköä, joka vastaa 0,02 yksikköä eksonukleaasiresistenssikokeella määritettynä) lisätään jäähdytettyyn DNA-liuokseen yhdessä 1 µl:n kanssa 5 mM ATP:tä ja 1 µl 10X bakteriofaagi-T4 DNA -ligaasipuskuria (10X puskuri valmistetaan sekoittamalla 200 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT ja 500 µg/ml BSA) ligaatioseoksen muodostamiseksi. 16 tunnin pituisen 4 °C:ssa suoritetun ligatoinnin jälkeen 1 µl ligatoitua faagi-DNA:-ta pakataan Gigapack Gold II -pakkausuutetta käyttäen ja levitetään XL1-Blue -soluille, jotka on valmistettu valmistajan ohjeiden mukaisesti Lambda -faagikirjaston muodostamiseen, joka sisältää dikistronisia ilmentämisvektoreita, jotka pystyvät ilmentämään raskaita ja kevyitä ketjuja, jotka on johdettu NPN-immunisoidusta hiirestä. Osa saaduista klooneista käytetään yhdistelmän tehokkuuden määrittämiseen.

f. Anti-NPN reaktiivista heterodimeeriä tuottavien dikistronisten vektoreiden valikointi

Edellä esimerkissä 2a valmistettu yhdistetty Fab-ilmentämiskirjasto seulottiin kloonien, joilla on affiniteettia NPN:ään, identifoimiseksi. Faagikloonien, jotka koekspressoivat kevyen ja raskaan ketjun fragmentteja, frekvenssin määrittämiseksi, kaksoisottoja kevyen ketjun kirjastosta, raskaan ketjun kirjastosta ja yhdistelmäkirjastosta seulottiin kuten edellä kevyen ketjun ja raskaan ketjun ekspression yhteydessä kuvattiin. Tässä analyysissä noin 500 yhdistelmäfaagia, likimain 60 %, koekspressoi kevyen ketjun ja raskaan ketjun proteiineja.

Kaikki kolme kirjastoa, kevyen ketjun, raskaan ketjun ja yhdistelmäkirjasto seulottiin sen määrittämiseksi, sisälsivätkö ne yhdistelmäfaagia, joka ilmentää vasta-ainefragmentteja, jotka ovat sitoutuneet NPN:ään. Tyypillisessä menettelytavassa 30 000 faagia levitettiin XL1-Blue -soluille ja kaksoisnäytteitä nitroselluloosa-alustalla seulottiin ^{125}I-leimattuun BSA:han kytkettyyn NPN:ään sitoutumisen selvillesaamiseksi. BSA joditettiin Chloramine-T -menetelmää käyttäen, jota kuvaavat Bolton ym., Biochem., 133:529-534 (1973). Kevyen ketjun kirjastosta peräisin olevan 80 000 yhdistelmäfaagin ja saman määrän raskaan ketjun kirjastosta peräisin olevan faagin kaksoisseulonta ei identifioinut klooneja, jotka sitoutuvat antigeeniin. Sitä vastoin saman määrän Fab-ilmentämiskirjastosta peräisin olevia klooneja seulonta identifioi monia faagiplakkeja, jotka sitoutuivat NPN:ään. Tämä

huomio osoittaa, että olosuhteissa, joissa monet raskaat ketjut yhdistettynä kevyisiin ketjuhin sitoutuvat antigeeniin, samat raskaat ketjut ja kevyet ketjut eivät yksinään sitä tee. Sen vuoksi kysymyksen ollessa NPN:stä uskotaan, että on olemassa monia raskaita ja kevyitä ketjuja, jotka sitoutuvat antigeeniin vain silloin, kun ne on yhdistetty spesifisiin kevyisiin ja raskaisiin ketjuihin, vastaavasti.

Jotta kyettäisiin seulomaan suuria määriä klooneja ja saamaan kvantitatiivisempi arvio antigeeniin sitoutuvien kloonien frekvenssistä yhdistelmäkirjastossa, seulottiin 1 miljoona faagiplakkia ja suunnilleen 100 kloonia, jotka sitoutuivat antigeeniin, identifioitiin. Kuuden kloonin kohdalla, joiden uskottiin sitovan NPN:ää, valikoitiin levyltä alue, joka sisälsi 6 positiivista ja noin 20 ympäröivää bakteriofaagiplakkia ja jokainen plakki avattiin, siveltiin uudelleen levylle ja seulottiin kaksoisnäyttein. Kuten odotettiin, noin yksi kahdestakymmenestä faagista sitoutui spesifisesti antigeeniin. Levyllä olevan faagin alueiden keskustat, joiden uskottiin olevan negatiivisia, eivät antaneet positiivisia tuloksia uudelleen levylle asetettaessa.

Klooni 2b, yksi plakeista, jotka reagoivat NPN:n kanssa, leikattiin in vivo leikkausmenettelyn mukaisesti, jossa 200 µl faagivarastoa ja 200 µl XL1-Bluen F+ johdosta (A_{600} = 1,00) (Stratagene) sekoitettiin 1 µl:aan M13mp8 auttaja-faagia [1 X 10^{10} pfu/millimetri (ml)] ja pidettiin 37 °C:ssa 15 minuuttia. Kun fagomideja oli pidetty 4 tuntia Luria-Bertani-väliaineessa (LB) ja kuumennettu 70 °C:ssa 20 minuuttia XL1-Blue -solujen tappamiseksi lämmön avulla, ne reinfektoitiin XL1-Blue -soluihin ja pantiin LB-levyille, jotka sisälsivät ampisilliinia. Tämä menettely muutti kloonatut insertit Lambda Zap II -vektorista plasmidivektoriksi käsittelyn ja sekvenoinnin helpottamiseksi (Stratagene). Sitten määritettiin V_H:ta ja osaa V_L:stä koodaava fagomidi-DNA DNA-sekvenoinnin avulla käyttäen Sangerin dideoksimenetelmää, jota kuvaavat Sanger ym., Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463-5467 (1977) käyttäen Sequenase-reagenssisarjaa valmistajan ohjeiden mukaisesti (US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Kloonin 2b Fd-ketjun nukleotiditähdesekvenssi on listattu Sekvenssiluetteloon tunnuksella SEQ ID NO 99. Kappa-kevytketjun vaihtelevan alueen ja konstantin alueen nukleotiditähdesekvenssit on listattu Sekvenssiluetteloon tunnuksilla SEQ ID NO 100 ja SEQ ID NO 101, vastaavasti.

g. DNA-sekvenssin, joka kodaa filamanettifaagin kuoriproteiinin kalvoankkuria, valmistaminen

cpVIII kalvoankkuri: M13mp18:aa, kaupallisesti saatavilla olevaa bakteriofaagivektoria (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) käytettiin lähteenä cpVIII:aa koodaavan geenin eristämiseksi. Geenin, joka koodaa cpVIII:n kalvoankkuridomeenia,

sekvenssi, joka on listattu Sekvenssiluetteloon tunnuksella SEQ ID NO 102, modifioitiin PCR-monistuksen kautta niin että se sisälsi restriktioendonukleaasikohdat, Spe I ja EcoR I, ja kaksi lopetuskodonia ennen EcoR I -kohtaa. cpVIII:n kalvoankkuridomeenin vastaava aminohappotähdesekvenssi on listattu tunnuksella SEQ ID NO 17.

Modifioidun cpVIII:n valmistamiseksi eristettiin ensiksi replikatiivinen muoto DNA:ta M13mp18:sta. Lyhyesti sanottuna 2 ml:aan LB:tä (Luria-Bertani-väliainetta), 50 µl F'- episomia kantavaa bakteerikantaviljelmää (JM107, JM109 tai TG1) sekoitettiin 1/10 yhdestä plakista johdettujen bakteriofaagipartikkelien suspensiota. Seosta inkuboitiin 4-5 tuntia 37 °C:ssa vakionopeudella sekoittaen. Sitten seos sentrifugoitiin keskipakoisvoimalla 12 000 x g 5 minuuttia infektoituneiden bakteerien pelletoimiseksi. Kun supernatantti oli poistettu, pelletti resuspendoitiin voimakkaasti pyörresekoittaen 10 µl:aan jääkylmää liuosta I. Liuos I valmistettiin sekoittamalla 50 mM glukoosia, 10 mM EDTA ja 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, ja käsittelemällä sitä autoklaavissa 15 minuuttia.

Bakteerisuspensioon lisättiin 200 µl juuri valmistettua liuosta II ja putki käännettiin nopeasti ylösalaisin viisi kertaa. Liuos II valmistettiin sekoittamalla 0,2 N NaOH ja 1 % SDS. Bakteerisuspensioon lisättiin 150 µl jääkylmää liuosta III ja putkea pyöritettiin hitaasti ylösalaisessa asennossa 10 sekuntia liuoksen III dispergoimiseksi viskoosiin bakteerilysaattiin. Liuos III valmistettiin sekoittamalla 60 ml 5 M kaliumasetaattia, 11,5 ml jääetikkahappoa ja 28,5 ml vettä. Saatua bakteerilysaattia säilytettiin sitten jäällä 5 minuuttia, mikä jälkeen sitä sentrifugoitiin keskipakoisvoimalla 12 000 x g 5 minuuttia 4 °C:ssa mikrofugissa. Muodostunut supernatantti otettiin talteen ja siirrettiin uuteen putkeen. Supernatanttiin lisättiin sama tilavuusmäärä fenoli-kloroformia ja seosta pyörresekoitettiin. Sitten seos sentrifugoitiin keskipakoisvoimalla 12 000 x g 2 minuuttia mikrofugissa. Muodostunut supernatantti siirrettiin uuteen putkeen ja kaksisäikeinen bakteriofaagi-DNA saostettiin 2 tilavuusmäärällä etanolia huoneenlämpötilassa. Kun seoksen oli annettu olla huoneenlämpötilassa 2 minuuttia, se sentrifugoitiin DNA:n pelletoimiseksi. Supernatantti poistettiin ja pelletoitu replikatiivisessa muodossa oleva DNA resuspendoitiin 25 µl:aan Tris-HCl, pH 7,6, ja 10 mM:iin EDTA (TE).

Kaksisäikeistä M13mp18:n replikatiivisessa muodossa olevaa DNA:ta käytettiin sitten templaattina PCR:ssä. Alukkeita, AK 5 (SEQ ID NO 103) ja AK 6 (SEQ ID NO 104), joiden sekvenssit on lueteltu tuonnempana taulukossa 7, käytettiin PCR-reaktiossa kypsän geenin monistamiseksi cpVIII-kalvoankkuridomeenia varten ja kahden kloonauspaikan, Spe I ja EcoR I, sisällyttämiseksi fragmenttiin. PCR-

reaktiota varten 2 µl, jossa oli 1 ng M13mp18:n replikatiivisessa muodossa olevaa DNA:ta, sekoitettiin 10 µl:aan 10X PCR puskuria, jota on saatavana kaupallisesti (Promega Biotech, Madison, Wisconsin), 0,5 ml:n mikrofugiputkessa. DNA-seokseen lisättiin 8 µl 2,5 M dNTP:itten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) liuosta, jolloin lopulliseksi konsentraatioksi saatiin 200 mikromoolia (µM). 3 µl [vastaa 60 pikomoolia (pM)] 5'-eteenpäin-AK 5 aluketta ja 3 µl (60 pM) 3'-taaksepäin-AK 6 aluketta sekoitettiin DNA-liuokseen. Seokseen lisättiin 73 µl steriiliä vettä ja 1 µl/5 yksikköä polymeraasia (Promega Biotech). Kaksi tippaa mineraaliöljyä pantiin seoksen pinnalle ja suoritettiin 40 sykliä PCR-monistusta termosyklerissä. Monistussykli käsitti 2 minuuttia 52 °C:ssa, 1,5 minuuttia 72 °C:ssa ja 2 minuuttia 91 °C:ssa. Saatu näytteet sisältävä PCR-monistettu cpVIII-kalvoankkuridomeenin DNA-fragmentti puhdistettiin sitten Gene Cleanilla (BI0101, La Jolla, Kalifornia), uutettiin kahdesti fenoli/kloroformilla, kerran kloroformilla ja saostettiin sen jälkeen etanolilla ja säilytettiin -70 °C:ssa 10 mM:ssa Tris-HCl, pH 7,5, ja 1 mM:ssa EDTA.

Taulukko 7

SEQ ID NO	**Aluke**	
(103)[1]	AK 5 (F) 5'	GTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGGGTGACGAT 3'
(104)[2]	AK 6 (B) 5'	ACTCGAATTCTATCAGCTTGCTTTCGAGGTGAA 3'
(105)[3]	Hc3 (F) 5'	AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGG 3'
(106)[4]	AK 7 (B) 5'	GTCACCCTCAGCACTAGTACAATCCCTGGGCAC 3'
(107)[5]	G-3 (F) 5'	GAGACGACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTC GTTTGTGAATATCAA 3'
(108)[6]	G-3 (B) 5'	TTACTAGCTAGCATAATAACGGAATACCCAAAA GAACTGG 3'
(109)[7]	LAC-F 5'	TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGACTGG 3'
(110)[8]	LAC-B 5'	ACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTC 3'
(125)[9]	LAC-B' 5'	AGCTGTTGAATTCGTGAAATTGTTATCCGCT 3'

F Eteenpäin-aluke

B Taaksepäin-aluke

1 5' → 3': C_H1:n 3'-pään kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu; SpeI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu; cpVIII:n kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu.

2 EcoRI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu.

3 XhoI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu.

4 5' → 3': cpVIII:n kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu; SpeI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu; C_H:n 3'-pään kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu.

5 5' → 3': SpeI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu; cpVIII:n 5'-pään kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu.

6 5' → 3': NHeI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu; cpVIII:n 3'-pään kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu.

7 5' → 3': cpVIII:n 3'-pään kanssa päällekkäin menevä sekvenssi on kaksoisalleviivattu; NheI-restriktiokohdan sekvenssi alkaa nukleotiditähteellä "G" asemassa 4 ja jatkuu vielä 5 tähteellä = GCTAGC.

8 EcoRI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu.

9 Vaihtoehtoinen taaksepäin-aluke LacZ:n monistamiseen; EcoRI-restriktiokohdan sekvenssi on alleviivattu.

Modifioidun cpVIII-kalvoankkuridomeenin monistumisen tarkistamiseksi PCR-puhdistetuille DNA-tuotteille suoritettiin elektroforeesi 1 % agaroosigeelissä. cpVIII:n odotettu koko oli noin 150 emäsparia. Agaroosissa alue, joka sisälsi modifioidun cpVIII-DNA-fragmentin, eristettiin agaroosista, kuten edellä kuvattiin. Eristetyn modifioidun cpVIII-DNA-fragmentin sekvenssi on listattu tunnuksella SEQ ID NO 111. Eristetty cpVIII-DNA-fragmentti sekoitettiin sitten samalla tavoin valmistettuun modifioidun Fd:n fragmenttiin, kuten alla esimerkissä 2i kuvataan, DNA-segmentin, joka koodaa fuusioproteiinia Fd-cpVIII, muodostamiseksi.

cpVIII-Kalvoankkuri: M13mp18:aa käytettiin myös lähteenä geenin, joka koodaa kalvoankkurialuetta cpIII:ssa ja jonka sekvenssi on listattu tunnuksella SEQ ID NO

112, eristämistä varten. cpIII-kalvoankkuridomeenin aminohappotähdesekvenssi on listattu tunnuksella SEQ ID NO 16. M13mp18:n replikatiivisessa muodossa oleva DNA valmistettiin kuten edellä kuvattiin ja sitä käytettiin templaattina kahteen PCR-monistukseen DNA-fragmentin, joka muodostui cpIII-kalvoankkuridomeenia koodaavasta kypsästä geenistä, joka sijaitsi 5'-päästä LacZ-promoottoria, operaattoria ja cap-sitomiskohtaa koodaavaan sekvenssiin kevyen ketjun ekspression säätelemiseksi. Restriktiokohdat, Spe I ja EcoR I, luotiin monistusreaktiossa ja ne sijoitettiin vastaavasti fragmentin 5'- ja 3'-päähän. Menettelyä tämän fragmentin luomiseksi yhdistämällä kaksi erillistä PCR-monistusta, kuvataan alla.

Alukeparia, G-3(F) (SEQ ID NO 107) ja G-3(B) (SEQ ID NO 108), jotka on lueteltu taulukossa 7, käytettiin ensimmäisessä PCR-reaktiossa kuten edellä cpIII-kalvoankkurigeenin monistamiseksi ja Spe I- ja Nhe I -restriktiokohtien sisällyttämiseksi fragmenttiin. Monistettu PCR-fragmentti sisälsi myös nukleotidisekvenssit 5 aminohappotähteen, jotka muodostuvat 4 glyseriinitähteestä ja 1 seriinitähteestä, jotka ovat vierekkäin raskasta ketjua ja cpIII koodaavien domeenien välissä, koodaamiseksi. Ilmennyttyään nämä 5 aminohappotähdesekvenssiä, joilta puuttui säännönmukainen sekundaarirakenne, auttoivat minimoimaan interaktiota Fab- ja cpIII-alueitten välillä. Saatu PCR-modifioitu cpIII-DNA-fragmentti, jossa oli Spe I- ja Nhe I -kohdat vastaavasti fragmentin 5'- ja 3'-päissä, todennettiin ja puhdistettiin, kuten edellä kuvattiin. PCR-modifioidun cpVIII-kalvoankkuridomeenin DNA-fragmentin sekvenssi on listattu Sekvenssiluetteloon tunnuksella SEQ ID NO 113. Toinen PCR-monistus, jossa käytettiin taulukkoon 7 listattuja alukepareja Lac-F (SEQ ID NO 109) ja Lac-B (SEQ ID NO 110), suoritettiin erillisellä erällä M13mp18:n replikatiivisessa muodossa olevaa DNA-templaattia LacZ-promoottorin, operaattorin ja Cap-sitomispaikan, jossa on 5'-päässä Nhe I -kohta ja 3'-päässä EcoR I -kohta, monistamiseksi. Alukkeet, joita tähän monistukseen käytettiin, rakennettiin sisältämään monistetun fragmentin 5'-päässä Nhe I -kohdan, joka menee päällekkäin cpIII-geenifragmentin ja NHe I -kohdan 3'-pään osan kanssa 3'-päästä monistettuun fragmenttiin. PCR-tuotteen reaktio ja puhdistaminen suoritettiin kuten edellä kuvattiin. Saadun PCR-monistetun cpIII-DNA-fragmentin, jossa on 5'-päässä Nhe I -kohta ja 3'-päässä EcoR I -kohta, sekvenssi on listattu Sekvenssiluetteloon tunnuksella SEQ ID NO 114.

Eräs vaihtoehtoinen Lac-B aluke käytettäväksi cpIII-kalvoankkurin ja LacZ-promoottorialueen rakentamiseen oli Lac-B', kuten taulukossa 7 esitetään. Monistusreaktiot suoritettiin edellä kuvatulla tavalla paitsi että toisessa PCR-monistuksessa Lac-B':tä käytettiin Lac-F:n kanssa Lac-B:n sijasta. Monistusreak-

tiosta saatu tuote on listattu Sekvenssiluetteloon tunnuksella SEQ ID NO 114 nukleotidiasemasta 1 nukleotidiasemaan 172. Lac-B'n käyttö antoi tulokseksi LacZ-alueen, josta puuttui 29 nukleotidia 3'-päästä, mutta joka oli funktionaalisesti samanarvoinen pitemmän fragmentin, joka tuotettiin Lac-F ja Lac-B alukkeiden avulla, kanssa.

Ensimmäisestä ja toisesta PCR-monistuksesta, joissa käytettiin alukepareja 6-3(F) ja 6-3(B) ja Lac-F:ää ja Lac-B:tä, saadut tuotteet yhdistettiin sitten nukleotidien kohdalta, jotka vastaavat cpIII-kalvoankkurin päällekkäin menevää osaa ja Nhe I -restriktiokohtaa, ja sille suoritettiin toinen PCR-sykli, jossa käytettiin G3-F (SEQ ID NO 107) ja Lac-B (SEQ ID NO 110) -alukeparia yhdistelmä-PCR-DNA-fragmentin muodostamiseksi, joka fragmentti muodostui seuraavista osista: 5'-Spe I -restriktiokohta; cpIII-DNA-kalvoankkuridomeeni, joka alkaa nukleotiditähdesekvenssistä, joka vastaa koko kypsän pcIII-proteiinin aminohappotähdettä 198; endogeeninen lopetuskohta, jonka tuo käyttöön kalvoankkuri aminohappotähteessä nro 112; Nhe I -restriktiokohta, LacZ-promoottori, operaattori ja Cap-sitomispaikkasekvenssi ja 3'-EcoR I -restriktiokohta. Yhdistelmä-PCR-modifioitu cpIII-kalvoankkuridomeeni-DNA-fragmentti digeroitiin sitten restriktioenstyymeillä Spe I ja EcoR I DNA-fragmentin tuottamiseksi suunnattua ligaatiota varten pComb2-fagomidi-ilmentämisvektoriin, jossa on vain yksi Spe I -kohta ja joka on valmistettu esimerkissä 1a(iv), pComb2-III (jota nimitetään myös pComb2-3:ksi) -fagomidi-ilmentämisvektorin muodostamiseksi kuten kuvattiin esimerkissä 1b(ii).

h. Anti-NPN:ää koodaavan V_H-DNA-segmentin eristäminen

Modifioitujen Fd-fragmenttien valmistamiseksi rekombinointia varten PCR-modifioidun cpVIII-kalvoankkuridomeenifragmentin kanssa Fd-pcVIII-DNA-fuusiotuotteen muodostamiseksi, suoritettiin PCR-monistus, kuten edellä kuvattiin, käyttäen kloonia 2b, joka valmistettiin esimerkissä 2f, templaattina. PCR:ssä käytettiin alukkeita Hc3 (SEQ ID NO 105) ja AK 7 (SEQ ID NO 106), joiden sekvenssit on listattu taulukkoon 7, kloonin 2b Fd-osan monistamiseen ja Xho I- ja Spe I -kloonauskohtien sisällyttämiseen cpVIII:n päällekkäin meneviin sekvensseihin. Monistettu PCR-modifioitu Fd-tuote puhdistettiin, sille suoritettiin elektroforeesi ja se eristettiin 1 % agaroosigeelistä, kuten edellä kuvattiin. Fd-fragmentin koko oli 680 emäsparia.

i. DNA-segmentin, joka koodaa osaa fuusioproteiinista Fd-pcVIII, valmistus

Puhdistettu PCR-modifioitu Fd-DNA-fragmentti, joka sisälsi cpVIII:n päällekkäin menevät sekvenssit ja joka valmistettiin edellä, sekoitettiin sitten PCR-modifioidun cpVIII-kalvoankkuridomeenifragmentin kanssa seoksen muodostamiseksi. Seoksessa olevien fragmenttien annettiin yhdistyä komplementaarisilta alueiltaan. Seokselle, joka sisälsi yhdistyneet PCR-fragmentit, suoritettiin sitten toinen PCR-monistussykli, edellä kuvatulla tavalla, käyttäen pääalukeparia AK 6 (SEQ ID NO 104) ja Hc3 (SEQ ID NO 105) (taulukko 7). Vastaava PCR-monistustuote puhdistettiin ja sille suoritettiin elektroforeesi agaroosigeeleillä, kuten edellä kuvattiin. PCR-tuotteen määritettiin käsittävän noin 830 emäsparia (Fd = 680 + 150), mikä vahvisti Fd:n fuusioitumisen cpVIII:n kanssa. PCR-tuotteen sekvenssi, joka liittää Fd-sekvenssin cpVIII-sekvenssiin kehyksessä suunnassa 5' → 3', on listattu tunnuksella SEQ ID NO 115. Fd-cpVIII-fuusiotuotetta käytettiin sitten suunnattuun ligaatioon, jota kuvattiin esimerkissä 2j, pCBAK8-2b dikistronisen fagomidi-ilmentämisvektorin rakentamiseen.

j. pCBAK8-2b dikistronisen ilmentämisvektorin rakentaminen

Fagomidivektorin rakentamiseksi Fd-cpVIII-fuusioproteiinin koordinoitua ilmentymistä varten kappa-kevytketjun kanssa, PCR-monistettu Fd-cpVIII-fuusiotuote, joka valmistettiin edellä esimerkissä 2i, ligatoitiin ensiksi kloonin 2b fagomidi-ilmentämisvektoriin, joka oli eristetty NPN-yhdistelmäkirjastosta, joka valmistettiin esimerkissä 2f. Ligaatiota varten Fd-cpVIII-PCR-fuusiotuote ensiksi digeroitiin restriktioenstyymeillä Xho I ja EcoR I. Klooni 2b-fagomidi-vektori pilkottiin samalla tavoin, jolloin kloonaus- ja dekapeptidialueet saatiin poistumaan. Fd-cpVIII-fragmentti sekoitettiin ja ligatoitiin digeroituun klooniin 2b kohesiivisiin päihin, jotka muodostuivat restriktioentsyymeillä Xho I ja EcoR I digeroitaessa. Ligaation tuloksena nukleotiditähdesekvenssi, joka koodaa Fd-cpVIII-polypeptidifuusioproteiinia, liittyi operatiivisesti toiseen kasettiin, jolla on nukleotiditähdesekvenssi, joka koodaa ribosomin sitomiskohtaa, pelB-johtosekvenssi ja kappa-kevytketju, joka on läsnä jo kloonissa 2b, dikistronisen DNA-molekyylin muodostamiseksi alkuperäisessä klooni 2b-fagomidi-ilmentämisvektorissa.

E. coli, kanta TG1, transformoitiin sitten fagomidilla, joka sisälsi dikistronisen DNA-molekyylin, ja transformantit valikoitiin ampisilliinin perusteella, koska alkuperäinen klooni 2b sisälsi ampisilliinin suhteen valikoituvan resistenssimarkkerigeenin. E. colin erittäin tehokkaan elektrotransformaation aikaansaamiseksi, 1:100 tilavuutta yli yön viljeltyjä TG1-soluja ympättiin yhteen litraan L-lihalientä (1 % baktotryptonia,

0,5 % baktohiivauutetta, 0,5 % NaCl). Solususpensiota pidettiin 37°C:ssa voimakkaasti ravistaen, jotta päästiin 0,5-1,0 absorbanssiin 600 nm:ssä. Logaritmisessa kasvuvaiheessa oleva solususpensio koottiin sitten ensiksi jäähdyttämällä pulloa jäällä 15-30 minuuttia ja sen jälkeen sentrifugoimalla kylmässä roottorissa keskipakoisvoimalla 4000 x g 15 minuuttia bakteerien pelletoimiseksi. Tuloksena oleva supernatantti poistettiin ja bakteerisolupelletti resuspendoitiin kaikkiaan 1 litraan kylmää vettä solususpension muodostamiseksi. Sentrifugointi- ja resuspendointiprosessi toistettiin vielä kaksi kertaa ja lopullisen sentrifugoinnin jälkeen solupelletti resuspendoitiin 20 ml:aan kylmää 10-prosenttista glyserolia. Resuspendoitu solususpensio sentrifugoitiin sitten solupelletin muodostamiseksi. Saatu solupelletti resuspendoitiin lopulliseen 2-3 ml:n tilavuuteen kylmään 10-prosenttiseen glyseroliin, jolloin muodostui solususpensio, joka sisälsi 1-3 x 10^{10} solua/ml. Elektrotransformaatiokäsittelyä varten 40 µl valmistettua solususpensiota sekoitettiin 1-2 µl:aan fagomidi-DNA:ta solu-fagomidi-DNA-seoksen muodostamiseksi. Saatua seosta sekoitettiin ja sen annettiin olla jään päällä 1 minuutin ajan. Elektroporaatiolaite, esimerkiksi geenipulsaattori, säädettiin arvoihin 25 uF ja 2,5 kV. Pulssinsäätäjä säädettiin 200 ohmiin. Solu-DNA-seos siirrettiin kylmään 0,2 cm:n elektroporaatiokyvettiin. Kyvetti asetettiin sitten jäähdytettyyn turvakammioon ja pulssikäsiteltiin kerran edellä mainituilla säätöarvoilla. Pulssikäsiteltyyn seokseen lisättiin 1 ml SOC-väliainetta ja solut resuspendoitiin Pasteur-pipetillä (SOC-väliaine valmistettiin sekoittamalla 2-prosenttista baktotryptonia, 0,5-prosenttista baktohiivauutetta, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ ja 20 mM glukoosia). Solususpensio siirrettiin sitten 17 x 100 mm:n polypropeeniputkeen ja pidettiin 37 °C:ssa 1 tunti. Tämän ajanjakson jälkeen transformoidut TG1-solut levitettiin sitten ampisilliini-LB-levyille ampisilliiniresistenttien pesäkkeiden, jotka sisältävät seulottavan geenimerkin tuovan fagomidin, seulomiseksi.

Ampisilliiniresistentit pesäkkeet valikoitiin ja analysoitiin oikean inserttikoon ja Fab'in ekspression suhteen. Lyhyesti sanottuna valikoiduista pesäkkeistä valmistettiin DNA-minipreparaatit fagomidi-DNA:n eristämistä varten. Kustakin minipreparaatista eristetty fagomidi-DNA restriktio-digeroitiin Xho I:llä ja EcoR I:llä ja digeroiduille näytteille suoritettiin elektroforeesi 1-prosenttisella agaroosigeelillä. Klooni AK16, joka valikoitiin 830 bp fragmenttina, visualisoitui geeleillä vahvistaen sen, että Fd-cpVIII-PCR-fuusiotuote oli insertoitunut digeroituun klooniin 2b.

Klooni AK16-fagomidi restriktio-digeroitiin sitten Xho I:llä ja Xba I:llä ja dikistronisen DNA-molekyylin, joka koodasi Fd-cpVIII-fuusioproteiinia, ribosomin sitomis-

paikkaa ja pelB-johtosekvenssiä kevyen ketjun, välialueen ja 2b-kappa-kevytketjun ekspressoimiseksi, nukleotiditähdesekvenssi eristettiin agaroosigeelielektroforeesilla. Eristetty dikistroninen DNA-fragmentti ligatoitiin sitten Xho I- ja Xba I-restriktio-digeroituun pCBAKO-ilmentämisvektoriin, joka valmistettiin esimerkissä 1c(ii), dikistronisen fagomidi-ilmentämisvektorin, joka merkittiin pCBAK8-2b:ksi, muodostamiseksi.

Saatu ilmentämisvektori pCBAK8-2b muodostui nukleotiditähdesekvensseistä, jotka koodasivat seuraavia elementtejä: replikaation alkuna ollutta f1-filamenttifaagia, kloramfenikoliasetyylitransferaasin suhteen valikoituvaa resistenssimerkkigeeniä; indusoituvaa LacZ-promoottoria ylävirtaan LacZ-geenistä; multippelikloonauskohtaa, jonka vieressä ovat T3- ja T7-polymeraasipromoottorit ja dikistronista DNA-molekyyliä (ensimmäinen kasetti, jonka muodostivat ribosomin sitomiskohta, pelB-johtosekvenssi ja Fd-cpVIII-DNA-fuusiotuote, joka oli operatiivisesti liitetty toiseen kasettiin, jonka muodostivat toinen ribosomin sitomiskohta, toinen pelB-johtosekvenssi ja kappa-kevytketjut).

k. Dikistronisen ilmentämisvektorin pCBAK3-2b rakentaminen

Fagomidivektorin rakentamiseksi Fd-cpVIII-fuusioproteiinin ja kappakevytketjun koordinoitua ilmentämistä varten PCR-monistettu ja yhdistetty cpIII-kalvoankkuri ja LacZ-promoottorialuefragmentti, joka valmistettiin esimerkissä 2g ja jossa on 5' Spe I- ja 3' EcoR I -restriktiokohdat, ligatoitiin suunnatusti pComb2-fagomidi-ilmentämisvektoriin, joka oli aikaisemmin digeroitu Spe I:llä ja EcoR I:llä ja valmistettu esimerkissä 1a(iv), pComb2-3 (nimitetään myös pComb-2-III:ksi) –fagomidivektorin muodostamiseksi. Katso esimerkkiä 1b(ii) tämän vektorin yksityiskohtaisen rakentelun osalta. Tätä vektoria käytettiin tässä keksinnössä, kun ensisijalle asetettiin ampisilliiniresistentit vektorit. Siten saatu pComb2-3-vektori, jossa oli vain yksi Spe I-restriktiokohta, sisälsi erilliset LacZ-promoottori/operaattorisekvenssit raskaan ketjun (Fd)-cpIII-fuusiotuotteen ja kevyen ketjun proteiinin erillisen ilmentymisen suuntaamiseksi. Ekspressoituneet proteiinit suunnattiin periplasmatilaan pelB-johtosekvenssien avulla funktionaalista kalvolle kokoontumista varten. Faagi F1:n geeninsisäisen alueen sisältyminen vektoriin salli yksisäikeisen fagomidin pakkaamisen auttaja-faagin avulla. Auttaja-faagisuperinfektion käyttäminen johtaa cpIII:n kahden muodon ilmentymiseen. Siten normaali faagin morfogeneesi häiriytyi Fab-cpIII-fuusiotuotteen ja auttaja-faagin natiivin cpIII:n välillä tapahtuvan virioniin pääsystä kilpailun vaikutuksesta, kuten on esitetty kuviossa 8 Fab-cpVIII-fuusioiden osalta.

Kloramfenikoliresistenttien vektoreiden tuottamiseksi tässä keksinnössä käyttöä varten saatu fagomidivektori pComb2-3 restriktiodigeroitiin sitten Sac II:lla ja Apa I:llä eristetyn fragmentin muodostamiseksi. Saatu eristetty fragmentti, joka sisälsi ekspressiota säätelevät sekvenssit ja cpIII-sekvenssin, ligatoitiin sitten suunnatusti samalla tavoin digeroituun fagomidivektoriin pCBAKO, joka valmistettiin esimerkissä 1c(ii), fagomidi-ilmentämisvektorin pCABK3 muodostamiseksi. Tästä vektorista puuttuivat Fd- ja kappa-kevytketjun sekvenssit.

Sitten rakennettiin kloramfenikoliresistentti fagomidi-ilmentämisvektori, pCAB3-2b, fuusioproteiinin ja kappa-kevytketjun proteiinin ilmentämistä varten. Lyhyesti esitettynä fagomidi-ilmentämisvektori pCBAK3, joka valmistettiin edellä, digeroitiin ensiksi Xho I:llä ja Spe I:llä linearisoidun fagomidi-ilmentämisvektorin pCBAK3 muodostamiseksi. PCR-monistettu ja modifioitu Fd-fragmentti, joka valmistettiin esimerkissä 2f ja joka sisälsi Xho I- ja Spe I -kohdat, restriktiodigeroitiin sitten Xho I:llä ja Spe I:llä. Saatu Fd-fragmentti ligatoitiin sitten suunnatusti kohesiivisten päitten kautta Xho I:llä ja Spe I:llä restriktiodigeroituun fagomidi-ilmentämisvektoriin pCBAK3 toisen fagomidi-ilmentämisvektorin muodostamiseksi, jossa PCR-modifioitu Fd-fragmentti oli operatiivisesti liitetty kehyksen sisällä cpIII:a koodaaviin nukleotiditähdesekvensseihin.

E. coli -kannan XL1-Blue (Stratagene) transformoitiin sitten edellä mainitulla fagomidivektorilla, joka sisälsi Fd-cpIII:n. Transformantit, jotka sisälsivät Fd-cpIII-koodaavan fagomidin, valikoitiin kloramfenikolin suhteen. Fagomidi-DNA eristettiin kloramfenikoliresistenteistä klooneista ja restriktiodigeroitiin Sac I:llä ja Xba I:llä linearisoidun fagomidi-ilmentämisvektorin muodostamiseksi, johon tuonnempana kuvatulla tavalla valmistettu Sac I:llä ja Xba I:lla digeroitu kevytketjufragmentti ligatoitiin suunnatusti.

Fagomidi-klooni 2b, joka oli eristetty alkuperäisestä yhdistelmäkirjastosta, kuten esimerkissä 2a kuvataan, restriktiodigeroitiin Sac I:llä ja Xba I:llä kappa-kevytketjua koodaavan nukleotiditähdesekvenssin eristämiseksi. Eristetty kappa-kevytketju-sekvenssi ligatoitiin sitten suunnatusti Sac I:llä ja Xba I:llä restriktiodigeroituun fagomidi-ilmentämisvektoriin, joka valmistettiin edellä ja sisälsi Fd-cpIII:n, fagomidi-ilmentämisvektorin pCBAK3-2b muodostamiseksi. Saatu vektori sisälsi dikistronisen DNA-molekyylin nukleotiditähdesekvenssin Fd-cpIII-fuusioproteiinin ilmentämiseksi koordinoidusti kappa-kevytketjun proteiinin kanssa. Saatu ilmentämisvektori muodostui nukleotiditähdesekvensseistä, jotka koodasivat seuraavia elementtejä: replikaation alkuna olevaa f1-filamenttifaagia, kloramfenikoliasetyylitransferaasin suhteen valikoituvaa resistenssimerkkigeeniä; indusoituvaa LacZ-

promoottoria ylävirtaan LacZ-geenistä; multippelikloonauskohtaa, jonka vieressä ovat T3- ja T7-polymeraasipromoottorit, ja dikistronista molekyyliä (ensimmäinen kasetti, jonka muodostivat ribosomin sitomiskohta ja pelB-johtosekvenssi, joka oli operatiivisesti liitetty Fd-cpVIII:een, joka oli liitetty operatiivisesti toiseen kasettiin, jonka muodostivat toinen LacZ, toinen ribosomin sitomiskohta ja toinen pelB-johtosekvenssi, joka oli operatiivisesti liitetty kappa-kevytketjuun).

XL1-Blue -solut transformoitiin sitten fagomidi-ilmentämisvektori pCBAK3-2b:llä. Transformoidut pesäkkeet, jotka sisälsivät kloramfenikoliresistenttejä fagomideja, seulottiin kuten edellä kuvataan ja analysoitiin oikean inserttikoon ja Fab'in ilmentämisen suhteen, kuten esimerkissä 2j kuvataan. Kun insertti ja Fab'in ekspressio fagomidivekto-rissa pCBAK3-2b oli verifioitu, XL1-Blue -solut transformoitiin sitten ja indusoitiin Fab-vasta-aineiden ekspressiota varten, kuten esimerkeissä 3 ja 4 kuvataan.

Fab-cpIII-fuusioiden ilmentämis-, valikoimis- ja seulontatulokset paljastivat Fab-cpIII:n tuoman monovalenssisuuden edun verrattuna Fab-cpVIII-fuusioiden multivalenssisuuteen, sillä se salli kloonien seulomisen affiniteetin perusteella samoin kuin spesifisyyden perusteella, kuten immuunisysteemi tekee. Tiukasti sitovan kloonin 10C rikastuminen oli 253-kertainen verrattuna heikommin sitovaan klooniin 7E käytettäessä pComb3-systeemiä, kuten kuvaavat Barbas ym., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991). Peptidikirjastoilla faageja, joissa esiintyi 4-5 peptidikopiota faagin pinnalla, käyttäen suoritetut tutkimukset ovat osoittaneet, että multivalenssisuus esti faagin, jossa esiintyi keskinkertaisen affiniteetin omaavia peptidejä (10^{-6} M), erottumisen sellaisista, joissa esiintyi suuren affiniteetin omaavia peptidejä (10^{-9} M). Cwirla ym., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:6378-6382 (1990). Monivalenssisuus johtaa kelatoitumisvaikutukseen, joka vähentää kykyä suorittaa diskriminointia faagien, joissa on suuren affiniteetin omaavia Fab-palasia, ja faagien, joissa on heikon affiniteetin omaavia Fab-palasia, välillä.

Systeemin käyttöä demonstroitiin vielä seulomalla eräs aikaisemmin karakterisoitu (yksi sitoja per 5000 kloonia) ihmisen yhdistetty anti-tenatustoksoidi-Fab-kirjasto, kuten kuvataan esimerkissä 6 ja jota ovat kuvanneet Persson ym. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:2432-2436 (1991). Kirjasto, joka oli alunperin lambda-faagivektorisysteemissä, rekon-struoitiin pComb2-3:ssa säilyttäen alkuperäiset raskaan ja kevyen ketjun pariutumiset. Kirjaston koko, 10^7 kloonia, oli 10 kertaa suurempi kuin alkuperäisen lambda-faagikirjaston. Yhden seulontajakson jälkeen 13 tai 57 poimittua kloonia määritettiin tetanustoksoidin sitojiksi, mikä edusti 10^3-kertaista rikastumista. Kolmannen seulonnan jälkeen faagisaalis oli lisääntynyt 200-kertai-

seksi, mikä osoitti rikastumista spesifisen faagin suhteen. Kaikki kloonit olivat siten antigeeni-spesifisiä sitojia. Tätä systeemiä käyttäen päästään siis käsiksi suuriin 10^8-jäsenisiin yhdistelmäkirjastoihin. Vieläpä suurempiakin kirjastoja saadaan esimerkeissä 6-8 kuvatulla mutageneesilla.

3. Anti-NPN-heterodimeerin ekspressio faagipinnoilla

NPN:ää vastaan suunnatun vasta-aine-Fab'in ilmentämiseksi faagipinnoilla XL1-Blue -soluja transformoitiin erikseen fagomidivektoreilla pCBAK8-2b ja pCBAK3-2b, jotka valmistettiin esimerkeissä 2j ja 2k, vastaavasti. Transformantit valikoitiin LB-levyiltä, jotka sisälsivät 30 µg/ml kloramfenikolia. Antibioottiresistenttejä pesäkkeitä valikoitiin kunkin fagomiditransformaation osalta ja kasvatettiin nesteviljelyissä 37 °C:ssa superlihaliemessä (superlihaliemi valmistettiin sekoittamalla seuraavat: 20 g 3-[N-morfolino]-propaanisulfonihappoa (MOPS), 60 g tryptonia, 40 g hiivauutetta ja 2 litraa vettä, pH säädettiin arvoon 7,0 10 m:lla NaOH), joka sisälsi 30 µg/ml kloramfenikolia ja 12,5 µg/ml tetrasykliiniä fagomidin ja F'-episomin vastaavaa antibioottiseulontaa varten. Antibioottiresistentit transformoidut XL1-Blue -solut laimennettiin optiseen tiheyteen (OD_{600nm}) 0,4 superlihaliemessä. Indusoija, isopropyylitiogalaktopyranosidi (IPTG), lisättiin sekoittaen bakteerisuspensioon 1 mM:n lopulliseen konsentraatioon ja seosta pidettiin 37 °C:ssa 1 tunti fuusioproteiinin ja kappa-kevytketjun ekspressoitumisen indusoimiseksi LacZ-promoottorista. Auttaja-faagi, joko R408 tai VCS M13 (Stratagene), lisättiin sitten indusoituun bakteerisuspensioon suhteessa 10-20 auttaja-faagia/1 transformoitu bakteerisolu fagomidi-DNA:n sense-säikeen kopioiden kehittymisen käyntiinpanemiseksi. Seosta, joka sisälsi auttaja-faagin, pidettiin sitten vielä 2 tuntia 37 °C:ssa, jotta filamenttibakteriofaagi pääsi kokoontumaan, jossa faagissa ekspressoituneet anti-NPN-Fab-vasta-aineet, jotka olivat fuusioituneet joko bakteriofaagin cpVIII- tai cpIII-kalvoankkurialueisiin, olivat menneet bakteriofaagipartikkelien pintaan. Sitten bakteerisuspensio sentrifugoitiin, mistä oli tuloksena bakteerisolupelletti ja faagin sisältävä supernatantti. Supernatantti poistettiin, otettiin talteen ja tutkittiin alla kuvatulla tavalla funktionaalisten, faagipartikkeleihin joko cpVIII:n tai cpIII:n kautta ankkuroituneiden anti-NPN-Fab-molekyylien läsnäolon selville saamiseksi.

4. Kokeita anti-NPN-heterodimeerin läsnäolon ja toiminnan tarkistamiseksi filamenttifaagin pinnalla

a. Elektronimikroskopia

Funktionaalisten Fab-molekyylien paikantamiseksi tutkittiin sitoutumista kolloidisella kullalla merkittyyn antigeeniin. Esimerkissä 3 valmistettu faagi, joka sisälsi supernatantit ja bakteerisolut, täplitettiin Formvarilla (Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania) päällystetyille ristikoille, jotka oli kiinnitetty kiinteään faasiin. Joissakin kokeissa ristikot päällystettiin soluilla ja infektoitiin faagilla in situ. Sen jälkeen ristikot estettiin 1-prosenttisella naudan seerumialbumiinilla (BSA) PBS:ssä, pH 7,2, pestiin ja inkuboitiin 2-7 nanometrin (nm) kolloidisilla kultahiukkasilla, jotka oli päällystetty BSA-NPN-hapteenikonjugaatilla, riittävän pitkään, jotta muodostui merkitty immuunireaktiokompleksi. Ristikot pestiin ylimääräisten kultahiukkasten poistamiseksi ja värjättiin negatiivisesti uranyyliasetaatilla ja visualisoitiin elektronimikroskoopilla.

Filamenttifaagin ja läpäistäviksi tehtyjen faagia tuottavien solujen tutkiminen paljasti faagin tai valotettujen bakteerikalvojen spesifisen leimautumisen. Faagien havaittiin sisältävän 1-24 kopiota antigeenin sitomispaikoista per partikkeli. Ei auttaja-faagi yksinään eikä myöskään koskematon E. coli leimautunut antigeenilla. Taustan ei-spesifinen sitoutuminen oli hyvin vähäistä. E. coli-pinnoilta esiintyöntyvät filamenttifaagipartikkelit olivat leimautuneet antigeenilla, kuten kuviossa 9 on osoitettu.

Sukulaisfaagipintaekspressiovektorin, pCBAK3-2b, kehittäminen, missä käytettiin cpIII:a kloonin 2b fuusiopartnerina, paljasti spesifisen antigeenin leimautumisen faagiin, mutta ei kolonniin. Lisäksi ihmisen anti-tetanus-Fab, joka ilmentyi cpIII-fuusiona, ei sitoutunut BSA-NPN-antigeeniin.

b. Faagi-ELISA

Mikrotiitterilevyjä päällystettiin NPN-BSA-konjugaatilla (0,1 ml, 1 µg/ml 0,1 M Tris-Hcl:ssä, pH 9,2) ja inhiboitiin 1-prosenttisella BSA:lla PBS:ssä. Kaksi sarjalaimennosta pCBAK8-2b:stä johdettua faagia (0,1 ml), joka valmistettiin esimerkissä 3, lisättiin esipäällystettyyn mikrotiitterilevyyn ja inkuboitiin 3 tuntia huoneenlämpötilassa tai 16 tuntia 4 °C:ssa. Levyt pestiin PBS:llä ja vuohen anti-kappa-alkalifosfataasikonjugaattia (Fisher Biotech, Pittsburgh, Pennsylvania) lisättiin (0,1 ml laimennettuna 1/1000 PBS:ään, joka sisälsi 0,1-prosenttista BSA:ta) ja inkuboitiin 2 tuntia huoneenlämpötilassa. Levyt pestiin PBS:ssä ja substraatti lisättiin (0,1 ml, 1

mg/ml p-nitrofenyylifosfaattia 0,1 M Tris-HCl:ssä, pH 9,5, joka sisälsi 50 mM $MgCl_2$). Kun niitä oli inkuboitu 37 °C:ssa signaalin kehittämiseksi, määritettiin optiset tiheydet 400 nm:ssä. Kilpailukokeita suoritettiin lisäämällä kasvavia määriä vapaata NPN-hapteenia nollasta 5 mg:aan/kuoppa.

ELISA-kokeet vahvistivat funktionaalisen vasta-aine-Fab'in läsnäolon. Kaksikohtaisessa ELISA:ssa NPN-antigeenilla päällystetyillä levyillä, kun koettimena oli anti-hiiren kappa-ketjun ensyymikonjugaattia, faagin supernatantti, joka kehitettiin pCBAK8-2b-rakennetta kantavien solujen infektiosta auttaja-faagilla, antoi odotetut tiitterikäyrät faagin sisältävän vasta-aineen kaksinkertaisilla sarjalaimennoksilla. Kaksikohtaisen ELISA:n tulokset on esitetty kuviossa 10. Jotta tässä kokeessa saadaan kehitetyksi signaali, faagipartikkelin (i) on oltava funktionaalisesti liitetty Fd- ja kappa-ketjuihin ja sen (ii) on oltava monivalenssinen. Partikkelin spesifisyys tutkittiin estämällä sitoutuminen levyyn kasvavien määrien vapaata hapteenia ollessa läsnä. Syntyneet faagipartikkelit osoittautuivat sitoutuvan ELISA:n kiinteään faasiin ja ne voitiin inhiboida lisäämällä hapteenia, kuten kuviossa 11 on osoitettu. Täydellinen inhibitio saavutettiin, kun kokeessa käytettiin 5 ng vapaata NPN-hapteenia. Auttaja-faagi ei antanut signaalia ELISA:ssa. Nämä tulokset osoittavat vasta-aineen raskaan ja kevyen ketjun polypeptidien kokoontuvan funktionaalisesti muodostamaan epitoopin sitovan kompleksin, joka on läsnä faagipartikkelin pinnalla ja kykenee sitoutumaan ennalta valittuun ligandipalaseen, joka sisältää epitoopin.

c. Faagin antigeenispesifinen saostuminen

Faagisupernatantti, joka oli peräisin XL1-Blue:sta, transformoitiin esimerkissä 3 valmistetulla dikistronisella ilmentämisvektorilla pCBAK8-2b (1 ml) ja sitä inkuboitiin BSA-NPN-konjugaatin kanssa (10 µl, 2 mg/ml) 18 tuntia 4 °C:ssa. Sitten seos pelletoitiin sentrifugoimalla 3000 kierroksella/min penkkisentrifugissa ja pantiin merkille saostuman esiintyminen. Auttaja-faagia käytettiin verrokkina. Pelletti pestiin toistuvasti kylmässä PBS:ssä (5 x 3 ml/pesu) ja sitten se resuspendoitiin LB:hen (0,5 ml). Liukoisiksi tehdyt saostumat lisättiin tuoreisiin XL1-Blue -soluihin (0,5 ml yli yön viljelyä), inkuboitiin 1 tunti 37 °C:ssa ja eriä täplitettiin LB-agarille, joka sisälsi kloramfenikolia (30 µg/ml). Pesäkkeitä valittiin sattumanvaraisesti. Pesäke-eriä nitroselluloosalla käsiteltiin lysotsyymillä soluseinämän digeroimiseksi, käsiteltiin lyhyesti kloroformilla ulkomembraanin rikkomiseksi, inhiboitiin 1-prosenttisessa BSA:ssa PBS:ssä ja inkuboitiin ^{125}I-leimatulla BSA-NPN-antigeenilla. Useiden pesujen jälkeen PBS:ssä (sisälsi 0,05 % Tween-20:tä) filmi valotet-

tiin pestylle ja kuivatulle suodattimelle yön yli -70 °C:ssa ja sitten kehitettiin autoradiografit.

Saostumia saatiin vasta-ainetta sisältävällä faagilla, mutta ei auttaja-faagilla BSA-NPN:n läsnäollessa. Lisäksi partikkelit säilyttivät infektiivisyytensä myöhemmin suoritetussa inkuboinnissa bakteerisolun kanssa, jotka kantoivat F'-episomia, ja kehittivät 4 x 10^5 pesäkettä yhdestä liukoiseksi tehdystä saostumasta.

Lisäksi suoritettiin DNA-restriktioanalyysi raskaan ja kevyen ketjun inserttien läsnäolon määrittämiseksi. Kloonien DNA-restriktioanalyysi paljasti 1,4 kb:n Xho I- ja Xba I-fragmentin, kuten odotettiin Fd-cpVIII-fuusiorakenteelta ja kappa-ketjuinsertiltä.

Nämä tulokset antavat lisänäyttöä antigeenispesifisyydestä ja monivalenssisuudesta. Sen lisäksi että tässä saostuksessa saadaan immunologisia parametreja, se tarjoaa mahdollisuuksia helppoon antigeenispesifisten faagipartikkelien rikastamiseen. Periaatteessa faagia, joka sisältää spesifisiä antigeeneja, voidaan rikastaa voimakkaasti antigeeneilla (joina voi olla solunpintamarkkeri, virus-, bakteeri- sekä synteettisiä molekyylejä). Pestyt antigeeni-vasta-ainesaostumat voidaan tehdä liukoisiksi lisäämällä ylimäärä antigeenia ja ottaa sitten elinkelpoinen faagi talteen. Harvinaisten lajien löytämiseksi voidaan käyttää immobilisoitua antigeenia, joka avaa tien differentiaaliaffiniteettieluutioon.

Immobilisoidun antigeenin käyttökelpoisuuden osoittamiseksi tietyn sitoutumisspesifisyyden omaavien kloonien rikastamiseen suoritettiin selontakoe. Rakennettiin ampisilliinille resistentti fagomidi, joka ekspressoi anti-tetanus-Fabia cpVIII-fuusiona. Tämän kloonin käyttäminen auttaja-faagin kanssa tuotti faagin, joka koodaa ampisilliiniresistenttiä fagomidia, jonka pinnalla esiintyi anti-tetanus-Fab. Nämä faagit, jotka koodasivat tetanusspesifisyyttä, sekoitettiin NPN-hapteenia koodaavaan faagiin (1:1000) ja seoksen annettiin sitoutua mikrotiitterilevyyn, joka oli päällystetty tetanustoksoidilla. Kun levyn oli annettu olla 1 tunnin ajan, se pestiin perusteellisesti ja sitten faagi eluoitiin alhaisen pH:n omaavalla puskurilla. Logaritmisessa kasvuvaiheessa olevien XL1-Blue -solujen infektoiminen ja sitä seuraava erien levittäminen ampisilliinia ja kloramfenikolia sisältäville levyille antoi mahdollisuuden rikastuksen määrän suoraan laskemiseen. Yli 1000 pesäkkeen tutkiminen osoitti, että eluoidusta faagista peräisin olevia ampisilliinille resistenttejä pesäkkeitä oli enemmän kuin kloramfenikolille resistenttejä pesäkkeitä, 27 vastaan 1. Sen vuoksi seulonta rikasti faagin, jossa esiintyi anti-tetanus-Fab, 2700-kertai-

sesti. Tämä tulos antaa olettaa, että yksi määrätyn spesifisyyden omaava klooni, jota on läsnä 1 ppm, dominoi ei-spesifisiä klooneja kahden seulontajakson jälkeen.

5. Edut, jotka saadaan vasta-aine-Fab-yhdistelmäkirjastojen kokoontumisesta faagipinnoille

Tässä esitetään tehokas tekniikka 10^{8-9}-jäsenisten kirjastojen kehittämiseksi ja valikoimiseksi yhdistelmä-Fab'ien, joilla on ennalta valitut sitomisaktiivisuudet, kirjastosta. Tässä kuvatussa vektorissa restriktiokloonauskohdat PCR-kehitettyjen vasta-ainefragmenttien insertoimiseksi ovat säilyneet kuten aikaisemmin raportoitiin lambda-vektorin yhteydessä. Geenien, jotka koodaavat vasta-aine-Fab'ia ja kappa-ketjuja, säilyminen välittyy sen kautta, että f1:tä käytettiin replikaation alkuna, mikä johtaa vektorin positiivisen säikeen synteesiin ja pakkautumiseen auttajafaagin koinfektoidessa. Koska "kypsä" viruspartikkeli kokoontuu liittämällä pääkuoriproteiinin yksisäikeisen DNA:n ympärille, kun se menee sisemmän kalvon läpi periplasmatilaan, se ei ainoastaan sieppaa fagomidivektorilla olevaa geneettistä informaatiota, vaan myös liittää useita kopioita funktionaalisesta Fab'ista pitkin partikkelin pituutta. Kun sitten F'-episomia kantavat isäntäsolut infektoituvat, fagomidi antaa resistanssin, joka tekee mahdolliseksi pesäkkeiden valikoimisen sopivan antibiootin suhteen. Varsinaisesti antigeenin tunnistusyksikkö on liittynyt ohjeisiin sen tuottamiseksi.

Aikaisemman yhdistelmäsysteemin koko tehoa ei voitu täysin käyttää hyväksi, koska sillä seulomalla päästiin heti käsiksi vain noin 0,1-1 %:iin jäsenistä. Fagomidi/M13-systeemissä luodaan samankokoisia kirjastoja ja kaikkiin jäseniin päästään käsiksi affiniteettivalikoinnin avulla. Lisäksi toisin kuin lambda-vektori, joka synnytti monovalenssisia Fab'eja, tämä systeemi tuottaa multivalenssisia partikkeleita sallien siten suuremman affiniteettialueen sieppaamisen.

Ainutlaatuiset fagmidirestriktiokohdat antavat mahdollisuuden Fd- ja kappa-ketjujen yhdistämiseen, mikä sallii ketjun korvaamisen eli sekoittamisen. Filamenttiyksisäikeisen DNA:n käyttäminen sallii nopean sekvenoinnin ja kysymyksessä olevan kloonin geneettisen rakenteen analysoinnin. Voidaan todellakin kuvitella, että vasta-aineaffiniteettia koodaava faagi voidaan rikastaa antigeenivalinnalla ennen DNA:n sekvenointia tai mutageneesia. Mahdollisuus kehittää edelleen iteratiivista mutaatioprosessia, jota seuraa valikointi, saattaa sallia suuren affiniteetin omaavien vasta-aineiden nopean kehittämisen ituratasekvensseistä. Prosessi voidaan automatisoida. Puhumatta systeemin mahdollisuudesta matkia luontoa, fagomidi/M13-systeemi saattaisi sallia täydellisemmän vasta-ainevasteen ana-

lysoinnin ihmisissä, minkä tuloksena voitaisiin saada käyttökelpoisia terapeuttisia ja diagnostisia reagensseja.

Raskaan ketjun kalvoankkurointi ja kappa-ketjun jakautuminen osastoihin periplasmassa on avain tämän funktionaalisen dimeeriproteiinin ekspressioon. Tämän systeemin mahdollisuudet eivät missään tapauksessa rajoitu vasta-aineisiin, vaan se voidaan ulottaa mihin tahansa proteiinin tunnistussysteemiin tai systeemien, jotka sisältävät monia jäseniä, yhdistelmään. Esimerkiksi ligandin ja effektorisysteemien kytkeminen korkean aviditeetin omaavassa matriksissa on nyt mahdollista. Samalla tavalla ligandien muodostama kirjasto voidaan seuloa reseptorikirjastoa vastaan.

6. Anti-tetanustoksoidia koodaavan raskaan ketjun CDR3-alueen sattumanvarainen mutagenisointi

a. PCR-mutageneesi degeneroituneilla oligonukleotideillä

Tämän keksinnön mukaisen spesifiteetiltään muuntuneen mutagenisoidun heterodimeerin, joka ei enää tunnistaisi tetanustoksoidi(TT)antigeenia, mutta tunnistaisi ja spesifisesti sitoutuisi johonkin uuteen antigeeniin, aikaansaamiseksi kehitettiin menetelmä jonkin tunnetun nukleotidisekvenssin koodaaman raskaan ketjun fragmentin vain CDR3-alueen satunnaistamiseksi. Tämä lähestymistapa on esitetty kaavamaisesti kuviossa 12, jossa fagomidikloonille, joka muodostuu vuorottaisista kehysalueista (1-4), jotka on esitetty valkoisilla lohkoilla, ja komplementaarisuutta määrittävistä alueista (CDR) (1-3), jotka on esitetty vinoviivoitetuilla lohkoilla, ja ensimmäisestä konstantista alueesta (CH1) suoritetaan kaksi erillistä PCR-sykliä. Ensimmäisessä PCR-monistusreaktiossa monistetaan raskaan ketjun 5'-pää, joka alkaa kehyksestä 1 ja jatkuu kehyksen 3 3'-päähän. Toisessa PCR-monistusreaktiossa, CDR3-alue mutagenisoidaan sattumanvaraisesti, minkä osoittaa musta boksi. Tämä tapahtuu käyttämällä oligonukleotidialukkeiden poolia, joka on syntetisoitu degeneroidulla alueella, joka on säilyneiden kehysalueen 3 ja 4 sekvenssien välissä ja koskettaa niitä. Toisesta monistuksesta saatujen monistustuotteiden, joissa kussakin on sattumanvarainen CDR3-alue, 5'-päät ovat kehyksen 3 3'-päässä ja tuotteen 3'-pää ulottuu CH1-alueen 3'-päähän.

Degeneroitujen oligonukleotidialukkeiden pooli on rakenneltu siten, että monistuksen tuloksena saadaan tuotteita, joilla on 5'-pää, joka on komplementaarinen ensimmäisen PCR-reaktion tuotteiden 3'-päälle ja menee päällekkäin sen kanssa. Siten saadaan kaksi erillistä PCR-reaktiotuotteiden poolia ja niille suoritetaan

kolmas PCR-reaktio, jossa kahden tuotteen välistä päällekkäin menevää aluetta pidennetään, jolloin tuloksena on raskas ketju, jossa on sattumanvarainen CDR3-alue.

Tässä keksinnössä käytettävä raskaan ketjun DNA-templaatti oli saatavilla kloonissa (fagomidivektori, joka merkittiin 7E:ksi ja joka sisälsi raskaan ja kevyen ketjun fragmentit), joka oli peräisin ihmisen kombinatorisesta anti-tetanustoksoidi(TT)-Fab-kirjastosta, joka oli johdettu lambda Hc2 ja Lc2 -kirjastoista, kuten kuvaavat Persson ym., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:2432-2436 (1991). Puolisynteettisen yhdistelmäkirjaston luomiseksi klooni 7E pComb2-3' dikistronisessa ekspressiovektorissa raskas ketju-cpIII-kalvoankkurifuusioproteiinin (Fd-cpIII) ja liukoisen kevyen ketjun ilmentämiseksi, kuten kuvaavat anti-NPN:n yhteydessä esimerkissä 2k Barbas ym., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991).

Fagomidivektori pComb2-3' valmistettiin, kuten kuvattiin esimerkissä 1b(ii). Raskaan ja kevyen ketjun alkuperäinen emäspariutuminen 7E-lambda-kloonista säilytettiin ligatoimalla Xho I-Xba I -fragmentti Xhi I:llä ja Xba I:llä digeroituun pComb2-3'-vektoriin. cpIII-kalvoankkurisekvenssin, LacZ-promoottorisekvenssin ja pelB-johtosekvenssin, jotka Xho I:llä ja Xba I:llä digerointi hajoitti, korvaamiseksi esimerkissä 1b(ii) valmistettu Spe I-Sac I -fragmentti ligatoitiin pComb2-3'-vektoriin, joka sisälsi raskaan ja kevyen ketjun sekvenssit kloonista 7E. Saatu fagomidiklooni, johon tästedes viitataan tunnuksella pC3-TT7E, ilmennettiin ensiksi faagipinnoilla, kuten kuvattiin anti-NPN-heterodimeerien yhteydessä esimerkissä 3, ja sen jälkeen seulottiin huuhtomalla TT-pinnoitetuilla levyillä, kuten kuvattiin anti-NPN:n yhteydessä esimerkissä 4c. Klooni pC3-TT7E osoitti TT:tä kohtaan suuruusluokkaa 10^{-7} M olevaa K_d:tä ja se oli rikastunut ei-spesifiseen faagiin verrattuna 10^3-kertaisesti, kuten kuvaavat Barbas ym. supra.

Kloonia pC3-TT7E, jossa on sekä raskaan että kevyen ketjun sekvenssit, käytettiin templaatti-DNA:na raskaan ketjun CDR3-alueen sattumanvaraiseen mutagenisointiin, antigeeniin sitoutumisspesifisyyden muuttamiseksi, kuten tässä kuvataan. Raskaan ketjun sekvenssi määritettiin, kuten esimerkissä 1a(ii) kuvattiin. Suoritettiin kaksi erillistä PCR-reaktiota, kuten kuviossa 12 on osoitettu.

Ensimmäisen PCR-reaktion tuloksena oli raskaan ketjun fragmentin alueen monistuminen pC3-TT7E-kloonissa alkaen kehysalueesta 1 ja ulottuen kehysalueen 4 päähän, joka sijaitsee alueella 5' - CDR3, joka on likimain 400 emäsparia pitkä. Tämän alueen monistamiseen käytettiin seuraavia alukepareja. 5'-anti-sense-oligonukleotidialuke, FT3X, jolla oli nukleotidisekvenssi 5'-G-CAA-TAA-ACC-CTC-

ACT-AAA-GGG-3' (SEQ ID NO 118), hybridisoitui raskaan ketjun ei-koodaavaan säikeeseen, joka vastaa kehyksen 1 aluetta 5' ja sisältää kehyksen 1 alun. 3'-sense-nukleotidialuke, B7EFR3, jolla on nukleotidisekvenssi 5'-TCT-CGC-ACA-ATA-ATA-CAC-GGC-3' (SEQ ID NO 119), hybridisoitui raskaan ketjun koodaavaan säikeeseen vastaten kehysalueen 3 3'-päätä. Oligonukleotidialukkeet syntetisoi Research Genetics (Hunstville, AL). PCR-reaktio toteutettiin 100 µl:n reaktiona, joka sisälsi 1 µg kumpaakin oligonukleotidialuketta FT3X ja B7EFR3, 8 µl 2,5 mM dNTP'itä (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl Taq-polymeraasia, 10 ng templaattia pC3-TT7E ja 10 µl 10X PCR-puskuria, joka hankittiin kaupallisesti (Promega Biotech). Kaksi tippaa mineraaliöljyä pantiin seoksen pinnalle ja suoritettiin 35 PCR-monistussykliä termosyklerissä. Monistussykli käsitti 1 minuutin denaturoinnin 94 °C:ssa, 1 minuutin paahtamisen 50 °C:ssa ja sen jälkeen 2 minuutin pidentämisen 72 °C:ssa. Tuloksena olevat PCR-monistustuotteet geelipuhdistettiin sitten, kuten esimerkissä 1d kuvattiin, ja niitä käytettiin "overlap"-pidennys-PCR-reaktiossa toisen PCR-reaktion tuotteiden kanssa, joita molempia kuvataan tuonnempana, kahden tuotteen yhdistämiseksi rekonstruoituihin raskaisiin ketjuihin, jotka sisältävät mutagenisoituja CDR3-alueita, kuten kuviossa 12 esitetään. Kokonais-DNA-saanto tässä monistuksessa oli noin 3 µg/100 µl.

Toisen PCR-reaktion tuloksena oli raskaan ketjun monistuminen kehysalueen 3 3'-päästä ulottuen CH1-alueen päähän, mikä tarkoittaa noin 390 emäsparin pituutta. Tämän alueen monistamiseksi käytettiin seuraavia alukkeita. 5'-anti-sense-oligonukleotidialukepoolilla, joka merkittiin 7ECDR3:ksi, oli nukleotidisekvenssi, jota edustaa kaava 5'-GTG-TAT-TAT-TGT-GCG-AGA-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-NNS-TGG-GGC-CAA-GGG-ACC-ACG-3', jossa N voi olla A, C, G tai T ja S on joko C tai G (SEQ ID NO 120), jossa alukepoolin 5'-pää oli komplementaarinen kehyksen 3'-päälle, jota edustaa oligonukleotidialukkeen B73FR3 nukleotidisekvenssi, ja alukepoolin 3'-pää oli komplementaarinen kehyksen 4 5'-päälle. Aluketta alukepoolin kahden spesifisen pään välillä edusti 48-meerinen NNS degeneroitunut sekvenssi, joka myöhemmin koodasi 16 aminohappotähteen pituisen mutagenisoidun CDR3-alueen erilaista populaatiota. 3'-sense-oligonukleotidialuke, CG1Z, kuten kuvaavat Persson ym., supra, ja jolla on nukleotidisekvenssi 5'-GCATGTACTAGTTTTGT-CACAAGATTTGGG-3 (SEQ ID NO 121), hybridisoitui raskaan ketjun koodaavaan säikeeseen vastaten CH1:n 3'-päätä. Toinen PCR-reaktio toteutettiin käyttäen pC3-TT7E:tä 100 µl reaktiossa, kuten edellä kuvattiin, joka sisälsi 1 µg kumpaakin oligonukleotidialuketta 7ECDR3 ja CG1Z. Saadut reaktiotuotteet geelipuhdistettiin

sitten, kuten edellä kuvattiin. Kokonais-DNA-saanto tästä toisesta PCR-mutageneesimonistuksesta oli noin 3 µg/100 µl.

100 nanogrammalla geeliä puhdistetut tuotteet ensimmäisestä ja toisesta PCR-reaktiosta sekoitettiin sitten 1 µg:aan kumpaakin nukleotidialuketta FTX3 ja CG1Z, jotka olivat alukeparina viimeisessä PCR-reaktiossa täydellisen raskaan ketjun fragmentin muodostamiseksi overlap-pidennyksellä, kuten kuviossa 12 on kuvattu. PCR-reaktioseos sisälsi myös 10 µl 10X PCR-puskuria, 1 µl Taq-polymeraasia ja 8 µl 2,5 mM dNTP'itä, kuten edellä kuvattiin. PCR-reaktio toteutettiin edellä kuvatulla tavalla. Jotta saatiin riittäviä määriä monistustuotetta, suoritettiin 15 samanlaista PCR-reaktiota. Saadut raskaan ketjun fragmentit, jotka alkoivat kehyksestä 1 ja ulottuivat alueen CH1 päähän ja joissa oli sattumanvaraisesti mutagenisoidut CDR3-alueet, olivat pituudeltaan noin 790 emäsparia. Raskaan ketjun fragmentin monistustuotteet 15 reaktiosta koottiin ensiksi pooliksi ja sitten geelipuhdistettiin edellä kuvatulla tavalla. Kokonais-DNA-saanto kustakin monistuksesta oli noin 3 µg/100 µl, joten kokonaispoolisaanto sisälsi noin 45 µg monistettua mutagenisoitua raskasta ketjua.

b. Fagomidikirjaston rakentaminen

Saadut esimerkissä 6a valmistetut geelipuhdistetut raskaan ketjun fragmentit digeroitiin sitten restriktioentsyymeillä Xho I ja Spe I, kuten esimerkissä 2d kuvattiin. Saadut digeroidut raskaan ketjun fragmentit puhdistettiin sitten geelillä ennen niiden insertiota pC3-TT7E -fagomidivektoriklooniin, joka oli aikaisemmin digeroitu samoilla restriktioentsyymeillä mutagenisoitumattoman raskaan ketjun fragmentin poistamiseksi ja lineaarisen vektorin muodostamiseksi. Suoritettiin ligaatio yön yli huoneenlämpötilassa 640 ng:lle raskaan ketjun Xho I-Spe I -fragmentteja, joissa oli mutagenisoituja CDR3-alueita, 2 µg:aan linearisoitua pC3-TT7E-fagomidivektoria rengasmaisten vektorien, joissa oli mutagenisoituja CDR3-alueita, muodostamiseksi käyttäen 10 yksikköä BRL-ligaasia (Gaithersburg, MD) BRL-ligaasipuskurissa 150 µl:n reaktiotilavuudessa. Suoritettiin 5 erillistä ligaatiota faagikirjaston, jossa oli mutagenisoituja CDR3-alueita, koon suurentamiseksi. Siten kokonaismäärä monistettua mutagenisoitua raskasta ketjua 5 ligaatioreaktiosta oli 3,2 µg. Ligaatioreaktioiden jälkeen rengasmaiseksi tehtyä DNA:ta saostettiin -20 °C:ssa 2 tuntia seoksella, jossa oli 2 µl 20 mg/ml glykogeenia, 15 µl 3 M natriumasetaattia pH:ssa 5,2 ja 300 µl etanolia. Sitten DNA pelletoitiin sentrifugoimalla 15 minuuttia 4 °C:ssa. DNA-pelletti pestiin kylmällä 70 % etanolilla ja kuivattiin tyhjiössä. Pelletti lietettiin takaisin 10 µl:aan vettä ja transformoitiin sähköporaatiolla 300 µl:aan E. coli XL1-Blue -soluja, kuten esimerkissä 2k kuvattiin, faagikirjaston muodostami-

seksi. Kokonaissaanto tässä kuvatusta mutageneesi- ja transformaatioprosessista oli noin 5 x 10^7 transformanttia. E. colista peräisin olevat XL1-Blue -solut valittiin isänniksi, koska ainoa lopetuskodoni TAG on poistettu.

Transformaation jälkeen faagin, jolla heterodimeerin ekspressio on indusoitu, eristämiseksi seuraavaa seulontaa varten kohdeantigeenilla, kuten fluoreseiinilla, 3 ml SOC-väliainetta (SOC valmistettiin sekoittamalla 20 g baktotryptonia, 5 g hiivauutetta ja 0,5 g NaCl 1 litraan vettä, säätämällä pH arvoon 7,5 ja lisäämällä 20 ml glukoosia juuri ennen käyttöä Fd-cpIII:n ja kevyen ketjun heterodimeerin ekspression indusoimiseksi) sekoitettiin ja viljelyä ravisteltiin 220 kierroksella/min 1 tuntia 37 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 10 ml SB:tä (SB valmistettiin sekoittamalla 30 g tryptonia, 20 g hiivauutetta ja 10 g MOPS-puskuria/litra ja pH säädettiin arvoon 7), joka sisälsi 20 µg/ml karbenisilliiniä ja 10 µg/ml tetrasykliiniä ja seosta ravisteltiin 300 kierroksella/min vielä 1 tunti. Näin saatu seos lisättiin 100 ml:aan SB:tä, joka sisälsi 50 µg/ml karbenisilliiniä ja 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja ravisteltiin 1 tunti, minkä jälkeen siihen sekoitettiin auttaja-faagia VCSm13 (10^{12} pfu) ja seosta ravisteltiin vielä 2 tuntia. Tämän ajan jälkeen siihen sekoitettiin 70 µg/ml kanamysiiniä ja annettiin olla 30 °C:ssa yön yli. Alhaisemman lämpötilan tuloksena heterodimeeri tarttui paremmin faagin pintaan. Supernatantti kirkastettiin sentrifugoimalla (4 000 kierrosta/min 15 minuuttia JA10-roottorissa 4 °C:ssa). Faagi saostettiin lisäämällä 4 % (paino/til.) polyeteeniglykoli 8000:ta ja 3 % (paino/til.) NaCl ja seosta pidettiin jään päällä 30 minuuttia, minkä jälkeen se sentrifugoitiin 9 000 kierrosta/min 20 minuuttia Ja10-roottorissa 4 °C:ssa. Faagipelletit suspendoitiin uudelleen 2 ml:aan PBS:ää ja mikrosentrifugoitiin 3 minuuttia pellettijäännöksiksi, siirrettiin uusiin putkiin ja säilytettiin -20 °C:ssa myöhempää seulontaa varten, kuten tuonnempana kuvataan.

Pesäkkeitä muodostavien yksikköjen (cfu) tiitterin määrittämiseksi faagi (pakattu fagomidi) laimennettiin SB:hen ja 1 µl sitä käytettiin infektoimaan 50 µl tuoreita (OD600 = 1) E. coli XL1-Blue -soluja, jotka oli kasvatettu SB:ssä, joka sisälsi 10 µg/ml tetrasykliiniä. Faagia ja soluja pidettiin huoneenlämpötilassa 15 minuuttia ja sitten ne pantiin suoraan LB/karbenisilliini-levyille.

c. Anti-fluoreseiiniheterodimeerien valikointi faagipinnoilla

1) Faagikirjaston, jossa on mutagenisoituja CDR3-alueita, moninkertainen huuhdonta

Faagikirjasto, joka valmistettiin esimerkissä 6b ja jossa oli raskaan ketjun fragmentteja mutagenisoituine CDR3-alueineen, huuhdottiin kuten tässä kuvataan mikrotiitterilevyllä, joka oli päällystetty 50 µg/ml fluoreseiini-BSA-konjugaattia, anti-fluoreseiiniheterodimeerien seulomiseksi. Fluoreseiini konjugoitiin BSA:han menetelmien mukaan, joita kuvataan teoksessa Antibodies: A Laboratory Manual, toim. Harlow ym., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Huuhdontamenettely oli muunnos alkuperäisestä, jota kuvaavat Parmley ja Smith (Parmley ym., Gene, 73:30-5-318). Mikrotiitterilevyn (Costar 3690) 2-4 kuoppaa päällystettiin yöksi 4 °C:ssa 25 µl:lla 50 µg/ml TT-antigeenia, joka valmistettiin edellä, 0,1 M bikarbonaatissa, pH 8,6. Kuopat pestiin kahdesti vedellä ja suojattiin täyttämällä kuoppa 3 % (paino/til.) BSA:lla PBS:ssä ja pitämällä levy 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. Kun suojausliuos oli ravistettu pois, 50 µl edellä valmistettua faagikirjastoa (yleensä 10^{11} cfu) sekoitettiin kuhunkin kuoppaan ja levyä pidettiin 2 tuntia 37 °C:ssa.

Faagit poistettiin ja levy pestiin kerran vedellä. Sitten kukin kuoppa pestiin 10 kertaa TBS/Tween'illä (50 mM Tris-Hcl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween 20) 1 tunnin kuluessa huoneenlämpötilassa, jolloin pesu käsitti pipetoimisen edestakaisin kuopan pesemiseksi niin, että kuoppa jäi joka kerran täyteen TBS/Tween'iä pesujen välillä. Levy pestiin vielä kerran tislatulla vedellä ja tarttunut faagi eluoitiin lisäämällä 50 µl eluointipuskuria (0,1 M HCl, pH säädetty arvoon 2,2 kiinteällä glysiinillä, sisälsi mg/ml BSA) kuhunkin kuoppaan, minkä jälkeen pidettiin huoneenlämpötilassa 10 minuuttia. Eluointipuskuria pipetoitiin ylös ja alas useita kertoja, se poistettiin ja suoritettiin neutralointi 3 µl:lla 2 M Tris-emästä/50 µl käytettyä eluointipuskuria.

Eluoituja faageja käytettiin infektoimaan 2 ml tuoreita (OD_{600} = 1) E. coli XL1-Blue -soluja 15 minuuttia huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen sekaan lisättiin 10 ml SB:tä, joka sisälsi 20 µg/ml karbenisilliiniä ja 10 µg/ml tetrasykliiniä. Viljelystä otettiin 20, 20 1/10 µl:n eriä pantavaksi levylle faagien (pakatun fagomidin), jotka olivat eluoituneet levyltä, lukumäärän mittaamiseksi. Viljelyä ravisteltiin 1 tunti 37 °C:ssa, minkä jälkeen se lisättiin 100 µl:aan SB:tä, joka sisälsi 50 µg/ml karbenisilliiniä ja 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja ravisteltiin 1 tunti. Sitten lisättiin auttaja-

faagia VCSM13 (10^{12} cfu) ja viljelyä ravisteltiin vielä 2 tuntia. Tämän ajan jälkeen lisättiin 70 µg/ml kanamysiiniä ja viljelyä inkuboitiin 37 °C:ssa yön yli. Faagin valmistus ja edelleen huuhdonta toistettiin kuten edellä kuvattiin.

Kunkin huuhdontajakson jälkeen määritettiin faagisaanto prosentteina, jolloin saanto-% = (eluoituneiden faagien lukumäärä/käytettyjen faagien lukumäärä) x 100. Alkuperäinen faagin syöttömäärä määritettiin titraamalla selektiivisillä levyillä, kuten esimerkissä 6b kuvattiin, noin 10^{11}:ksi kussakin huuhdontajaksossa. Lopullinen faagituotos määritettiin infektoimalla 2 ml logaritmisessa kasvuvaiheessa olevia XL1-Blue -soluja, kuten edellä kuvattiin, ja sijoittamalla eriä selektiivisille levyille.

Vaihtoehtona hapolla eluoinnille mikrotiitterilevyn kuoppiin sitoutuneita faageja eluoitiin lisäämällä 50 µg/ml liuosta, jossa oli 10^{-5} M fluoreseiinia laimennettuna PBS:ään, minkä jälkeen pidettiin 1 tunti 37 °C:ssa. Sitten liuosta pipetoitiin ylös ja alas kuoppien pesemiseksi. Saatu eluaatti siirrettiin 2 ml:aan tuoreita E. coli XL1-Blue -soluja infektointia varten, kuten edellä kuvattiin, faagien valmistamiseksi ja niiden edelleen huuhtomiseksi.

Peräkkäisissä huuhdontasykleissä faageja eluoitiin 10^{-6} M fluoreseiinilla.

Tulokset faagien, jotka sitoutuivat spesifisesti fluoreseiinilla päällystettyihin kuoppiin 4 peräkkäisessä huuhdonta- ja hapolla tai fluoreseiinilla yksinään suoritetussa eluointijaksossa, määrästä on esitetty alla taulukossa 8. Vertailukelpoisia saantoja faageista, joilla heterodimeerit ekspressoituivat ja jotka sitoutuivat spesifisesti fluoreseiiniin, saatiin kummallakin eluointimenettelyllä. Nämä tiedot vahvistavat sen, että CDR3-alueen mutageneesi tässä keksinnössä kuvatulla tavalla tuotti tulokseksi heterodimeerin, joka alunperin sitoutui spesifisesti TT:hen, muuttumisen sellaiseksi, joka sitoutui spesifisesti fluoreseiiniin.

Taulukko 8

	Eluoitunut faagi	
	Happoeluutio	**Fluoreseiinieluutio**
sykli 1	5,6 x 10^5/kuoppa	4,7 x 10^5/kuoppa
sykli 2	4,6 x 10^6/kuoppa	5,6 x 10^5/kuoppa
sykli 3	3,8 x 10^5/kuoppa	1,4 x 10^6/kuoppa
sykli 4	1,3 x 10^6/kuoppa	4,0 x 10^6/kuoppa

Ei-spesifinen sitoutuminen tähän pintaan vertailufaagilla vaihteli 10^4-10^5 kuoppaa kohti. Liukoisen Fab'in tuottaminen ja sitoutumisen fluoreseiiniin tarkistaminen ELISAlla, kuten kohdassa 2) kuvataan, paljasti 8 reaktiivista kloonia 60:sta muunnetuista pesäkkeistä sattumanvaraisesti valitusta kloonista ja 38 reaktiivista kloonia 40:sta muunnetuista pesäkkeistä sattumanvaraisesti valitusta kloonista peräkkäisissä happoeluutioissa ja fluoreseiinieluutioissa, vastaavasti.

2) Liukoisten heterodimeerien valmistaminen fluoreseiiniin sitoutumisspesifisyyden karakterisoimiseksi

Faagin pinnalla edellä kuvatulla tavalla ekspressoituneiden mutagenisoitujen heterodimeerien spesifisyyden edelleen karakterisoimiseksi valmistettiin liukoisia Fab-heterodimeerejä sekä hapolla eluoiduista että fluoreseiinilla eluoiduista faageista ja analysoitiin ELISA-kokeilla fluoreseiinilla päällystetyillä levyillä, kompetitiivisella ELISAlla käyttäen kasvavia konsentraatioita liukoista fluoreseiini-BSA:ta ja myös fluoreseiinisammutuskokeilla. Viimeksi mainitut kokeet suoritettiin kuten kuvataan julkaisussa "Fluorescein Hapten: An Immunological Probe", toim. E.W. Voss, CRC Press, Inc., ss. 52-54, 1984.

Liukoisten heterodimeerien valmistamiseksi fagomidi-DNA eristettiin positiivisista klooneista ja digeroitiin Spe I:llä ja Nhe I:llä. Digerointi näillä entsyymeillä tuotti yhteensopivia kohesiivisia päitä. 4,7 kb DNA-fragmentti, josta puuttui geenin III osa, geelipuhdistettiin (0,6 % agaroosi) ja sille suoritettiin itseohjautuva ligatointi. E. coli XL1-Blue -solujen muuntaminen tuotti rekombinanttien, joista puuttui cpIII-fragmentti, eristymisen. Kloonit tutkittiin cpIII-fragmentin poistamista varten Xho I-Xba I -digeroinnilla, jonka oli määrä antaa 1,6 kb fragmentti. Klooneja kasvatettiin 100 ml:ssa SB:tä, joka sisälsi 50 µg/ml karbenisilliiniä ja 20 mM $MgCl_2$, 37 °C:ssa, kunnes saatiin OD_{600} 0,2. IPTG:tä (1 mM) lisättiin ja viljelyä kasvatettiin yön yli 30 °C:ssa (kasvattaminen 37 °C:ssa antaa vain vähäisen alenemisen heterodimeerisaannossa). Solut pelletoitiin sentrifugoimalla 4000 kierroksella/min 15 minuuttia JA10-roottorissa 4 °C:ssa. Solut suspendoitiin uudelleen 4 ml:aan PBS:ää, joka sisälsi 34 µg/ml fenyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF) ja lysoitiin sonikoimalla jään päällä (2-4 minuuttia 50 % hyötyteholla). Jäännökset pelletoitiin sentrifugoimalla 14 000 kierroksella/min JA20-roottorissa 4 °C:ssa 15 minuuttia. Supernatanttia käytettiin suoraan ELISA-analyysiin alla kuvatulla tavalla ja se säilytettiin -20 °C:ssa. Suuren kloonimäärän tutkimista varten 10 ml:n viljelyt tuottivat riittävästi heterodimeeriä analyysiä varten. Tässä tapauksessa sonikoinnit suoritettiin 2 ml:ssa puskuria.

Edellä valmistetut liukoiset heterodimeerit analysoitiin ELISAlla. Tätä analyysiä varten 1 µg/ml fluoreseiini-BSA-liuosta lisättiin mikrotiitterilevyn yksittäisiin kuoppiin ja levyjä pidettiin 4 °C:ssa yön yli, jotta proteiiniliuos pääsi tarttumaan kuopan seinämiin. Pitoajan jälkeen kuopat pestiin kerran PBS:llä ja sen jälkeen niitä pidettiin 3 %-prosenttisessa BSA-liuoksessa ei-spesifisten kohtien suojaamiseksi kuopissa. Levyjä pidettiin 37 °C:ssa 1 tunti, minkä jälkeen levyt käännettiin nurin ja niitä ravisteltiin BSA-liuoksen poistamiseksi. Edellä valmistetut liukoiset heterodimeerit lisättiin sitten kuhunkin kuoppaan ja niitä pidettiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan immuunireaktiotuotteiden muodostamiseksi. Pitoajan jälkeen kuopat pestiin 10 kertaa PBS:llä sitoutumattoman liukoisen vasta-aineen poistamiseksi ja sitten niitä pidettiin sekundaarisen vuohen anti-ihmis-Fab'in kanssa, joka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin, laimennettuna PBS:ään, joka sisälsi 1 % BSA:ta. Kuoppia pidettiin 37 °C:ssa 1 tunti, minkä jälkeen kuopat pestiin 10 kertaa PBS:llä ja sen jälkeen kehitettiin p-nitrofenyylifosfaatilla (PNPP).

Edellä ELISAlla määritellyt immunoreaktiiviset heterodimeerit analysoitiin sitten kompetitiivisella ELISAlla mutagenisoitujen heterodimeerien affiniteetin määrittämiseksi. ELISA suoritettiin edellä kuvatulla tavalla lisäämällä kasvavia pitoisuuksia liukoista fluoreseiini-BSA:ta konsentraation ulottuessa 10^{-9} M:sta 10^{-5} M:iin sekoitettuna liukoisten heterodimeerien läsnäollessa. Maksimaalinen sitoutumisen esto saatiin aikaan konsentraatiolla 10^{-6} M vapaata antigeenia ja puoleksi maksimaalinen esto saatiin konsentraatiolla noin 10^{-7} M vapaata antigeenia. Kaikista klooneista ekspressoituneiden vasta-aineiden likimääräinen dissosiaatiovakio (Kd) oli alueella 10^{-7} - 10^{-8} M, kun kysymyksessä olivat fluoreseiini-BSA-konjugaatit, sekä fluoreseiini- että happoeluutiossa. Todelliset Kd:t määritettiin fluoreseiinisammutusanalyyseillä. Faageilla klooneista ekspressoituneilla vasta-aineilla, joille sen jälkeen suoritettiin fluoreseiinieluointi, oli suurempi affiniteetti fluoreseiiniin, 10^{-7} M versus 10^{-6} M, joka saatiin hapolla eluoiduilla vasta-aineilla. Emokloonissa, 7E, ei esiintynyt kokeessa sammumista detektoitavissa rajoissa, mikä antaa aiheen olettaa, että affiniteetti vapaaseen fluoreseiiniin oli alhaisempi kuin 10^{-5} M. Tiukimmin sitoutuvien vasta-aineiden affiniteetti fluoreseiiniin (10^{-7} M) läheni immunisoitujen hiirien sekundaarisen vasteen keskimääräistä Kd:tä vapaaseen fluoreseiiniin (10^{-7} M), kuten ovat osoittaneet Kranz ym., Mol. Immunol., 20:1313-1322 (1983).

Siten tämän keksinnön mukaiset mutagenisoidut heterodimeerit spesifisesti tunnistivat fluoreseiinin ja sitoutuivat siihen. Lisäkokeita suoritettiin sen vahvistamiseksi, että mutagenisoidut heterodimeerit eivät enää tunnistaneet TT:tä, johon mutagenisoimattomat heterodimeerit alunperin sitoutuivat. Fluoreseiinisammutuskokeita suoritettiin

myös mutagenisoitujen heterodimeerien sitoutumisspesifisyyden vahvistamiseksi. Liukoiset heterodimeerit, jotka valmistettiin faagista ja joita ei eluoitu sen enempää hapolla kuin fluoreseiinillakaan yksinään, olivat yhtä tehokkaita fluoreseiiniin sitoutumisessa millä tahansa edellä mainitusta lähestymistavoista. Tässä kuvattu jonkin heterodimeerin raskaan ketjun CDR3-alueen mutagenisoimisen keksiminen johti siis sitoutumisspesifisyyden muuttumiseen TT:stä fluoreseiiniin.

d. Valikoitujen anti-fluoreseiiniheterodimeerien sekvenssianalyysi

Määritettiin edustavan lukumäärän fluoreseiini-BSA:han sitoutuvia klooneja mutatoidun raskaan ketjun täydellinen nukleotidisekvenssi. Mitään PCR-indusoituja mutaatioita CDR3-alueen ulkopuolella ei havaittu. Raskaan ketjun CDR3-alueen ennakoidut aminohapposekvenssit on esitetty kuviossa 13, vastaavien SEQ ID -numeroitten ollessa sulkeissa. 7:llä happoeluutiosysteemistä talteenotetulla kloonilla ei ollut konsensus-sekvenssiä. Konsensus-käyttäytymisen puutteeseen hapolla eluoiduissa klooneissa saattaa osaltaan vaikuttaa se, että ne tunnistavat monimutkaisemman epitoopin, joka muodostuu fluoreseiinista ja BSA:sta, ja se heijastuu erilaisemmissa affiniteeteissa fluoreseiiniin ja fluoreseiini-BSA:han.

Sitä vastoin klooneilla, jotka eristettiin fluoreseiinieluutiolla, oli suuri valikoima konsensus-sekvenssejä. Sekvenoiduista 10 kloonista todettiin vain 3 erilaista sekvenssiä. Kaikissa klooneissa oli glysiinitähde aminohappotähdeasemassa 95 ja aspartiinihappotähde asemassa 101. Aminohappotähdeasemat perustuvat Kabatin numerointisysteemiin, jota kuvaavat Kabat ym., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, (1987). Molempia mahdollisia kodoneja glysiinitähteen koodaamista varten, jotka saatiin synteesimenettelyllä, jossa tuotettiin kaikki 32 mahdollista kodonia, käytettiin. Luonnon vasta-aineissa aspartiinihappotähde asemassa 101 näyttelee tavallisesti rakenteellista osaa muodostamalla suolasillan asemassa 94 olevan arginiinihappotähteen kanssa kehysalueella 3 (FR3). Siten keinotekoinen valikointiprosessi oli palauttanut rakenteen kannalta merkityksellisen vuorovaikutuksen, joka heijastaa eläimissä tavattua.

Lisäksi 9 10:stä kloonista ekspressoitunutta puolisynteettistä vasta-ainetta sisälsi seriini-arginiini-proliini-triplettisekvenssin lähellä silmukan keskustaa suoraan arginiinitähteen vieressä tai yhden tähteen päässä siitä aminoterminaalisella puolella, vaikka kodonien käyttö näiden tähteiden osalta oli erilaista. Kloonista F31 puuttui tämä keskijakso. Kaikissa sekvensseissä oli runsaasti arginiinitähteitä, joita koodasivat 3 32:sta mahdollisesta kodonista. Arginiinin esiintymisen 10 erilaisessa CDR3-sekvenssissä vertailu leusiinin ja seriinin esiintymiseen, joita myös koodasivat 3

mahdollista kodonia synteesissä, paljasti arginiini-leusiini-seriinisuhteeksi 29:16:15. Tämä vinoutuma arginiinin valintaan päin saattaa olla tulosta fluoreseiinin dianionisesta luonteesta.

Havainto eri kodonien käytöstä tukee ajatusta, että klooniselektio tapahtui antigeenivasta-aine-liitynnän tasolla eikä jonkin odottamattoman virheen vuoksi nukleotidin inkorporaatiossa DNA:han.

7. Anti-tetanustoksoidia koodaava kevyen ketjun CDR3-alueen sattumanvaraisen mutagenisointi

a. PCR-mutageneesi degeneroituneilla oligonukleotideilla

Noudattaen samanlaista menettelytapaa kuin mutagenisoitaessa sattumanvaraisesti raskasta ketjua esimerkissä 6 kuvatulla tavalla anti-tetanustoksoidille spesifisen fagomidikloonin pC3-TT7E kevyen ketjun fragmentin CDR3-alue mutagenisoitiin sattumanvaraisesti sellaisten vasta-aineiden, joilla on spesifisyyttä fluoreseiiniin, tuottamiseksi. PCR-monistukset suoritettiin kuten esimerkissä 6a kuvataan, sillä poikkeuksella että reaktioissa käytettiin oligonukleotidialukkeita.

Ensimmäisen PCR-reaktion tuloksena monistui pC3-TT7E-kloonissa kevyen ketjun fragmentin alue vektorin 5'-pään EcoR V -kohdasta CDR3-alueen 5'-päähän. Tämän alueen monistamiseksi käytettiin seuraavia alukkeita: 5'-anti-sense-oligonukleotidialuke, KEF, jolla on nukleotidisekvenssi 5'-GAATTCTAAACTAGCTAGTCG-3' (SEQ ID NO 126), joka oli hybridisoitunut kevyen ketjun koodaamattomaan säikeeseen, joka vastasi EcoR V -kohtaa vektorissa; 3'-sense-oligonukleotidialuke, KV12B, jolla on nukleotidisekvenssi 5'-ATACTGCTGACAGTAATACAC-3' (SEQ ID NO 127), joka oli hybridisoitunut raskaan ketjun koodaavaan säikeeseen, joka vastasi CDR3:n 5'-päätä. PCR-monistaminen suoritettiin kuten kuvataan esimerkissä 6a. Saadut PCR-tuotteet geelipuhdistettiin sitten esimerkissä 1d kuvatulla tavalla ja niitä käytettiin overlap-pidennys-PCR-reaktiossa toisen PCR-reaktion tuotteiden kanssa, molemmat kuten alla kuvataan, näiden kahden tuotteen yhdistämiseksi rekonstruoiduiksi raskaiksi ketjuiksi, jotka sisältävät mutagenisoituja CDR3-alueita, kuten kuviossa 12 esitetään.

Toisen PCR-reaktion tuloksena monistui kevyt ketju CDR3-alueen 5'-päästä CH1-alueen päähän asti. Tämän alueen monistukseen käytettiin seuraavia alukkeita. 5'-anti-sense-oligonukleotidialukepoolilla, jota merkittiin KV5R:llä, oli nukleotidisekvenssi, jota edustaa kaava

5'-TATTACTGTCAGCAGTATNNKNNKNNKNNKNNKACTTTCGGCGGAGGGACC-3' (SEQ ID NO 128), jossa N voi olla A, C, G tai T ja jossa K on joko G tai T, jossa alukepoolin 5'-pää oli komplementaarinen CDR3:n 5'-päälle ja alukepoolin 3'-pää oli komplementaarinen CDR3:n 3'-päälle ja kehyksen 4 5'-päälle. Aluetta alukepoolin kahden spesifioidun pään välissä edusti 15-meerinen degeneroitunut sekvenssi, joka viime kädessä koodasi 5 aminohapon pituisten sisäisten mutagenisoitujen CDR3-alueiden diverssiä populaatiota, jota reunustivat CDR3-alueiden mutagenisoitumattomat 5'- ja 3'-päät. 3'-sense-oligonukleotidialuke, T7B, jolla oli nukleotidisekvenssi 5'-AATACGACTCACTATAGGGCG-3' (SEQ ID NO 129), hybridisoitui koodaavaan säikeeseen, joka vastasi T7-aluetta vektorissa. Toinen PCR-reaktio suoritettiin käyttäen pC3-TT7E:tä, kuten esimerkissä 6a kuvataan KV5R- ja T7B-alukkeilla. Saadut PCR-monistustuotteet puhdistettiin sitten geelillä edellä kuvatulla tavalla.

Sitten 500 ng geelipuhdistettuja tuotteita ensimmäisestä ja toisesta PCR-reaktiosta sekoitettiin 1 µg:aan kutakin oligonukleotidialukkeista KEF ja T7B, jotka olivat alukeparina viimeisessä PCR-reaktiossa täydellisen kevyen ketjun fragmentin muodostamiseksi overlap-pidennyksellä, kuten kuviossa 12 on esitetty. PCR-monistus suoritettiin kuten esimerkissä 6a kuvataan. Jotta saatiin riittävä määrä monistustuotteita, suoritettiin 5 samanlaista PCR-reaktiota. Saaduissa kevyen ketjun fragmenteissa, jotka alkoivat 5'-pään EcoR I -kohdasta ja ulottuivat T7-alueelle, oli viisi sisäisesti sattumanvaraisesti mutagenisoitua aminohappoa CDR3-alueella.

b. Fagomidikirjaston rakentaminen

Saatuja esimerkissä 7a valmistettuja geelipuhdistettuja kevyen ketjun fragmentteja digeroitiin sitten restriktioentsyymeillä Sac I ja Xba I, kuten esimerkissä 2d kuvataan. Saadut kevyen ketjun fragmentit puhdistettiin sen jälkeen geelillä ennen niiden ligatoimista pC3-TT7E-fagomidivektoriklooniin, joka oli aikaisemmin digeroitu samoilla restriktioentsyymeillä mutagenisoimattoman kevyen ketjun fragmentin poistamiseksi ja lineaarisen vektorin muodostamiseksi. 450 ng:n kevyen ketjun monistustuotteita ligatointi 1,4 µg:aan linearisoitua pC3-TT7E-fagomidivektoria rengasmaisiksi tehtyjen vektoreiden, joissa oli mutagenisoituja CDR3-alueita, muodostamiseksi suoritettiin kuten esimerkissä 6b kuvataan. Suoritettiin 5 erillistä ligaatioreaktiota faagikirjaston, jossa oli sisäisesti mutagenisoituja CDR3-alueita, koon suurentamiseksi. Ligatointireaktioiden jälkeen rengasmaiseksi tehty DNA saostettiin ja transformoitiin E. coli XL1-Blue -soluihin, kuten esimerkissä 6b kuvataan, faagikirjaston muodostamiseksi. Kokonaissaanto tässä kuvatusta mutageneesi- ja transformaatioprosessista

oli noin 2 x 10^7 transformanttia. Faagit eristettiin kuten kuvataan raskaan ketjun mutageneesitransformanttien yhteydessä.

c. Anti-fluoreseiiniheterodimeerien valikoiminen faagipinnoilla ja valikoitujen vasta-aineiden sekvenssianalyysi

Faagikirjasto, joka tuotettiin esimerkissä 7b ja jossa oli kevyen ketjun fragmenttejä, joissa oli 5 sisäisesti mutagenisoitua aminohappoa CDR3-alueella, huuhdottiin kuten esimerkissä 6c kuvataan. Faagien, jotka sitoutuivat spesifisesti fluoreseiinilla päällystettyihin kuoppiin kolmessa peräkkäisessä huuhdontasyklissä ja hapteenilla eluoinnissa faagin syöttömäärän ollessa 10^{11}, lukumäärät olivat 0,75 x 10^6, 1 x 10^6 ja 2,4 x 10^7. Toistetut transformointi-, faaginvalmistus-, huuhdonta- ja eluointisyklit antoivat siis tulokseksi spesifisesti fluoreseiiniin sitoutuvien heterodimeerien merkittävän rikastumisen. Liukoisia Fab-palasia valmistettiin esimerkissä 6b 2) kuvatulla tavalla sitoutumisspesifisyyden fluoreseiiniin karakterisointia varten. Esimerkissä 6d kuvattua sekvenssianalyysiä varten valittiin 7 kloonia. Sekvenssianalyysin tulokset on esitetty kuviossa 14. Kevyen ketjun mutatoitu CDR3-alue ulottuu Kabatin aminohappoimmunoglobuliinin kevyen ketjun asemasta 92 asemaan 96. Tämän alueen sekvenssi alkaen lähtökloonista pC3-TT7E oli Gly-Ser-Ser-Leu-Trp (SEQ ID NO 148). 7:stä mutatoidusta ja fluoreseiinilla valikoidusta vasta-aineesta 5:llä, jotka olivat peräisin klooneista P2, P21, P23, P28 ja P19, oli aminohapposekvenssi Thr-Arg-Pro-Gly-Val (SEQ ID NO 149), mutta jokainen niistä oli tulosta translaatioista ainutlaatuisista nukleotidisekvensseistä. Kahdella jäljelle jäävällä vasta-aineella, jotka olivat peräisin klooneista P15 ja P11, jotka oli johdettu ainutlaatuisista nukleotidisekvensseistä, oli myös ainutlaatuiset nukleotidisekvenssit. Niinpä koska suurimmalla osalla mutagenisoituja kevyitä ketjuja oli sama aminohapposekvenssi, jota koodasivat mahdolliset kodonit synteesissä, keinotekoinen seulontaprosessi oli palauttanut rakenteen kannalta merkityksellisen interaktion, joka eläimessä on tuloksena luonnollisen valinnan prosessista.

CDR-alueiden mutageneesi ei rajoitu CDR3-alueisiin, sillä alukkeita voidaan rakennella sekä raskaan ketjun että kevyen ketjun CDR1:n ja CDR2:n sattumanvaraista mutagenisointia varten. Kaikkien kuuden CDR-alueen mutatoinnin seurauksena olisi poikkeuksellisen monimuotoinen kirjasto, jonka diversiteetti ylittäisi sen, mitä eläimessä voidaan saada aikaan. Kaikkien CDR-alueiden sattumanvaraistamiseksi raskaan ketjun CDR:t voitaisiin ensiksi sattumanvaraistaa alkaen lähtökloonista, minkä jälkeen valikoitaisiin parhaat vasta-ainesitojat. Toinen mutagenisointivaihe voitaisiin suorittaa kevyen ketjun CDR-alueilla ja saatu kirjasto voitaisiin sekoittaa valikoituihin raskaan ketjun sitojiin. Vaihtoehtoisesti kaikki CDR:t voitaisiin sattuman-

varaistaa samanaikaisesti, jolloin tuloksena olisi raskaan ketjun ja kevyen ketjun kirjastot, jotka sitten yhdistettäisiin ja joille suoritettaisiin valikointi jotakin ennalta valittua antigeenia vastaan.

Esimerkit 6 ja 7 kuvaavat siis esillä olevan keksinön mukaista menetelmää jonkin immunoglobuliinigeenin raskaan ketjun ja kevyen ketjun komplementaarisuutta määrittävien alueiden (CDR) mutagenisoimiseksi ja ne kuvaavat myös oligonukleotideja, joita siihen voidaan käyttää.

8. Vasta-aineiden in vitro seulonta alkuperäisestä kombinatorisesta immunoglobuliinikirjastosta ja niiden affiniteetin kypsyttäminen

Kombinatoriseen immunoglobuliinikirjastoon liittyvää lähestymistapaa käytettiin monoklonaalisten vasta-aineiden saamiseksi ei-immuuneista täysikasvuisista hiiristä, samalla luomalla periaatteet (i) pääsemiseksi käsiksi alkuperäisiin kombinatorisiin vasta-ainekirjastoihin ennalta määrättyjä spesifisyyksiä silmällä pitäen ja (ii) valikoitujen vasta-aineen sitomispaikkojen affiniteetin lisäämiseksi sattumanvaraisen mutageneesin avulla. Kombinatorinen Fab-kirjasto, joka ekspressoi Igμ ja k-kevytketjun fragmentteja filamenttifaagin pinnalla, valmistettiin immunisoimattomien täysikasvuisten Balb/c-hiirien luuytimestä multivalenssisen vektorin pComb8, joka valmistettiin esimerkissä 1b(i), avulla. Faagi, jossa oli alhaisen affiniteetin omaavia Fab'eja, joiden sitomisvakiot olivat noin 10^4 - 10^5 M^{-1} ja jotka olivat spesifisiä progesteronille, eristettiin kirjastosta niiden kyvyn mukaan sitoutua hapteeniin. Raskaan ketjun ja kevyen ketjun vaihtelevien alueiden, jotka ekspressoituivat monovalenssisessa vektorissa pComb8, sattumanvarainen mutagenisointi suoritettiin virhealttiilla PCR:llä. Sen jälkeen valikoitiin klooneja, joilla oli parantunut affiniteetti progesteroniin. Siten, kuten tässä kuvataan, ei-imuunista lähteestä valikoitiin vasta-aineita, joilla oli haluttuja ominaisuuuksia ja niiden affiniteetin kypsyttäminen suoritettiin käyttäen kahta vektoria pComb8 ja pComb3, avaten siten tien spesifisten vasta-aineiden saamiselle geneerisestä kirjastosta ja immunisoinnin ohittamiselle.

Tässä kuvatulla keksinöllä on kolme olennaista piirrettä: (i) sen avulla päästään käsiksi alhaisen affiniteetin omaaviin Fab'eihin käsittelemättömässä kirjastossa käyttämällä multivalenssisia faagiekspressiosysteemejä, (ii) sen jälkeen affiniteetti kypsytetään virhealttiilla PCR:llä ja (iii) käytetään yksinkertaista ketjurakennetta kypsytysprosessin aikana keinotekoisen sitomisen korkean taustan välttämiseksi kevyen ketjun häviön seurauksena. Yhdessä käytettyinä nämä menetelmät antoivat mahdollisuuden vasta-aineiden valikoimiseen ja niiden affiniteetin kypsyttämiseen käsittelemättömästä kirjastosta.

a. RNA-eristys ja cDNA-synteesi

Kolmea immunisoimatonta täysikasvuista koiraspuolista (6 kuukauden ikäistä) Balb/cByJ-hiirtä (Scrippsin kasvatuskolonia) käytettiin 5 x 10^7 luuydinsolun valmistamiseen 4-prosenttisessa vasikan sikiön seerumissa PBS:ssä. Pinta-IgG-positiivisten solujen pilkkomiseksi valmistetta pidettiin rotan-anti-hiiri-IgG_{2b}:ssä (0,1 ml), vuohen anti-hiiri-IgG:ssä (0,1 ml) ja kaniinin anti-hiiri-IgG_{2b}:ssä (0,1 ml) 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Solut pelletoitiin, pestiin PBS:llä ja suspendoitiin uudelleen 9 ml:aan PBS:ää. Kaniinin komplementti lisättiin (1 ml) ja seosta pidettiin 37 °C:ssa 30 minuuttia. Solut pelletoitiin ja kokonais-RNA eristettiin, kuten esimerkissä 2b kuvataan. Kokonais-RNA:ta käytettiin templaattina cDNA-synteesissä µ- ja k-ketjuille seuraavien alukkeiden kanssa:

IGµ, 5'-ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGAAT-3' (SEQ ID NO 151) (Spe I -restriktiopaikan sekvenssi on alleviivattu) ja

k, 5'-GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA-3 (SEQ ID NO 152) (Xba I -restriktiokohta on alleviivattu) vastaavasti, käyttäen SuperScript Kit'iä (BRL).

Lyhyesti sanottuna 7 µg kokonais-RNA:ta sekoitettiin 60 pmol:iin aluketta, kuumennettiin 70 °C:ssa 10 minuuttia ja jäähdytettiin välittömästi jäällä. 2 µl RNase-inhibiittoria, 10 µl 5 x synteesipuskuria, 8 µl dNTP-seosta (jolloin loppukonsentraatioksi saatiin 200 µM kutakin NTP:tä), 5 µl 0,1 M DTT:tä ja 1 µl BRL SuperScript RT:tä (200 U/µl) sekoitettiin ja reaktio täydennettiin 50 µl:aan DEPC:llä käsiteltyä vettä. Reaktion annettiin edetä huoneenlämpötilassa 10 minuuttia ja sitten 42 °C:ssa 50 minuuttia. Reaktio lopetettiin pitämällä 5 minuuttia 90 °C:ssa ja sitten asettamalla jään päälle 10 minuutiksi, minkä jälkeen lisättiin sekoittaen 1 µl RNaasi H:ta ja pidettiin 20 minuuttia 37 °C:ssa. PCR-monistus suoritettiin 100 µl:ssa reaktioseosta, kuten esimerkissä 2 kuvataan, käyttäen V_H 1-9:ää ja µ-ketjualuketta raskaille ketjuille ja V_L 3-7:ää ja k-ketjualukkeita kevyille ketjuille, kuten taulukossa 5 on esitetty.

b. Käsittelemättömän immunoglobuliini µ/k kirjaston rakentelu

PCR-monistettu µ-ketju- ja k-ketju-DNA:t pilkottiin Xho I:llä ja SpeI:llä sekä Sac I:llä ja Xba I:llä, vastaavasti. Saadut µ-ketju-Xho I-Spe I-fragmentit insertoitiin esimerkissä 1b(i) valmistettuun pComb8-fagomidivektoriin µ-ketju-cpVIII-fuusiokirjaston muodostamiseksi. Transformaatio E. coli XL1-Blue -soluihin ja faagin valmistus suoritettiin pääasiassa kuten esimerkissä 6 kuvataan. Sen jälkeen k-kevyt ketju-SacI-XbaI-fragmentit kloonattiin raskaan ketjun F_d µ-cpVIII-fuusiokirjastoon.

Yhdistelmäkirjasto, joka käsitti 5 x 10^6 jäsentä, muodostettiin sen jälkeen kloonaamalla Igμ F_d ja k kevyen ketjun fragmentit pComb8-vektoriin, jolloin raskaan ketjun F_d-fragmentti pääsi fuusioitumaan cpVIII:aan. Koska Fab-vasta-ainefragmentit ilmentyivät suurena kopiomääränä faagin pinnalla, tämä vektori valittiin, jotta päästiin käsiksi alhaisen affiniteetin omaaviin vasta-aineisiin, joita odotetaan löytyvän valikoimattomasta ja alukkeettomasta valikoimasta.

c. Alhaisen affiniteetin omaavien, progesteronille selektiivisten vasta-aineiden seulonta

Edellä valmistetut yhdistelmä-fagomidit pakattiin M13-faagipartikkeleihin ja 5 seulontasykliä progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA:lla päällystetyillä ELISA-kuopilla suoritettiin esimerkissä 6 kuvatulla tavalla. Lyhyesti sanottuna mikrotiitterilevyn kuopat päällystettiin 4 °C:ssa 50 µl:lla 100 µg/ml progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA-konjugaattia (Sigma #P4778) PBS:ssä. Kuopat pestiin kahdesti vedellä ja suojattiin täyttämällä ne kokonaan 1 % paino/til. BSA:lla PBS:ssä ja pitämällä levyjä 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Suojausliuos kaadettiin pois ja 50 µl faagikirjastoa (yleensä 10^{11} cfu) PBS-BSA:ssa (0,1 % paino/til.) lisättiin kuhunkin kuoppaan ja levyjä pidettiin 2 tuntia 37 °C:ssa. Pesuvaiheet, eluointi ja faagin monistaminen suoritettiin olennaisesti esimerkissä 6a1) kuvatulla tavalla.

Ensimmäisen ja toisen syklin jälkeen eluoidut faagit analysoitiin anti-progesteroni-Fab'ien ekspression suhteen bakteeripesäkeotoilla, kuten esimerkissä 2f kuvataan. Pesäkkeet koestettiin progesteronin sitoutumisen kannalta progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-HRP-konjugaatilla. Suodattimia kehitettiin käyttäen 4-kloorinaftolia. Huolehdittiin, että suljettiin pois keinotuotteet, joita aiheuttivat fagomidit, jotka ekspressoivat Igμ F_d cpVIII-fuusiota ilman vastaavaa kevyttä ketjua. Nämä vain raskaita ketjuja sisältävät faagit reagoivat ei-spesifisesti sellaisiin ei-sukulaisantigeeneihin kuten BSA, HRP, kananmunan lysotsyymi, mikä oletettavasti johtui hydrofobisesta paikasta, joka esiintyi pariutumattomalla raskaalla ketjulla.

Niitä pesäkkeitä, jotka tuottivat voimakkaimman signaalin western blot –analyysissä, tutkittiin edelleen ja kolme kloonia, PgA11, PgB6 ja PgF1, eristettiin lisäanalyysiä varten. Kaksi ensimmäistä tuli esiin ensimmäisestä seulontasyklistä ja viimeksi mainittu eristettiin kolmannen seulontasyklin jälkeen. Kaikki kolme Fab'ia, jotka tuotettiin niiden liukoisessa muodossa esimerkissä 6c2) kuvatulla tavalla, sitoutuivat spesifisesti progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA:han ja progesteroni-11α-hemisukkinyyli-BSA:han. Lisäksi kaikki kolme Fab'ia osoittivat merkittävää ristireaktiivisuutta sytokromi C:llä olevaa epitooppia vastaan. Niiden näennäissitoutu-

misvakiot progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA:han nähden määritettiin 10^4 M^{-1}:ksi PgA11:n kohdalla ja 3 x 10^4 M^{-1}:ksi ja 10^5 M^{-1}:ksi PgF1:n ja PgB6:n kohdalla, vastaavasti. Nämä sitoutumisvakiot olivat paljon alhaisempia kuin anti-progesteroni-monoklonaalisista vasta-aineista raportoidut affiniteetit 2-5 x 10^8 M^{-1}. Klooneissa PgB6 ja PgF1 käytettiin erittäin läheisesti toisiaan muistuttavien V_H- ja V_L-geenien samaa kombinaatiota. Molemmat niiden V_H-geenit olivat samanlaisia kuin kaksi läheisesti niitä muistuttavaa, mutta eri ituradan geeniä ilman minkäänlaista näyttöä somaattisesta mutaatiosta, kuten olisi odotettavissa kysymyksen ollessa käsittelemättömästä valikoimasta. Todellista ituratageeniä (-geenejä) niitä läheisesti muistuttaville V_L-geeneille ei vielä tunneta. Koska molemmat V_H-geenit ovat liittyneet eri D- ja J-segmentteihin, kloonit PgB6 ja PgF1 eivät voi olla peräisin samasta lähteestä, vaan niiden on täytynyt valikoitua kahdesta toisistaan riippumattomasta kloonaustapahtumasta, mikä viittaa tämän erityiskombinaation mahdolliseen tärkeyteen progesteronisitoutumisen kannalta. PgA11:n käyttämät V_L- ja V_H-geenit eivät muistuta läheisesti kahta muuta geeniä.

Niinpä tämä osoitti, että käyttämällä multivalenssista vektoria Fab'it voidaan eristää käsittelemättömistä yhdistelmäkirjastoista affiniteeteilla, jotka ovat vertailukelpoisia niiden kanssa, joita havaitaan primaarisen immuunivasteen hapteeneille, kuten fosforyylikoliinille ja nitrofenolille, yhteydessä. Lisäksi kombinatoriseen kirjastoon liittyvällä lähestymistavalla voidaan saada V-geenien tai V-geenin kombinaatioita, joita ei olisi valikoitunut in vivo.

d. Affiniteetin kypsyttäminen PCR-ohjatulla mutageneesilla

Somaattisen mutaatioprosessin, joka johtaa vasta-aineiden, joilla on korkeampi affiniteetti, valikoitumiseen, mimitoimiseksi luotiin sekä V_L- että V_H-alueille sattumanvaraisia mutaatioita ja sitten valikoitiin vasta-aineita, joilla oli suurentunut affiniteetti hapteeni progesteroniin. Mutaatioiden kohdentamiseksi virhealttiilla PCR:llä spesifisesti ja vain V-alueille, rakennettiin yksiketjuinen fuusioplasmidi Fv-cpIII pComb2-3 fagomidivektoriin, joka sisälsi kehyksessään seuraavien elementtien fuusiot: pelB johtosekvenssi sekreetiota varten, V_H- ja V_L-lukukehykset kytkettyinä synteettiseen oligonukleotidiin, joka koodaa taipuisaa peptidiä, kuten esimerkissä 6a käsiteltiin, ja cpIII-osa. Käyttämällä yksiketjuista vektoria voitetaan lisäksi vaikeudet, jotka johtuvat faagin, joka ilmentää ainoastaan Ig-raskaita ketjuja, ei-toivotusta valikoitumisesta ei-spesifisen sitoutumisen suhteen.

Yksiketjuisen raskaan ketjun ja kevyen ketjun (merkitty tunnuksella F_v) fuusion kalvoankkuri cpIII:n kanssa aikaansaamiseksi esimerkissä 1b(ii) valmistettua plas-

midi pComb2-3:a, jossa oli vain yksi Spe I -restriktiokohta, digeroitiin restriktioendonukleaaseilla Xba I ja Nhe I ja ligatoitiin uudelleen eliminoiden siten kevyen ketjun kloonauskasetin. Synteettinen DNA-liittäjä, joka koodaa 15 aminohapon liittäjäsekvenssiä, joka muodostuu kahdesta oligonukleotidista, 5'-anti-sense-alukkeesta, jolla on nukleotidisekvenssi

5'-TCGAGAAAGTC-TCTAGAGGTAAATCTTCTGGTTCTGGTTCCGAATCTAAATC-TACTGAGCTCAAAGTCA-3' (SEQ ID NO 153)

ja 3'-sense-aluke, jolla on nukleotidisekvenssi

5'-CTAGTGACTTTGAGCTCAGTAGATTTAGATTCGGAACCAGAACCAGAAGATT-TACCTCTAGAGACTTTC-3' (SEQ ID NO 154),

insertoitiin Xho I:llä ja Spe I:llä digeroituun, katkaistuun pComb2-3-vektoriin, joka muodosti fagomidin ScpComb2-3. Sisäinen tunnistussekvenssi restriktioendonukleaaseja Xba I:tä (TCTAGA) ja Sac I:tä (GAGCTC) varten on alleviivattu. Progesteronisitojien V_H- ja V_L-segmentit monistettiin sitten PCR:llä, kuten esimerkissä 2g kuvataan, kahdessa erillisessä reaktiossa.

Ensimmäisessä PCR-monistuksessa käytettiin aluketta, joka vastaa edellä listattua SEQ ID NO 153 ja oligonukleotidia, jolla on nukleotidisekvenssi

5'-ATTTGGGAAGGACTGTCTAGATGMRGAGAC-3' (SEQ ID NO 155),

jossa M on joko A tai C ja R on joko A tai G, raskaan ketjun fragmentin monistamiseksi. Kevyen ketjun fragmentti monistettiin erikseen alukkeella, joka vastaa edellä listattua SEQ ID NO 154 ja oligonukleotidia, jolla on nukleotidisekvenssi 5'-GAGGACTAGTTACAGTTGGTGCAGCATCAG-3' (SEQ ID NO 156). Sisäiset tunnistussekvenssit Xba I:tä (TCTAGA) ja Spe I:tä (ACTAGT) varten on alleviivattu. V_H- ja V_L-PCR-fragmentteja digeroitiin Xho I:llä ja Xba I:llä sekä Sac I:llä ja Spe I:llä, vastaavasti, ja sen jälkeen insertoitiin ScpComb2-3:een.

e. Liukoisten Fab'ien ja progesteronille spesifisten yksiketjuisten fuusiovasta-aineiden ekspressio ja detektio

Fab'ien tuottamiseksi geenin VIII osa fagomideissa, jotka koodaavat progesteroninsitojia PgA11, PgB6 ja PgF1, leikattiin restriktioendonukleaaseilla Spe I ja EcoR I ja sen jälkeen pantiin takaisin synteettisellä liittäjällä, joka koodaa TAA-stopkodonia (alleviivattu). Liittäjä muodostui oligonukleotideista 5'-CTAGTTAACTGAGTAAG-3' (SEQ ID NO 157) ja 5'-AATTCTTACTCAGTTAA-3' (SEQ ID NO 158). Vasta-aine-

Fab'in tuotanto ja detektoiminen suoritettiin olennaisesti esimerkissä 6c2) kuvatulla tavalla paitsi että E. coli -soluja hajoitettiin kolmella jäädytys- ja sulatussyklillä. Liukoisten vasta-ainefragmenttien tuottamiseksi V_H-liittäjä-V_L-fuusiotuotteet pilkottiin ScpComb2-3 fagomidista Xho I:llä ja Spe I:llä ja subkloonattiin ekspressiovektoriin pTAC01 (Pharmacia), joka on pF1260:n johdos. Vektorissa pTAC01 on indusoituva tac-promoottori, pelB-johtosekvenssi sekreetiota varten ja sen avulla saatiin insertoidun yksiketjuisen fuusiorakenteen kehyksensisäinen fuusio dekapeptidisekvenssin kanssa, kuten esimerkissä 1a kuvataan, tag'ina immunokemiallista detektiota varten. Yksiketjuisen fuusiovasta-ainefragmenttien ekspressio ja detektointi tapahtui kuten edellä kuvattiin paitsi että ELISAan käytettiin anti-dekapeptidivasta-ainetta, joka oli konjugoitu alkalifosfataasiin.

Kolme yksiketjuista fuusiokloonia valikoitiin seulontamenettelyllä ja ne merkittin tunnuksilla ScpComb2-3-PgF1:ksi, -PgB6:ksi ja -PgA11:ksi. Näille saaduille plasmideille suoritettiin virhealtis PCR-mutageneesi kuten alla kuvataan.

f. Raskaiden ja kevyiden ketjujen kohdennettu mutageneesi virhealttiilla PCR:llä tasasuuria määriä edellä valmistettuja digeroimattomia

PgF1-, PgB6- ja PgA11-ScpComb2-3-plasmideja sekoitettiin ja niistä tehtiin sarjalaimennoksia. 100 ng:n, 10 ng:n, 1 ng:n, 0,1 ng:n ja 0,01 ng:n erille seoksista suoritettiin erikseen 35 monistusjaksoa (1 minuutti 94 °C:ssa, 2 minuuttia 50 °C:ssa, 1 minuutti 72 °C:ssa) seuraavissa reaktio-olosuhteissa: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 6,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM $MnCl_2$, 0,01 % gelatiinia, 0,1 % Triton X-100, 1 mM dCTP, dGTP ja dTTP kutakin, 0,2 mM dATP, 0,1 mM dITP, käyttäen M13 käänteissekvenointialuketta, 5'-AACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO 159) ja taaksepäinaluketta, joka on komplementaarinen cpIII-osalle, 5'-GACAGGAGGTTGAGGCAGGT-3' (SEQ ID NO 160) 100 µM:ssa. Virhealttiin PCR:n perusmenetelmän kuvasivat alunperin Leung ym., J. Methods Cell. Mol. Biol., 1:11-15 (1989), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna. Mutagenisoitava DNA-alue PCR-monistettiin olosuhteissa, jotka vähensivät Taq DNA-polymeraasilla tapahtuvan DNA-synteesin toistotarkkuutta. Kuten Leung ym., supra, osoittivat, reagenssien $MuCl_2$ ja dATP PCR-monistuksissa käytetyt konsentraatiot tuottivat tulokseksi 1,0 %:n ja 1,4 %:n mutaatiofrekvenssin, vastaavasti. Siten mutaatiofrekvenssi kasvoi dATP-konsentraation pienentyessä.

Kaikkien templaattilaimennosten PCR-reaktiotuotteet koottiin pooliksi ja käsiteltiin fenolilla ennen digerointia Xho I:llä ja Spe I:llä. Geelipuhdistetut ja digeroidut PCR-fragmentit ligatoitiin takaisin Xho I-Spe I-digeroituun ScpComb2-3 plasmidiin. Ligaa-

tiotuotteet vietiin elektroporaatiomenetelmällä (electroporation) E. coli XL1-Blue -soluihin, jolloin syntyi 10^6 transformanttia. Sen jälkeen suoritettiin faaginvalmistus- ja seulontavaiheet kuten esimerkissä 6 kuvataan, paitsi että faagi seulottiin ilman BSA:ta.

Muodostettiin siis mutatoitujen anti-progesteroni yksiketjuisten fagomidivasta-aineiden kirjasto ja se seulottiin progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA:lla ja eluoituneiden cfu-yksikköjen lukumäärä otettiin mitaksi määritettäessä ilmentyneitten yksiketjuisten vasta-aineiden suhteellista affiniteettia hapteenin suhteen. Kolmannen seulontasyklin jälkeen todettiin 50-100-kertainen nousu eluoituneiden fagomidien saannossa suhteessa mutatoitumattomaan populaatioon. Yksittäisissä mutanteissa oli 10-300-kertainen nousu saannossa seulonnan jälkeen verrattuna emoklooneihin, mikä osoittaa, että mutantit koodasivat vasta-aineen sitomiskohtia suurentuneella affiniteetilla. Neljä parasta mutanttia, joita merkittiin tunnuksilla ScPgb6-1, -2, -3 ja -4, valittiin niiden affiniteetin hepteeni-konjugaattiin nähden määrittämistä ja sekvenssianalyysiä varten.

g. Mutagenisoitujen yksiketjuisten fuusio-anti-progesteroni-vasta-aineiden affiniteetin määrittäminen

Liukoisten vasta-ainefragmenttien, jotka valmistettiin edellä valituista 4 parhaasta mutantista, ScPgb6-1, -2, -3 ja -4, sitoutumisvakiot määritettiin kompetitiivisella ELISAlla, kuten esimerkissä 6c2) kuvattiin. Lyhyesti sanottuna mikrotiitterilevyn kuopat päällystettiin 4 °C:ssa 50 µl:lla 100 µg/ml progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA-konjugaattia PBS:ssä. Kuopat pestiin kahdesti vedellä ja suojattiin 1 % paino/til. BSA:lla PBS:ssä 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Fab- eli yksiketjuiset fuusiosupernatantit sekoitettiin progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA:han PBS-BSA:ssa (0,1 % paino/til.) ja pidettiin kuopissa 37 °C:ssa 2 tuntia. Levyt pestiin PBS-Tweenillä (0,05 % til./til.) ja vuohen anti-hiiri-k-ketju-alkalifosfataasikonjugaattia (Southern Biotech) tai hiiren anti-dekapeptidi monoklonaalisia vasta-aineita konjugoituina alkalifosfataasiin lisättiin ja pidettiin 1 tunti 37 °C:ssa. Levyt pestiin kuten edellä ja substraatti lisättiin (0,1 ml, p-nitrofenyylifosfaattia pitoisuutena 1 mg/ml 0,1 M Tris:ssä, pH 9,4, joka sisälsi 50 mM $MgCl_2$). Kun seosta oli pidetty 25 °C:ssa 60-180 minuuttia, absorbanssi luettiin 405 nm:ssä. Näennäisaffiniteetit määritettiin hapteenin konsentraation käänteisarvona, joka vaaditaan estämään 50-prosenttisesti maksimaalinen sitoutuminen kompetitiivisessa ELISAssa. Tämä oli lähelle tuleva likiarvo affiniteetille ja antoi mahdollisuuden asettaa sitoutumisaktiivisuudet järjestykseen.

Mutatoitujen Sc-vasta-aineiden affiniteetti progesteroni-3-(O-karboksimetyyli)-oksiimi-BSA:han määritettynä kompetitiivisella ELISAlla oli noussut yli emo-ScpPgB6:n arvon 30-kertaisesti ScpgB6-1:n kohdalla, noin 13-kertaisesti sekä ScpgB6-3:n että ScpgB6-4:n kohdalla. Mielenkiintoista oli, että kloonilla, jossa oli vähiten mutaatioita, affiniteetti oli suurin. Mutantti-Sc-vasta-aineiden ristireaktiivisuusmalli ei muuttunut paitsi että ScpgB6-1 oli menettänyt suurimman osan reaktiivisuudestaan sytokromi C:hen nähden. Tutkittaessa laajasti immuunivasteita hapteeneille affiniteetin kasvu yhdellä suuruusluokalla voitiin osoittaa spesifisten yksinkertaisten aminohapposubstituutioiden ansioksi, mikä antaa aiheen ajatella, että vain yhden tai kahden aminohappomuutoksen Sc-anti-progesteroni-vasta-aineiden sitoutumiskohdassa voidaan katsoa olevan syynä niiden kasvaneeseen affiniteettiin hapteenikonjugaattiin nähden. Koska mutanttia, jossa olisi vain yksi aminohappomuutos, ei saatu talteen, kriittistä tähdettä (tähteitä), joka aiheutti parantuneen affiniteetin hapteenikonjugaattiin nähden, ei voitu identifioida. Lisäksi kaikille kolmelle mutantille yhteisiä aminohapposubstituutioita ei havaittu, mikä antaa aiheen ajatella, että eri tähteiden vaihtaminen voi olla syynä kasvaneeseen affiniteettiin 3-(O-karboksimetyyli)-progesteronin suhteen. Ser_{64} - Pro_{64} -substituutio V_H-CDR2:ssa on yhteinen mutanteille ScPgB6-3 ja ScPgB6-4. Vaikka molemmilla mutanteilla oli samanlainen affiniteetti hapteenikonjugaattiin nähden, tuon tähteen merkitystä antigeenin sitoutumiselle ei voida yksiselitteisesti arvioida, koska molempien mutanttien V_L- ja V_H-alueilla esiintyi monia aminohappovaihdoksia.

h. Nukleiinihapposekvenointi

Raskaan ketjun ja kevyen ketjun vaihtelevien alueiden täydelliset nukleotidisekvenssit määritettiin kaksisäikeisestä DNA:sta käyttäen Sequenase 2.0:aa (United States Biochemical). DNA-sekvenointi osoitti, että kaikki neljä mutanttikloonia, ScPgB6-1, -2, -3 ja -4 olivat peräisin ScPgB6:sta, ScPgB6-1:n ja ScPgB6-2 ollessa samanlaisia. Hallitseva mutaatiotyyppi, joka saatiin tällä PCR-menettelyllä, oli A-C/T-C nukleotidivaihdos (68 %), kun T-G/A-C, G-A/C-T, T-A/A-T, G-C/C-G tai C-A/G-T vaihdoksia esiintyi suunnilleen samalla taajuudella. Todettiin DNA-sekvenssejä, joissa oli keskimääräistä suurempi mutaatiofrekvenssi, eli mutaatio-"hot spotteja". Lisäksi 3 mutanttikloonia erosi muista emäsparien muutoksien lukumäärän osalta. Mutaatiotaajuuksien sekä V_H- että V_H-alueilla todettiin olevan 1,5 % ScPgB6-1:n kohdalla, 2,1 % ScPgB6-3:n kohdalla ja 4,1 % ScPgB6-4:n kohdalla, mikä johti moniin aminohapposubstituutioihin mutanttien CDR-alueilla ja kehys-alueilla.

Yhteenvetona tässä keksinnössä tarkastellaan siis jollekin hapteenille spesifisten vasta-aineiden seulontaa käsittelemättömästä kirjastosta ja niiden affiniteetin kypsyt-

tämistä. Vaikka in vitro valikointi- ja mutageneesisysteemi on kovin yksinkertainen immuunisysteemin monimutkaisuuteen verrattuna, joitakin yhteisiä piirteitä esiintyy: (i) käsittelemättömästä kirjastosta valikoitujen vasta-aineiden affiniteetti voi nousta samaan suuruusluokkaan kuin vasta-aineiden, jotka ovat peräisin primaarisesta immuunivasteesta hapteenille; (ii) vaikka mekanismit mutaatioittein kehittämiseksi in vivo ja in vitro olivat erilaiset, todettiin mutaatio-"hot spotteja"; (iii) affiniteetin kasvu yhden mutaatio- ja selektiosyklin in vitro jälkeen on samaa suuruusluokkaa kuin mikä todetaan siirryttäessä primaarisista sekundaarisiin immuunivasteisiin hapteeneille; ja (iv) mutatoidun vasta-aineen sitoutumiskohta, jossa oli muuttunutta ristireaktiivisuutta, löydettiin, kuten havaitaan satunnaisesti in vivo.

Kun kombinatorista vasta-ainelähestymistapaa ensimmäisen kerran kuvattiin, oli kyseenalaista, voitaisiinko sitä käyttää tehokkaasti hyväksi laajassa vasta-ainevalikoimassa. Esillä oleva keksintö osoittaa, että voidaan päästä käsiksi ja kehittää vasta-aineketjuyhdistelmiä, joita ei ehkä koskaan valikoidu in vivo. Niinpä nyt näyttäisi siltä, että on mahdollista ylittää vasta-ainevasteen in vivo diversiteetti molekyylikloonaustekniikoilla.

Edellä oleva on tarkoitettu havainnollistamaan esillä olevaa keksintöä, mutta ei rajaamaan sitä. Lukemattomia variaatioita ja modifikaatioita voidaan tehdä poikkeamatta keksinnön todellisesta hengestä ja suoja-alasta.

Sekvenssejä, joita ei ole selityksessä

SEQ ID NO 17

5'

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

SEQ ID NO 99

5'

GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACG
GCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGAAA
CTGCTCGAGTCAGGACCTGGCCTCGTCAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACC
TGCTCTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGCTTATTACTGGAACTGGATCCGG

CAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTGTC
AATAAGTATGATCCATCTCTCAAGAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCT
AACAATCAGTTTTTCCAGAAGTTGATTTCTGTGACTTCTGAGGACACAGGAACA
TATGACTGTTCAAGAGGGACTAGGGCCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGCA
ATTTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG
GCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTC
AAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCC
AGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC
AGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAAC
GTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGAT
TGTACTAGTTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAA

SEQ ID NO 100

5'

TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACG
GCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCTCCAGATGAC
CCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTC
GATCAAGTGAGAATATTACAATTACT

SEQ ID NO 101

5'

CTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCT
GGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACTACAATGT
CAAGGGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTG
ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAG
GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGATGCCACTCACAAGACATCAAC
TTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAATTCTAGACGGCGC

SEQ ID NO 102

5'

GCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGAC
CGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCG
GTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGC

SEQ ID NO 111

5'

GTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAA
CTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTG
TCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCA
AGCTGATAGAATTCGAGT

SEQ ID NO 112

5'

CCATTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAA
CCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCT
GAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGA
GGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATG
GCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTA
CAGTCTGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCT
GCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGT
GCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGAC
GGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTC
CCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATAT
GAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCGGTGTCTTTGCGTTT
CTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATA
CTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTAT
TAT

SEQ ID NO 113

5'

GAGACGACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTCGTTTGTGAATATCAAGGC
CAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGC
TCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGC
GGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGT
TCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATG

ACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACTT
GATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGAC
GTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCT
AATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAAT
AATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCT
TTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAA
ATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTT
ATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAA
TCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTATTATGCTAGCTAGTAA

SEQ ID NO 114

5'

TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGACTGG
AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGT
TAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTT
ATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
GGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCAT
GATTACGAATTCGAGCTCGGT

SEQ ID NO 115

5'

AGGTCCAGCTTCTCGAGTCTGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCT
CTCACCTGCTCTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGCTTATTACTGGAACTGGAT
CCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAATGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTG
TCAATAAGTATGATCCATCTCTCAAGAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCT
AACAATCAGTTTTTCCAGAAGTTGATTTCTGTGACTTCTGAGGACACAGGAACATA
TGACTGTTCAAGAGGGACTAGGGCCTCTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAATTT
CAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCT
GGATCTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTA
TTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGC
ACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACT
GTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCACCCGGC
CAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTACTAGTGCTGAGG
GTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATAT
ATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAA

GCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAGAATTCGAGT

SEQ ID NO 116

5'

ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCC
AACCAGCCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTGCTGAG
GGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCG
AATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTAT
CGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAGAATTCG

SEQ ID NO 117

5'

GTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTGCTTT
CTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAA
TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
CAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATA
GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT
CTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGA
TTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT
TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTA
AA

Patenttivaatimukset

1. Filamenttifaagi, joka kapseloi genomin, joka koodaa jotakin ligandin sitovaa heterodimeeristä reseptoria, **tunnettu** siitä, että mainittu reseptori käsittää ensimmäisen ja toisen polypeptidin, joista mainitun ensimmäisen polypeptidin vieressä on aminoterminaalinen prokaryoottinen sekreetiosignaalidomeeni, ja filamenttifaagin kalvoankkuridomeeni, ja mainittu toinen polypeptidi on fuusioitunut aminoterminaaliseen prokaryoottiseen sekreetiosignaalidomeeniin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainittu reseptori on jokin epitoopin sitova kompleksi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainittu faagi on detektoitavasti leimattu.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainittu ensimmäinen polypeptidi on jonkin vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidi ja mainittu toinen polypeptidi on jonkin vasta-aineen kevyen ketjun polypeptidi.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainittu ensimmäinen polypeptidi on jonkin vasta-aineen kevyen ketjun polypeptidi ja mainittu toinen polypeptidi on jonkin vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainittu filamenttifaagin kalvoankkuri on cpVIII-kalvoankkuri.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainitulla filamenttifaagin kalvoankkurilla on aminohappotähdesekvenssi, jota edustaa kaava SEQ ID NO. 17:ssä tähteestä 26 tähteeseen 40.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainittu filamenttifaagin kalvoankkuri on cpIII-kalvoankkuri.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen filamenttifaagi, **tunnettu** siitä, että mainitulla filamenttifaagin kalvoankkurilla on aminohappotähdesekvenssi, jota edustaa kaava SEQ ID NO. 16:ssa jäännöksestä 1 jäännökseen 211.

10. Vektori jonkin fuusiopolypeptidin ilmentämistä varten, **tunnettu** siitä, että mainittu vektori käsittää ylävirtaan ja alavirtaan transloituvia DNA-sekvenssejä, jotka on operatiivisesti liitetty nukleotidisekvenssin avulla, joka soveltuu insertti-DNA:n suunnattuun ligaatioon, mainitun ylävirran sekvenssin koodatessa proka-

ryoottista sekreetiosignaalia, mainitun alavirran sekvenssin koodatessa filamenttifaagin kalvoankkuria, mainittujen transloituvien DNA-sekvenssien ollessa operatiivisesti liitetyt sarjaan DNA-ekspressiosignaaleja mainittujen transloituvien DNA-sekvenssien ilmentämiseksi osina mainittua fuusiopolypeptidiä; ja että mainittu vektori käsittää lisäksi toisen ylävirran puoleisen transloituvan DNA-sekvenssin, joka koodaa prokaryoottista sekreetiosignaalia, joka on operatiivisesti liitetty nukleotidisekvenssin kautta, joka soveltuu toisen insertti-DNA:n suunnattuun ligaatioon, mainitun toisen transloituvan DNA-sekvenssin ollessa operatiivisesti liitetty sarjaan DNA-ekspressiosignaaleja mainitun toisen transloituvan DNA-sekvenssin ilmentämiseksi osana toista fuusiopolypeptidiä.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainittu prokaryoottinen sekreetiosignaali on pelB-sekreetiosignaali.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainitulla pelB-sekreetiosignaalilla on aminohappotähdesekvenssi, jota edustaa kaava, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat:

(a) SEQ ID NO. 5,

(b) SEQ ID NO. 6 ja

(c) SEQ ID NO. 7.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainittu filamenttifaagin kalvoankkuri on cpVIII-kalvoankkuri.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainitulla filamenttifaagin kalvoankkurilla on aminohappotähdesekvenssi, jota edustaa kaava SEQ ID NO. 17:ssä tähteestä 26 tähteeseen 40.

15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainittu filamenttifaagin kalvoankkuri on cpIII-kalvoankkuri.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainitulla filamenttifaagin kalvoankkurilla on nukleotidiemässekvenssi, jota edustaa kaava SEQ ID NO. 112:ssa.

17. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainittu ekspressiosignaalisarja sisältää promoottorin, ribosomin sitomiskohdan ja ainakin yh-

den lopetuskodonin samassa lukukehyksessä mainitun alavirran puoleisen transloituvan DNA-sekvenssin kanssa.

18. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainitulla vektorilla on nukleotidisekvenssi, joka on esitetty SEQ ID NO. 116:ssa emäksestä 1 emäkseen 208.

19. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainitulla vektorilla on nukleotidisekvenssi, joka on esitetty SEQ ID NO. 3:ssa emäksestä 36 emäkseen 118.

20. Patenttivaatimuksen 10 mukainen vektori, **tunnettu** siitä, että mainittu DNA-ilmentämisvektori on vektori pCOMB8, pCOMB2-8 tai pCKAB8, pCOMB3, pCOMB2-3, pCOMB2-3' tai pCKAB3.

21. Polypeptidi, **tunnettu** siitä, että se käsittää ligandin sitovan reseptoripolypeptidin, joka on operatiivisesti liitetty aminopäästä prokaryoottiseen sekreetiosignaalidomeeniin ja operatiivisesti liitetty karboksipäästä filamenttifaagin kalvoankkuridomeeniin.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä, että polypeptidi on jonkin vasta-aineen vaihtelevan ketjun polypeptidi.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen polypeptidi, **tunnettu** siitä, että vasta-aineen vaihtelevan ketjun polypeptidi on jonkin vasta-aineen raskaan ketjun polypeptidi.

24. Filamenttifaagipartikkelikirjasto, **tunnettu** siitä, että kukin partikkeli sisältää patenttivaatimuksen 10 mukaisen DNA-ilmentämisvektorin.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen kirjasto, **tunnettu** siitä, että mainittu kirjasto sisältää vähintään 10^7 erilaista lajia mainittua DNA-ilmentämisvektoria.

26. Filamenttifaagipartikkelikirjasto, **tunnettu** siitä, että kukin faagipartikkeli sisältää vähintään yhden patenttivaatimuksen 1 mukaisen ligandin sitovan heterodimeerisen reseptorin.

27. Menetelmä DNA-molekyylikirjaston tuottamiseksi, jossa kirjastossa kukin DNA-molekyyli käsittää kistronin polypeptidin ilmentämiseksi filamenttifaagipartikkelin pinnalla, **tunnettu** siitä, että menetelmässä:

(a) muodostetaan ligaatioseos yhdistämällä ligaatiopuskuriin:

(i) dsDNA-muodossa olevien polypeptidigeenien valikoima, jolloin kussakin vektorissa on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon, ja

(ii) paljon lineaarisessa muodossa olevia DNA-ilmentämisvektoreita, joista kussakin vektorissa on ylävirran puolella ja alavirran puolella kohesiiviset päät, jotka (a) soveltuvat suunnatusti ottamaan vastaan mainittuja polypeptidigeenejä yhteisessä lukukehyksessä ja (b) ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran transloituviin DNA-sekvensseihin, joista mainittu ylävirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa prokaryoottista sekreetiosignaalia, mainittu alavirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa filamenttifaagin kalvoankkuria ja mainitut transloituvat DNA-sekvenssit ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran DNA:n ekspressiota säätteleviin sekvensseihin; ja

(b) mainittu seos saatetaan ligatointiolosuhteisiin riittäväksi ajaksi, jotta mainitut polypeptidigeenit liittyvät operatiivisesti mainittuihin vektoreihin, jolloin muodostuu mainittu kirjasto.

28. Menetelmä dikistronisten DNA-molekyylien kirjaston tuottamiseksi, jossa kirjastossa kukin dikistroninen DNA-molekyyli käsittää ensimmäisen ja toisen kistronin heterodimeerisen reseptorin ensimmäisen ja toisen polypeptidin ilmentämiseksi filamenttifaagin pinnalla, **tunnettu** siitä, että menetelmässä:

(a) muodostetaan ensimmäinen ligaatioseos yhdistämällä ligatointipuskuriin:

(i) dsDNA-muodossa olevien ensimmäisten polypeptidigeenien valikoima, jolloin kussakin on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon, ja

(ii) paljon lineaarisessa muodossa olevia DNA-ilmentämisvektoreita, joista kussakin vektorissa on ylävirran puolella ja alavirran puolella ensimmäiset kohesiiviset päät, jotka (a) soveltuvat suunnatusti ottamaan vastaan yhden mainituista ensimmäisistä polypeptidigeeneistä yhteisessä lukukehyksessä ja (b) ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran transloituviin DNA-sekvensseihin, joista mainittu ylävirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa prokaryoottista sekreetiosignaalia, mainittu alavirran transloituva DNA-sekvenssi koodaa filamenttifaagin kalvoankkuria ja mainitut transloituvat DNA-sekvenssit ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran DNA:n ekspressiota säätteleviin sekvensseihin; ja

(b) mainittu seos saatetaan ligatointiolosuhteisiin riittäväksi ajaksi, jotta mainitut ensimmäiset polypeptidigeenit liittyvät operatiivisesti mainittuihin vektoreihin ja tuottavat paljon rengasmaisia DNA-molekyylejä, joissa jokaisessa on mainittu ensimmäinen kistroni mainitun ensimmäisen polypeptidin ilmentämiseksi;

(c) tuotetaan paljon lineaarisessa muodossa olevia DNA-ilmentämisvektoreita, joista kussakin vektorissa on toiset ylävirran ja alavirran kohesiiviset päät, jotka (i) soveltuvat suunnatusti ottamaan vastaan yhden toisten polypeptidigeenien valikoiman yhteisessä lukukehyksessä ja (ii) ovat operatiivisesti liitetyt vastaaviin ylävirran ja alavirran DNA-sekvensseihin, mainitun ylävirran DNA-sekvenssin ollessa transloituva sekvenssi, joka koodaa prokaryoottista sekreetiosignaalia, mainitun alavirran DNA-sekvenssin sisältäessä ainakin yhden lopetuskodonin mainitussa lukukehyksessä, ja mainitun transloituvan DNA-sekvenssin ollessa operatiivisesti liitetty DNA:n ekspressiota säätelevään sekvenssiin, käsittelemällä mainittuja monia rengasmaisia DNA-molekyylejä endonukleolyyttisissä restriktio-olosuhteissa, jotka riittävät pilkkomaan mainitut rengasmaiset DNA-molekyylit ja muodostamaan mainitut toiset kohesiiviset päät;

(d) muodostetaan toinen ligaatioseos yhdistämällä ligatointipuskuriin:

(i) mainitut monet, vaiheessa (c) muodostetut DNA-ilmentämisvektorit ja

(ii) mainitun toisten dsDNA:n muodossa olevien polypeptidigeenien valikoiman, joissa kussakin on kohesiiviset päät, jotka soveltuvat suunnattuun ligaatioon mainittuihin moniin lineaarisiin DNA-vektoreihin; ja

(e) mainittu toinen seos saatetaan ligatointiolosuhteisiin riittäväksi ajaksi, jotta mainitut toiset polypeptidigeenit liittyvät operatiivisesti mainittuihin vektoreihin ja tuottavat paljon rengasmaisia DNA-molekyylejä, joissa jokaisessa on mainittu toinen kistroni mainitun toisen polypeptidin ilmentämiseksi, jolloin muodostuu kirjasto.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu heterodimeerinen reseptori on jokin epitoopin sitova kompleksi.

30. Dikistronisten DNA-molekyylien, joista jokainen käsittää ensimmäisen ja toisen kistronin, jotka kykenevät ilmentämään heterodimeerisen reseptorin ensimmäisen ja toisen polypeptidin, kirjasto, **tunnettu** siitä, että se on tuotettu patenttivaatimuksen 28 mukaisella menetelmällä.

31. Menetelmä filamenttifaagipartikkelien kirjaston diversiteetin muuttamiseksi, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

a) saatetaan käyttöön patenttivaatimuksen 24 mukainen filamenttifaagipartikkelikirjasto;

(b) saatetaan käyttöön saatettu kirjasto kosketukseen jonkin ennalta valitun ligandin kanssa olosuhteissa, jotka ovat riittävät, jotta kirjaston jäsenet sitoutuvat ligandiin ja muodostavat ligandi-faagipartikkelikompleksin; ja

c) eristetään mainitussa kompleksissa olevat faagipartikkelit sitoutumattomista kirjaston jäsenistä ligandilla rikastetun kirjaston, joka käsittää faagipartikkelit, joilla on sitoutumisspesifisyys mainittuun ennalta valittuun ligandiin nähden, muodostamiseksi.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu ennalta valittu ligandi kiinnitetään kiinteään alustaan, mainittu kompleksi on kiinteässä faasissa ja mainittu eristäminen käsittää vaiheet, joissa:

i) kiinteä alusta pestään sitoutumattomien kirjaston jäsenien huuhtelemiseksi kiinteästä alustasta; ja

ii) kiinteään faasiin sitoutuneet faagipartikkelit eluoidaan mainittujen eristettyjen faagipartikkelien muodostamiseksi.

33. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu eluointi käsittää mainittujen kiinteään faasiin sitoutuneiden faagipartikkelien saattamisen kosketukseen eluointipuskurin kanssa, jonka pH on pH 2 - pH 6.

34. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu eluointi käsittää mainittujen kiinteään faasiin sitoutuneiden faagipartikkelien saattamisen kosketukseen eluointipuskurin kanssa, joka sisältää mainitun ennalta valitun ligandin.

35. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu filamenttifaagin kalvoankkuri on cpVIII-kalvoankkuri.

36. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu filamenttifaagin kalvoankkuri on cpIII-kalvoankkuri.

37. Menetelmä filamenttifaagipartikkelikirjaston diversiteetin lisäämiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

a) saatetaan käyttöön patenttivaatimuksen 24 mukainen filamenttifaagipartikkelikirjasto;

b) mutatoidaan kussakin kirjaston DNA-ilmentämisvektorissa oleva immunoglobuliinin vaihtelevaa domeenia koodaava nukleotidisekvenssi faagipartikkelien, joista jokainen sisältää mutatoidun immunoglobuliinin vaihtelevan domeenin nukleotidisekvenssin, kirjaston muodostamiseksi.

38. Menetelmä epitoopin sitovan kompleksin, jota koodaa patenttivaatimuksen 2 mukainen filamenttifaagi, affiniteetin kypsyttämiseksi, **tunnettu** siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

a) saatetaan käyttöön mainitun filamenttifaagin genomi;

b) mutatoidaan käyttöön saatetussa genomissa oleva immunoglobuliinin vaihtelevaa domeenia koodaava nukleotidisekvenssi faagipartikkeleiden, jotka sisältävät mutatoidun immunoglobuliinin vaihtelevan domeenin nukleotidisekvenssin, kirjaston muodostamiseksi;

c) saatetaan vaiheessa b) muodostettu kirjasto kosketukseen ennalta valitun ligandin kanssa olosuhteissa, jotka ovat riittävät, jotta kirjaston jäsenet sitoutuvat ligandiin ja muodostavat ligandi-faagipartikkelikompleksin; ja

d) eristetään mainitussa kompleksissa olevat faagipartikkelit sitoutumattomista kirjaston jäsenistä ligandilla rikastetun kirjaston muodostamiseksi, joka käsittää faagipartikkeleita, joilla on sitoutumisspesifisyys mainittuun ennalta valittuun ligandiin nähden.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu mutatointi käsittää mainitun immunoglobuliinin vaihtelevaa domeenia koodaavan nukleotidisekvenssin saattamisen alttiiksi virhealttiille polymeraasiketjureaktiolle.

40. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu mutatointi käsittää mainitun immunoglobuliinin geenin CDR-osan monistamisen polymeraasiketjureaktiolla (PCR).

41. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että immunoglobuliinin vaihteleva domeeni on V_H.

42. Menetelmä jonkin ennalta valitun ligandin läsnäolon ilmaisemiseksi näytteessä, **tunnettu** siitä, että menetelmä käsittää vaiheet, joissa:

a) sekoitetaan näyte, jonka epäillään sisältävän ennalta valitun antigeenin, patenttivaatimuksen 1 mukaiseen ligandin sitovaan heterodimeeriseen reseptoriin, joka sitoutuu mainittuun ennalta valittuun ligandiin sitoutumisolosuhteissa, jotka ovat riittävät, jotta mainittu ligandin sitova heterodimeerinen reseptori sitoo mainitun ligandin ja muodostaa ligandi-reseptorikompleksin; ja

b) ilmaistaan mainitun ligandi-reseptorikompleksin tai mainitun ligandin sitovan heterodimeerisen reseptorin läsnäolo.

43. Patenttivaatimuksen 42 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ligandin sitova heterodimeerinen reseptori on filamenttifaagipartikkelin pinnalla.

44. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ligandin sitova heterodimeerinen reseptori on fuusioitu filamenttifaagin kalvoankkuriin, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat cpIII ja cpVIII.

45. Patenttivaatimuksen 43 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu ilmaiseminen käsittää mainitun filamenttifaagipartikkelin läsnäolon ja siten mainitun tuotteen läsnäolon ilmaisemisen.

Patentkrav

1. Filamentfag, som inkapslar ett genom, som kodar en ligandbindande heterodimerisk receptor, **kännetecknad** av att nämnda receptor innefattar en första och en andra polypeptid, varvid nämnda första polypeptid angränsar till en aminoterminal prokaryotisk sekretionssignaldomän och filamentfagens membranankardomän, och nämnda andra polypeptid är fusionerad med den aminoterminala prokaryotiska sekretionssignaldomänen.

2. Filamentfag enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att nämnda receptor är något epitopbindande komplex.

3. Filamentfag enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att nämnda fag är detekterbart stämplat.

4. Filamentfag enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att nämnda första polypeptid är en polypeptid i en tung kedja av en antikropp och nämnda andra polypeptid är en polypeptid i en lätt kedja av en antikropp.

5. Filamentfag enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att nämnda första polypeptid är en polypeptid i en lätt kedja av en antikropp och nämnda andra polypeptid är en polypeptid i en tung kedja av en antikropp.

6. Filamentfag enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare är ett cpVIII-membranankare.

7. Filamentfag enligt patentkrav 6, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare innefattar en aminosyrarestsekvens, som representeras av formeln i SEQ ID NO. 17 från resten 26 till resten 40.

8. Filamentfag enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare är ett cpIII-membranankare.

9. Filamentfag enligt patentkrav 8, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare har en aminosyrarestsekvens, som representeras av formeln i SEQ ID NO. 16 från resten 1 till resten 211.

10. Vektor för expressionen av någon fusionspolypeptid, **kännetecknad** av att nämnda vektor innefattar DNA-sekvenser som translateras uppströms och nedströms, som är operativt anslutna med en nukleotidsekvens, som passar in i ligationen riktad mot insert-DNA, då nämnda uppströmssekvens kodar en prokaryotisk sekretionssignal, medan nämnda nedströmssekvens kodar filamentfagens membranankare, då nämnda translaterande DNA-sekvenser är operativt anslutna till en serie DNA-expressionssignaler för att exprimera nämnda translaterande DNA-sekvenser som delar av nämnda fusionspolypeptid; och att nämnda vektor dessutom innefattar en andra translaterande DNA-sekvens på uppströmssidan, som kodar en prokaryotisk sekretionssignal, som är operativt ansluten via en nukleotidsekvens, som passar in i ligationen riktad mot den andra insert-DNA, varvid nämnda andra translaterande DNA-sekvens är operativt ansluten till en serie DNA-expressionssignaler för att exprimera nämnda andra translaterande DNA-sekvens som en del av den andra fusionspolypeptiden.

11. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda prokaryotiska sekretionssignal är en pelB-sekretionssignal.

12. Vektor enligt patentkrav 11, **kännetecknad** av att nämnda pelB-sekretionssignal är en aminosyrarestsekvens, som representeras med en formel, som är vald ur gruppen som består av:

(a) SEQ ID NO. 5,

(b) SEQ ID NO. 6 och

(c) SEQ ID NO. 7.

13. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare är ett cpVIII-membranankare.

14. Vektor enligt patentkrav 13, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare är en aminosyrarestsekvens, som representeras med formeln i SEQ ID NO. 17 från rest 26 till rest 40.

15. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare är ett cpIII-membranankare.

16. Vektor enligt patentkrav 15, **kännetecknad** av att nämnda filamentfags membranankare har en nukleotidbassekvens, som representeras med formeln i SEQ ID NO. 112.

17. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda expressionssignalserie innefattar en promotor, bindpunkten för ribosom och åtminstone ett slutkodon i samma läsram som nämnda translaterande nedströms-DNA-sekvens.

18. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda vektor har en nukleotidsekvens, som visas i SEQ ID NO. 116 från basen 1 till basen 208.

19. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda vektor har en nukleotidsekvens, som visas i SEQ ID NO. 3 från basen 36 till basen 118.

20. Vektor enligt patentkrav 10, **kännetecknad** av att nämnda DNA-expressionsvektor är vektor pCOMB8, pCOMB2-8 eller pCKAB8, pCOMB3, pCOMB2-3, pCOMB2-3′ eller pCKAB3.

21. Polypeptid, **kännetecknad** av att den innefattar en ligandbindande receptorpolypeptid, som vid aminoterminalen är operativt ansluten till en prokaryotisk sekretionssignaldomän och vid karboxiterminalen till filamentfagens membranankardomän.

22. Polypeptid enligt patentkrav 21, **kännetecknad** av att polypeptiden är en polypeptid i en variabel kedja av en antikropp.

23. Polypeptid enligt patentkrav 22, **kännetecknad** av att polypeptiden i en variabel kedja av antikroppen är en polypeptid i en tung kedja av någon antikropp.

24. Filamentfagpartikelbibliotek, **kännetecknat** av att varje partikel innefattar en DNA-expressionsvektor enligt patentkrav 10.

25. Bibliotek enligt patentkrav 24, **kännetecknat** av att nämnda bibliotek innefattar åtminstone 10^7 olika slag av nämnda DNA-expressionsvektor.

26. Filamentfagpartikelbibliotek, **kännetecknat** av att varje fagpartikel innefattar åtminstone en ligandbindande heterodimerisk receptor enligt patentkrav 1.

27. Förfarande för att framställa ett DNA-molekylbibliotek, i vilket bibliotek varje DNA-molekyl innefattar cistron för expressionen av polypeptid på filamentfagpartikelns yta, **kännetecknat** av att vid förfarandet:

(a) bildas en ligationsblandning genom att förena med en ligationsbuffert:

(i) ett urval av polypeptidgener i dsDNA-form, varvid varje vektor innefattar kohesiva ändar, som anpassas till den riktade ligationen, och

(ii) många DNA-expressionsvektorer i linjär form, av vilka varje vektor har kohesiva ändar på uppströmssidan och nedströmssidan, vilka (a) är anpassade att riktat ta emot nämnda polypeptidgener i en gemensam läsram och (b) som är operativt anslutna till motsvarande translaterande uppströms- och nedströms-DNA-sekvenser, av vilka nämnda translaterande uppströms-DNA-sekvens kodar en prokaryotisk sekretionssignal, varvid nämnda translaterande nedströms-DNA-sekvens kodar filamentfagens membrananker och nämnda translaterande DNA-sekvenser är operativt anslutna till motsvarande sekvenser som reglerar uppströms- och nedströms-DNA-expressionen; och

(b) nämnda blandning försätts i ligationsförhållanden under en tillräcklig tid, så att nämnda polypeptidgener ansluts operativt till nämnda vektorer, varvid nämnda bibliotek bildas.

28. Förfarande för att framställa ett bibliotek av dicistroniska DNA-molekyler, varvid varje dicistroniska DNA-molekyl i biblioteket innefattar en första och en andra heterodimerisk cistronreceptor för att exprimera en första och andra polypeptid på filamentfagens yta, **kännetecknat** av att vid förfarandet:

(a) bildas en första ligationsblandning genom att förena med ligationsbufferten:

(i) ett urval av första polypeptidgener i dsDNA-form, som alla innefattar kohesiva ändar, som anpassas till riktad ligation, och

(ii) många DNA-expressionsvektorer i linjär form, av vilka varje vektor har första kohesiva ändar på uppströmssidan och nedströmssidan, vilka (a) är anpassade att riktat ta emot en av nämnda första polypeptidgener i en gemensam läsram och (b) är operativt anslutna till motsvarande translaterande uppströms- och nedströms-DNA-sekvenser, av vilka nämnda translaterande uppströms-DNA-sekvens kodar en prokaryotisk sekretionssignal, nämnda translaterande nedströms-DNA-sekvens kodar filamentfagens membranankare och nämnda translaterande DNA-sekvenser är operativt anslutna till motsvarande sekvenser som reglerar DNA-expressionen på uppströmssidan och nedströmssidan; och

(b) nämnda blandning försätts i ligationsförhållanden under en tillräcklig tid, så att nämnda första polypeptidgener ansluts operativt till nämnda vektorer och producerar mycket ringformade DNA-molekyler, av vilka var och en innefattar nämnda första cistron för att exprimera nämnda första polypeptid;

(c) många DNA-expressionsvektorer i linjär form framställs, av vilka varje vektor har andra kohesiva ändar på uppströmssidan och nedströmssidan, vilka (i) är anpassade att riktat ta emot ett urval av de andra polypeptidgenerna i en gemensam läsram och (ii) är operativt anslutna till motsvarande uppströms- och nedströms-DNA-sekvenser, varvid nämnda uppströms-DNA-sekvens är en translaterande sekvens, som kodar en prokaryotisk sekretionssignal, då nämnda nedströms-DNA-sekvens innefattar åtminstone ett slutkodon i nämnda läsram, och då nämnda translaterande DNA-sekvens är operativt ansluten till en sekvens som reglerar DNA-expression, genom att behandla nämnda många ringformiga DNA-molekyler under endonukleolytiska restriktionsförhållanden, som är tillräckliga för att spjälka nämnda ringformiga DNA-molekyler och bilda nämnda andra kohesiva änder;

(d) en andra ligationsblandning bildas genom att förena med ligationsbufferten:

(i) nämnda många i skede (c) framställda DNA-expressionsvektorer och

(ii) nämnda andra urval av polypeptidgener i dsDNA-form, av vilka alla har kohesiva ändar, som passar för nämnda riktade ligation till nämnda många linjära DNA-vektorer; och

(e) nämnda andra blandning försätts i ligationsförhållanden under en tillräcklig tid, så att nämnda andra polypeptidgener ansluts operativt till nämnda vektorer och framställer mycket ringformade DNA-molekyler, av vilka var och en innefattar nämnda andra cistron för att exprimera nämnda andra polypeptid, varvid biblioteket bildas.

29. Förfarande enligt patentkrav 28, **kännetecknat** av att nämnda heterodimeriska receptor är ett epitopbindande komplex.

30. Bibliotek av dicistroniska DNA-molekyler, av vilka samtliga innefattar en första och en andra cistron, som kan exprimera en första och andra polypeptid av en heterodimerisk receptor, **kännetecknat** av att det är framställt med förfarandet enligt patentkrav 28.

31. Förfarande för att förändra diversiteten hos ett filamentfagpartikelbibliotek, **kännetecknat** av att förfarandet innefattar skeden, i vilka:

(a) ett filamentfagpartikelbibliotek enligt patentkrav 24 tas i bruk;

(b) det i bruk tagna biblioteket sätts i kontakt med en på förhand vald ligand under förhållanden som är tillräckliga, så att bibliotekets delar binds till liganden och bildar ett ligand-fagpartikelkomplex; och

c) fagpartiklarna i nämnda komplex isoleras från obundna delar av biblioteket för att bilda ett med ligand anrikat bibliotek, som innefattar fagpartiklar, som har bindningsspecificitet med avseende på nämnda på förhand valda ligand.

32. Förfarande enligt patentkrav 31, **kännetecknat** av att nämnda på förhand valda ligand fästs vid ett stationärt underlag, att nämnda komplex är i fast fas och att nämnda isolering innefattar skeden, i vilka:

i) det stationära underlaget tvättas för att skölja bort de obundna delarna av biblioteket från det stationära underlaget; och

ii) fagpartiklarna bundna i fast fas elueras för att bilda nämnda isolerade fagpartiklar.

33. Förfarande enligt patentkrav 32, **kännetecknat** av att nämnda eluering innefattar att sätta nämnda fagpartiklar bundna i fast fas i kontakt med en elueringbuffert, vars pH är mellan pH 2 – pH 6.

34. Förfarande enligt patentkrav 32, **kännetecknat** av att nämnda eluering innefattar att sätta nämnda fagpartiklar bundna i fast fas i kontakt med en elueringsbuffert, som innehåller nämnda på förhand valda ligand.

35. Förfarande enligt patentkrav 32, **kännetecknat** av att nämnda filamentfags membranankare är ett cpVIII-membranankare.

36. Förfarande enligt patentkrav 32, **kännetecknat** av att nämnda filamentfags membranankare är ett cpIII-membranankare.

37. Förfarande för att öka diversiteten hos ett filamentfagpartikelbibliotek, **kännetecknat** av att det innefattar skeden, i vilka:

a) ett filamentfagpartikelbibliotek enligt patentkrav 24 tas i bruk;

b) en nukleotidsekvens som kodar en varierande domän av immunoglobulin i varje DNA-expressionsvektor i biblioteket muteras för att bilda ett bibliotek av fagpartiklar, av vilka var och en innehåller en nukleotidsekvens av en varierande domän av muterat immunoglobulin.

38. Förfarande för att mogna affinitet av ett epitopbindande komplex, som kodas av en filamentfag enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att det innefattar skeden, i vilka:

a) ett genom av nämnda filamentfag tas i bruk;

b) nukleotidsekvensen som kodar en variabel domän av immunoglobulin i det i bruk tagna genomet muteras för att skapa ett bibliotek av fagpartiklar, som innehåller en nukleotidsekvens av en varierande domän av det muterade immunoglobulinet;

c) biblioteket som skapades i skede b) sätts i kontakt med en på förhand bestämd ligand under förhållanden, som är tillräckliga för att bibliotekets delar skall bindas vid liganden och bilda ett ligandfagpartikelkomplex; och

d) fagpartiklarna i nämnda komplex isoleras från obundna delar av biblioteket för att skapa ett ligandanrikat bibliotek, som innefattar fagpartiklar, som har bindningsspecificitet med avseende på nämnda på förhand valda ligand.

39. Förfarande enligt patentkrav 38, **kännetecknat** av att nämnda mutering innefattar exponering av nukleotidsekvensen som kodar en variabel domän av nämnda immunoglobulin för en för fel utsatt polymeraskedjereaktion.

40. Förfarande enligt patentkrav 38, **kännetecknat** av att nämnda mutering innefattar reproduktion av CDR-delen av nämnda immunoglobulingen med en polymeraskedjereaktion (PCR).

41. Förfarande enligt patentkrav 38, **kännetecknat** av att immunoglobulinets variabla domän är V_H.

42. Förfarande för att detektera närvaro av en på förhand vald ligand i ett prov, **kännetecknat** av att förfarandet innefattar skeden, i vilka:

a) ett prov blandas, som misstänks innehålla en på förhand vald antigen, med en ligandbindande heterodimerisk receptor enligt patentkrav 1, som binds vid nämnda på förhand valda ligand under bindningsförhållanden, som är tillräckliga för att nämnda ligandbindande heterodimeriska receptor skall binda nämnda ligand och bilda ett ligand-receptorkomplex; och

b) närvaro av nämnda ligand-receptorkomplex eller nämnda ligandbindande heterodimeriska receptor exprimeras.

43. Förfarande enligt patentkrav 42, **kännetecknat** av att den ligandbindande heterodimeriska receptorn är belägen på filamentfagpartikelns yta.

44. Förfarande enligt patentkrav 43, **kännetecknat** av att den ligandbindande heterodimeriska receptorn är fusionerad till filamentfagens membrananker, som är vald ur en grupp som består av cpIII och cpVIII.

45. Förfarande enligt patentkrav 43, **kännetecknat** av att nämnda detektion innefattar detektionen av närvaro av nämnda filamentfagpartikel och sålunda expression av produktens närvaro.

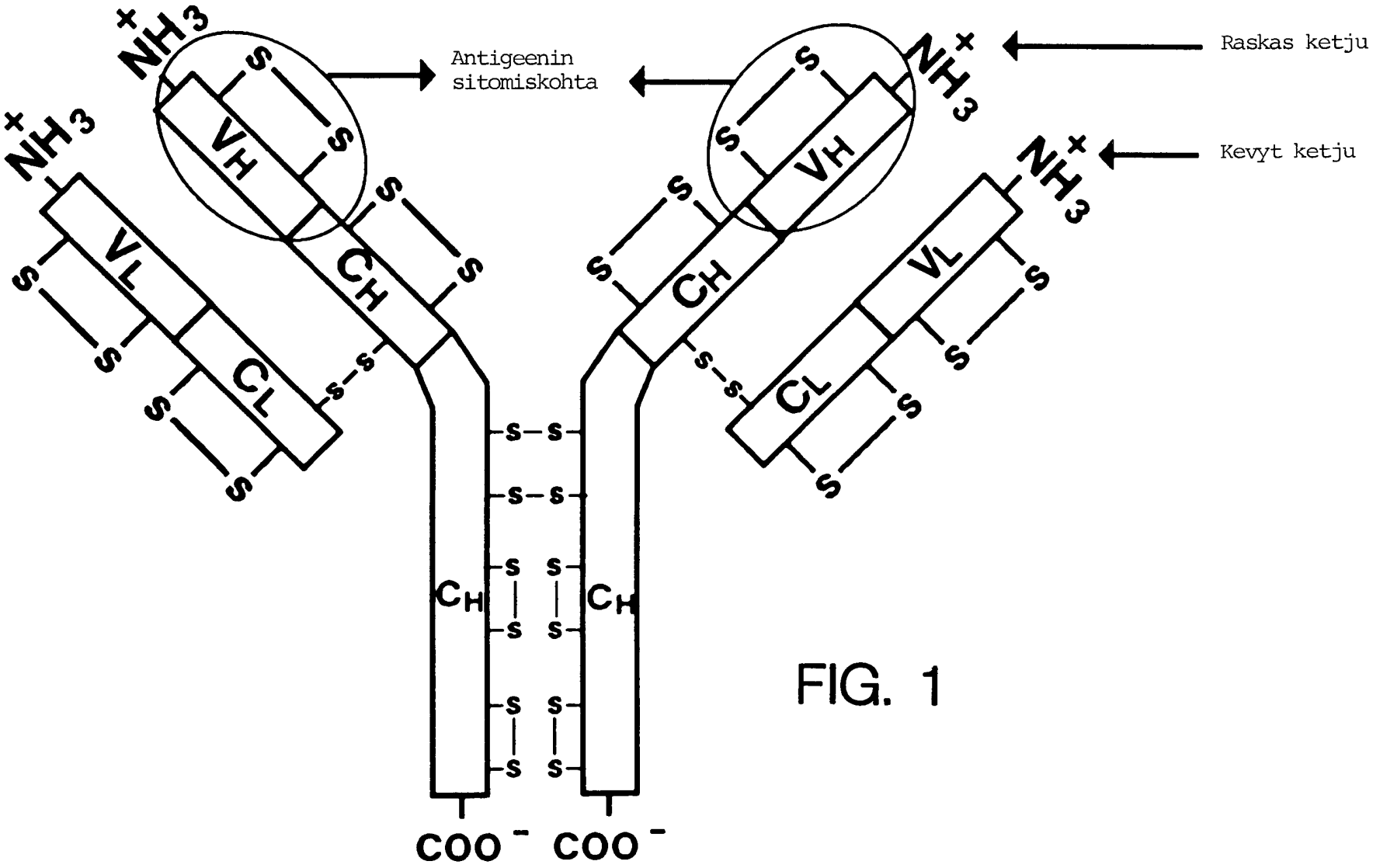

Antigeenin
sitomiskohta
Raskas ketju
Kevyt ketju
NH_3^+
VH
CH
VL
CL
COO⁻

FIG. 1

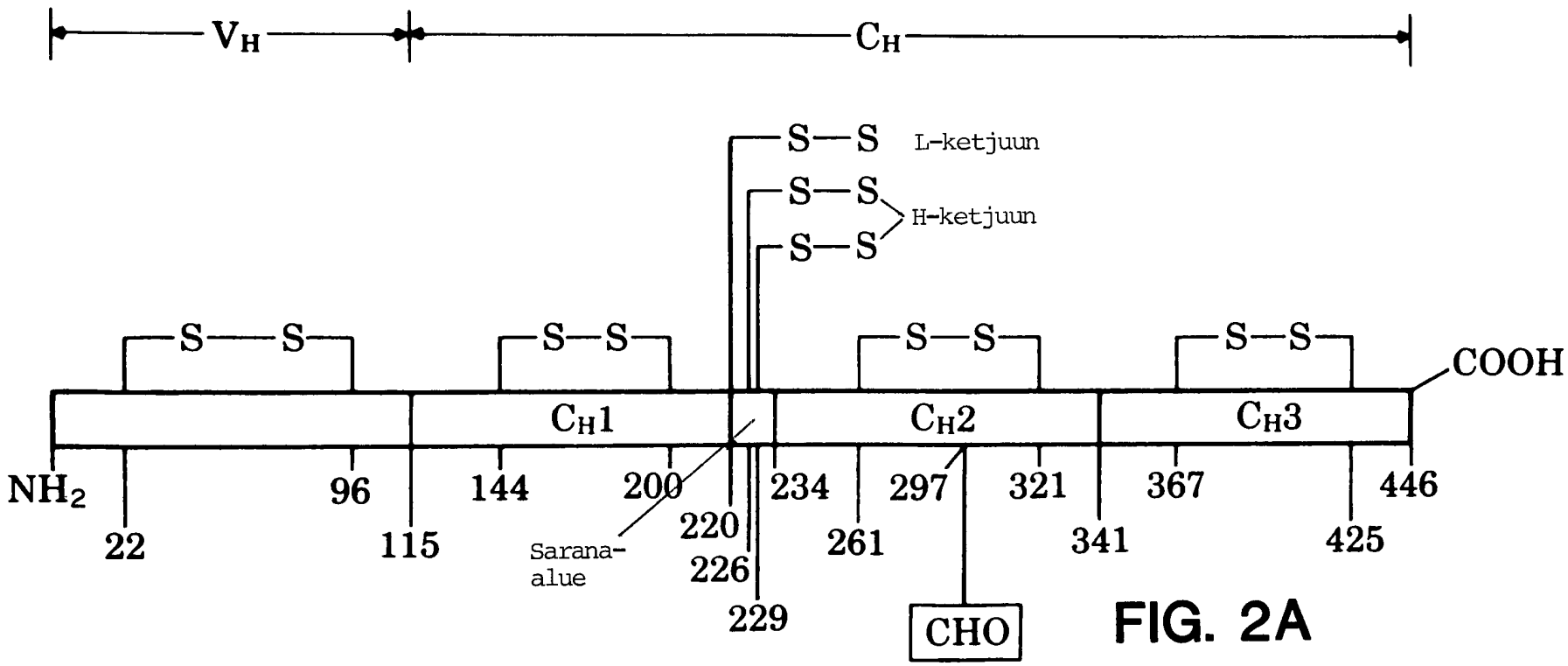
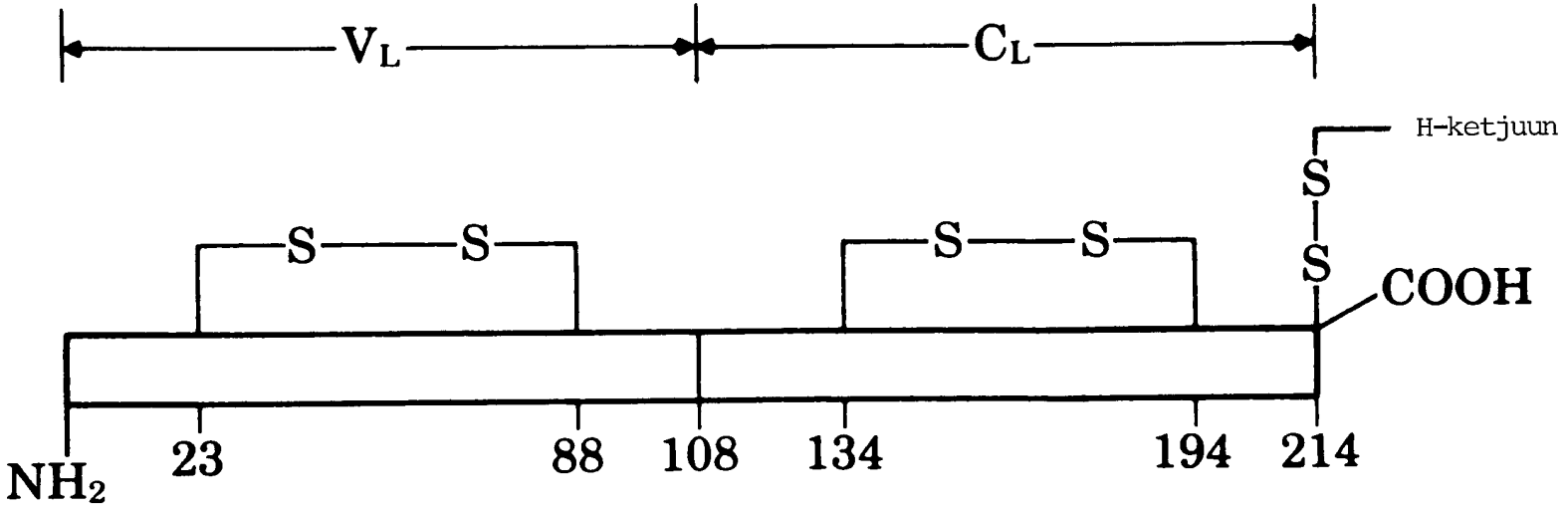

VH
CH
S—S
L-ketjuun
S—S
S—S
H-ketjuun
S—S
S—S
S—S
S—S
COOH
CH1
CH2
CH3
NH2
22
96
115
144
200
Sarana-
alue
220
226
229
234
261
297
CHO
321
341
367
425
446

FIG. 2A

FIG. 2B-1



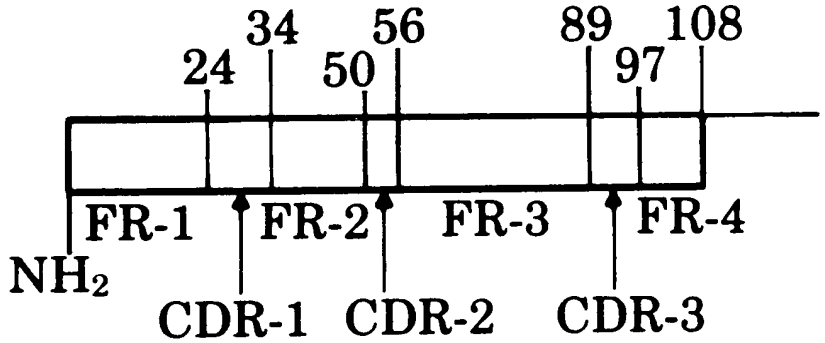


FIG. 2B-2


MET
GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATG
CGTTTAAGATAAAGTTCCTCTGTCAGTATTAC
JOHTOSEKVENSSI
AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT
TTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGA
JOHTOSEKVENSSI
GGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
CCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC
LIITTÄJÄ
LIITTÄJÄ
NCOI
V_H-RANKA
XHOI
SPEI
CCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGT
GGTACCGGGTCCACTTTGACGAGCTCTAAAGATCTGATCA
STOP
LIITTÄJÄ
TyrProTyrAspValProAspTyrAlaSer
TACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTCG
ATGGGCATGCTGCAAGGCCTGATGCCAAGAATTATCTTAAGCAGCT

FIG. 3

FIG. 4

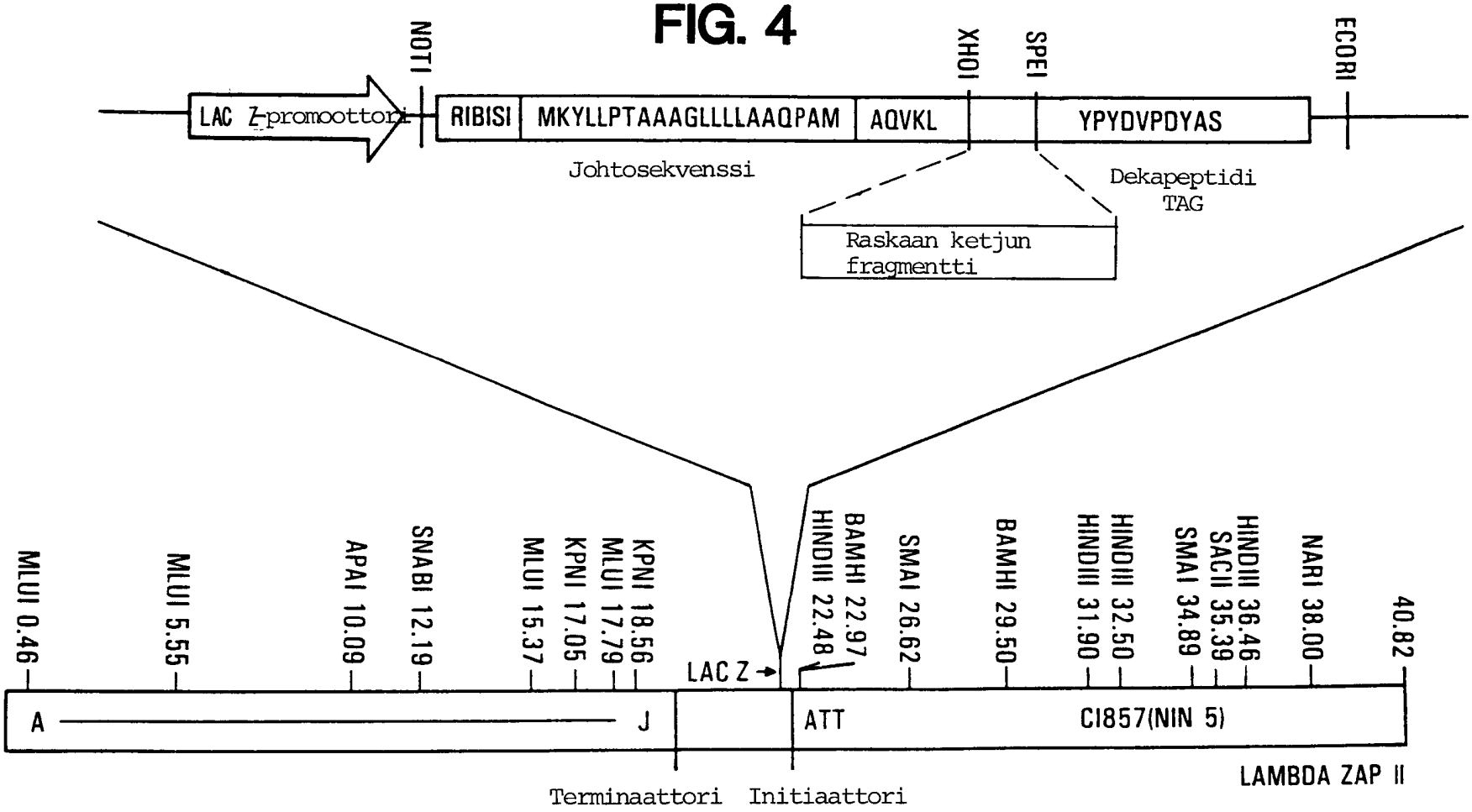

NOTI
XHOI
SPEI
ECORI
LAC Z-promoottori
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM
AQVKL
YPYDVPDYAS
Johtosekvenssi
Dekapeptidi
TAG
Raskaan ketjun
fragmentti
MLUI 0.46
MLUI 5.55
APAI 10.09
SNABI 12.19
MLUI 15.37
KPNI 17.05
MLUI 17.79
KPNI 18.56
HINDIII 22.48
BAMHI 22.97
SMAI 26.62
BAMHI 29.50
HINDIII 31.90
HINDIII 32.50
SMAI 34.89
SACII 35.39
HINDIII 36.46
NARI 38.00
40.82
LAC Z
A
J
ATT
CI857(NIN 5)
Terminaattori
Initiaattori
LAMBDA ZAP II

FIG. 5


ECOR I
SHINE-DALGARNO
MET
TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAAT
TCGAACTTAAGATTTGATCAGCGGTTCCTCTGTCAGTATTACTTTA
JOHTOSEKVENSSI
ACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
TGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC
NCO I
SAC I
XBA I
Not I
CCATGGCCGAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG
GGTACCGGCTCGAGCAGTCAAGATCTCAATTCGCCGGCAGCT

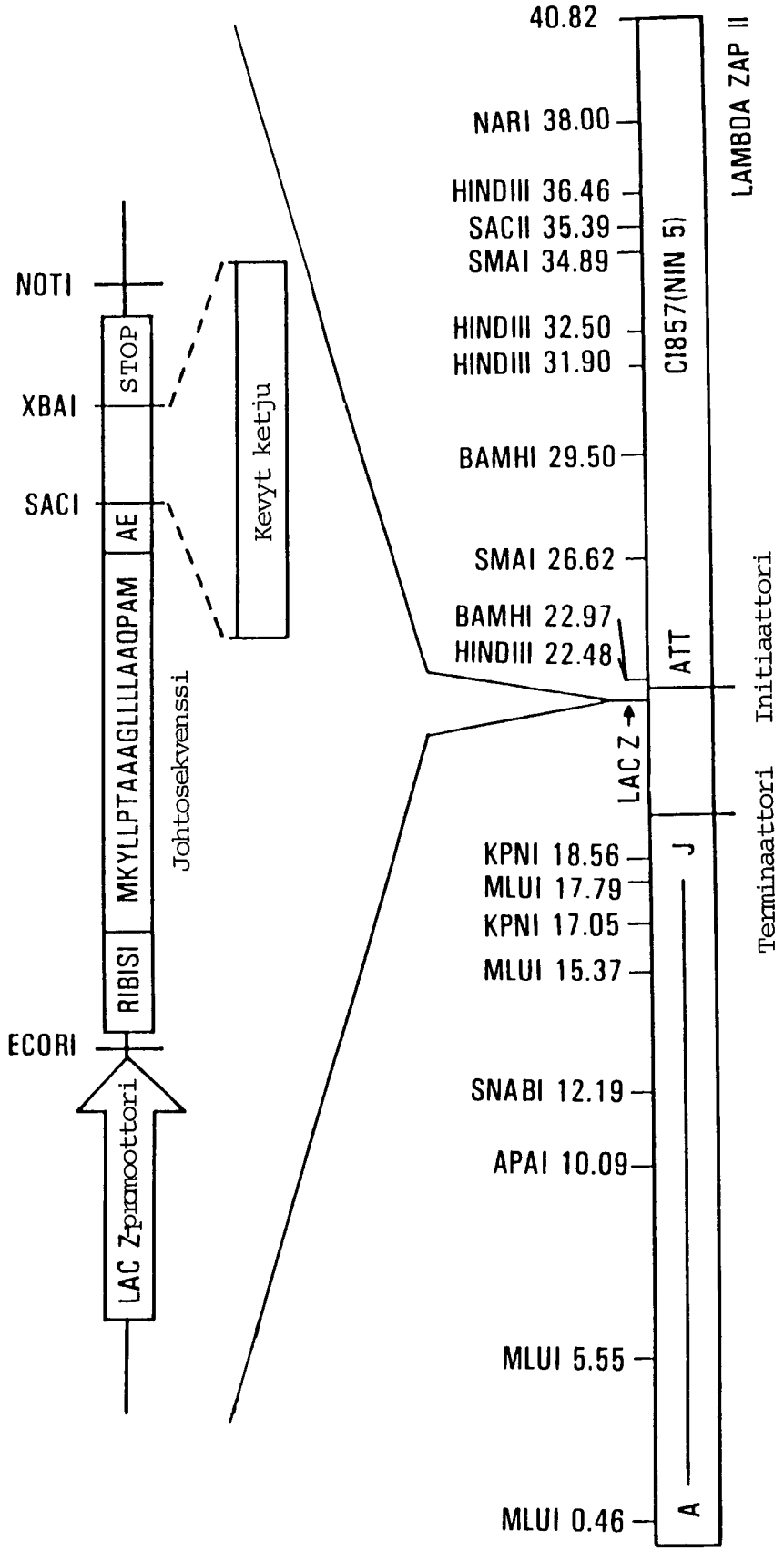

40.82
NARI 38.00
HINDIII 36.46
SACII 35.39
SMAI 34.89
HINDIII 32.50
HINDIII 31.90
BAMHI 29.50
SMAI 26.62
BAMHI 22.97
HINDIII 22.48
KPNI 18.56
MLUI 17.79
KPNI 17.05
MLUI 15.37
SNABI 12.19
APAI 10.09
MLUI 5.55
MLUI 0.46
LAMBDA ZAP II
CI857(NIN 5)
ATT
LAC Z
J
A
Initiaattori
Terminaattori
NOTI
XBAI
SACI
ECORI
STOP
AE
MKYLLPTAAAGLLLAAQPAM
RIBISI
Johtosekvenssi
Kevyt ketju
LAC Z-promoottori

FIG. 6

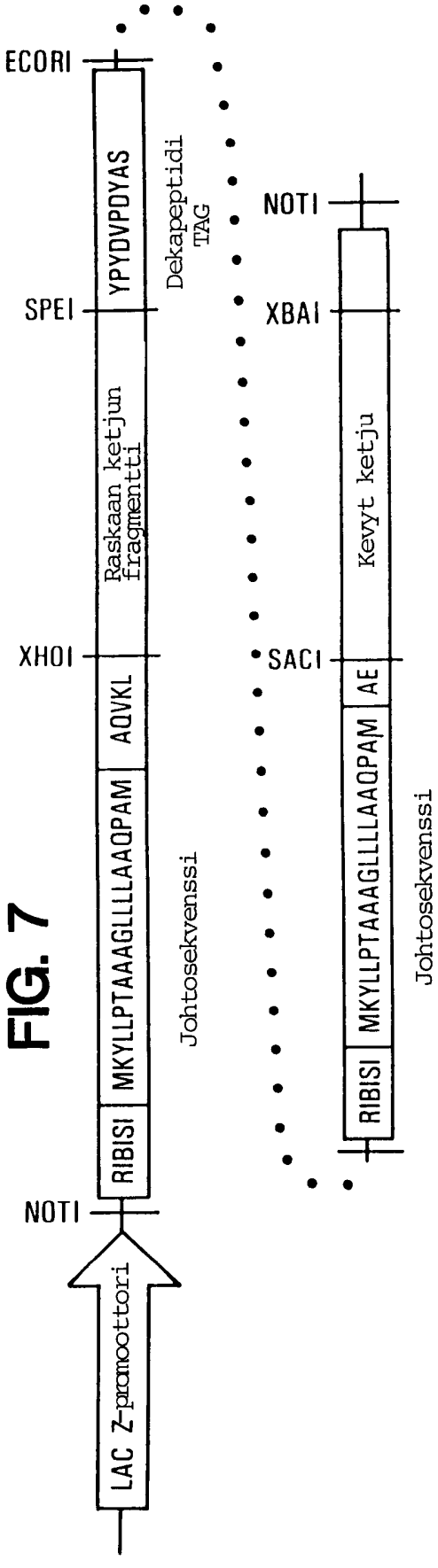

ECORI
SPEI
XHOI
NOTI
NOTI
XBAI
SACI
LAC Z-promoottori
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM
AQVKL
Raskaan ketjun fragmentti
YPYDVPDYAS
Dekapeptidi TAG
Johtosekvenssi
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM
AE
Kevyt ketju
Johtosekvenssi

FIG. 7

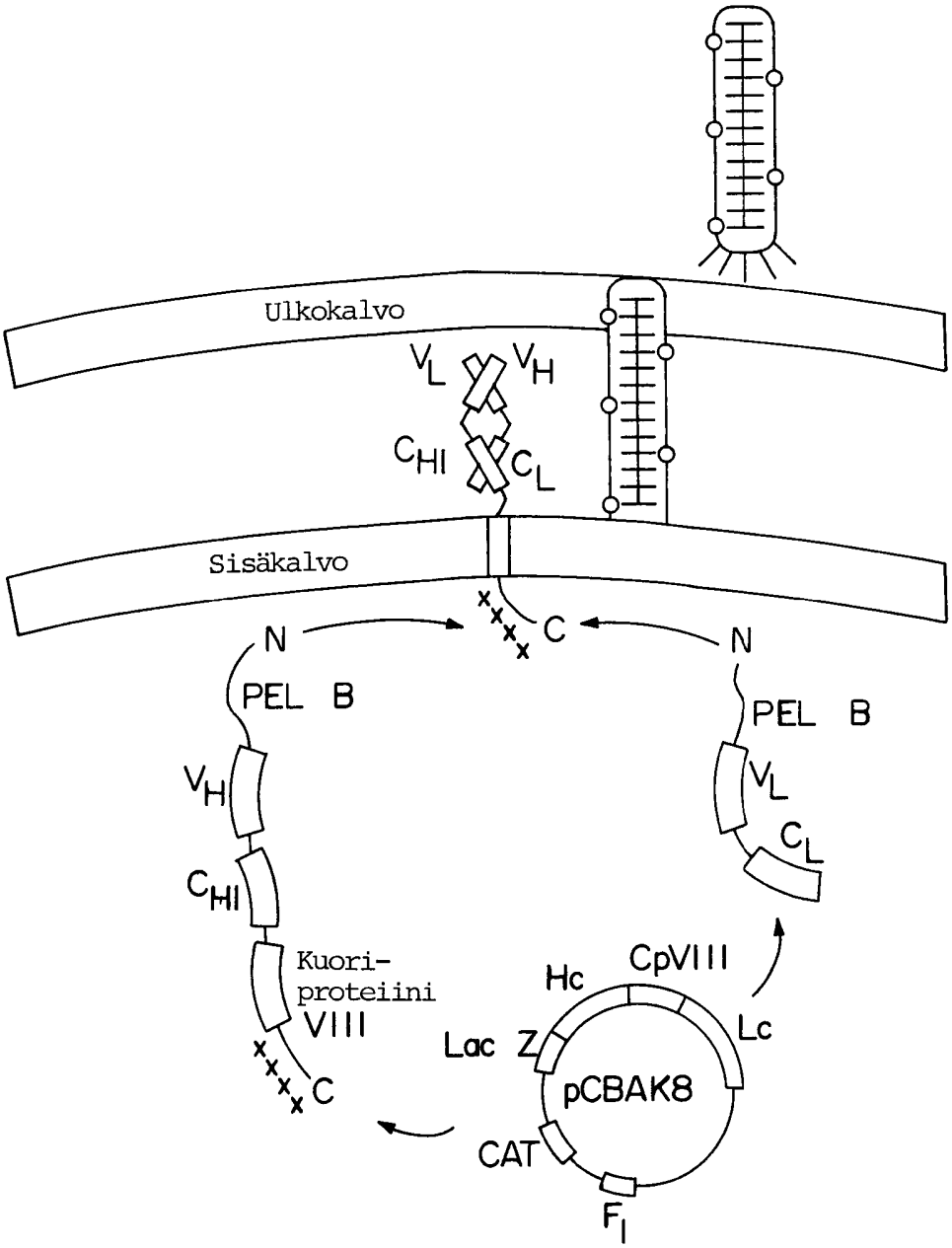

Ulkokalvo
V_L
V_H
C_{HI}
C_L
Sisäkalvo
N
C
N
PEL B
PEL B
V_H
V_L
C_{HI}
C_L
Kuori-
proteiini
VIII
C
Hc
CpVIII
Lac Z
Lc
pCBAK8
CAT
F_1

FIG. 8

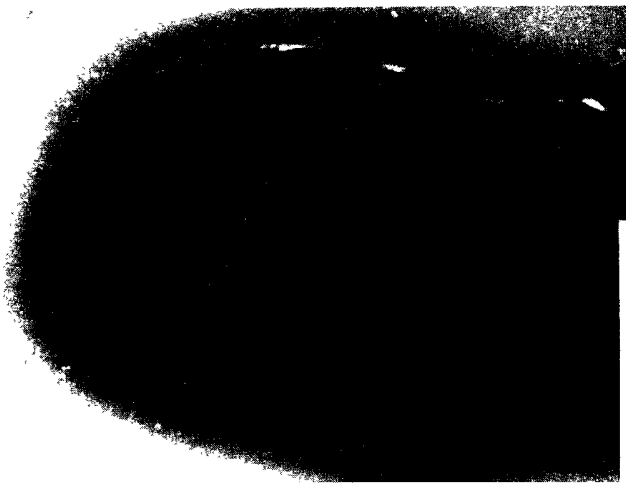


FIG. 9A-1



FIG. 9A-2

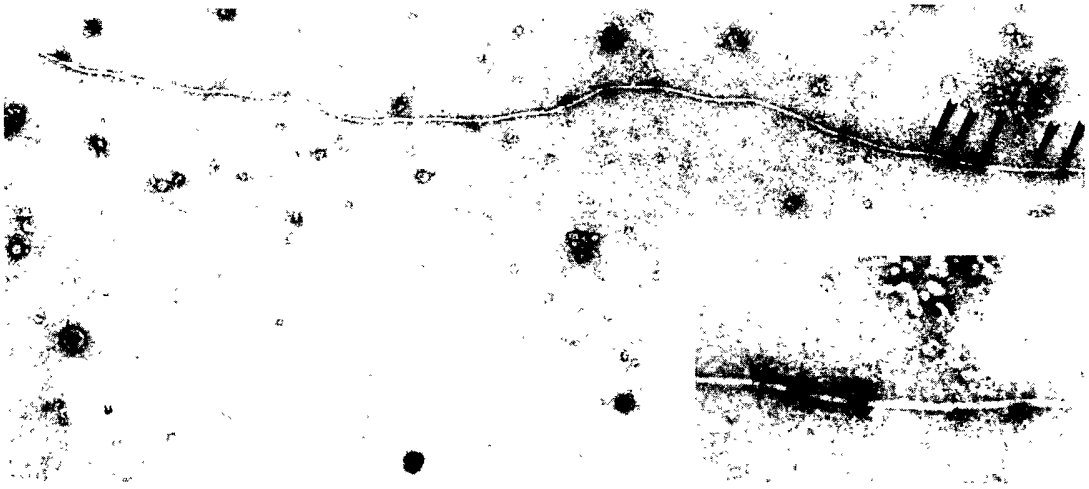


FIG. 9B-1

FIG. 9B-2

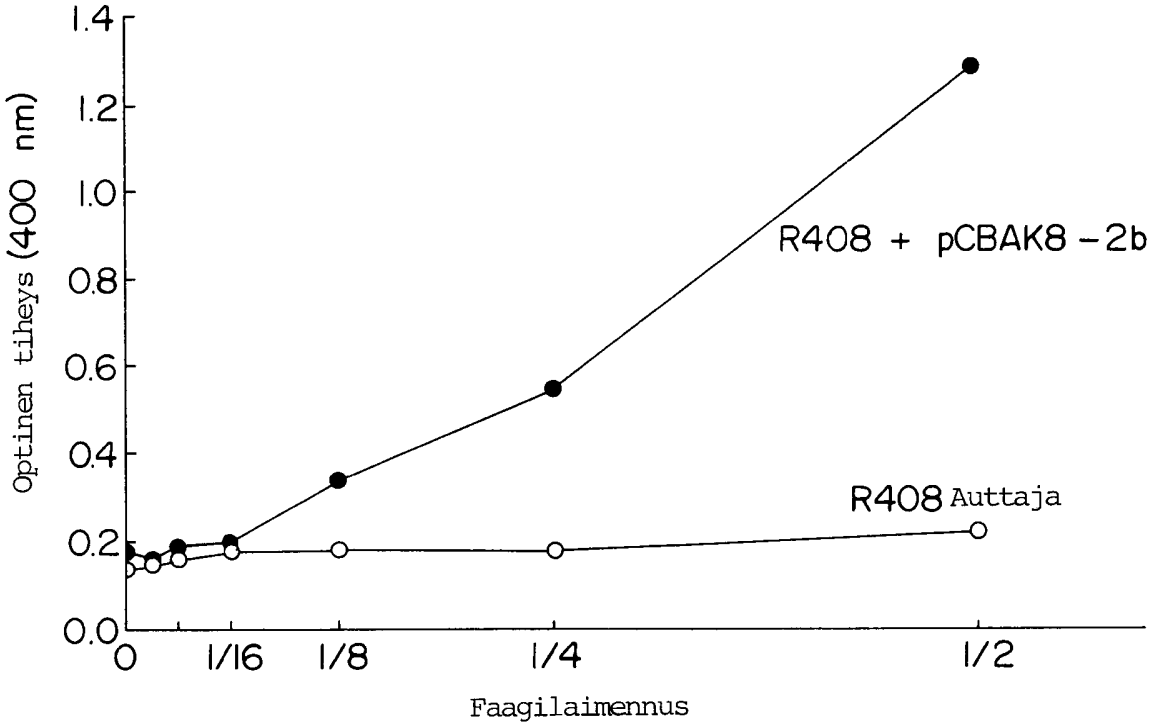

Optinen tiheys (400 nm)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
R408 + pCBAK8 – 2b
R408 Auttaja
0
1/16
1/8
1/4
1/2
Faagilaimennus

FIG. 10

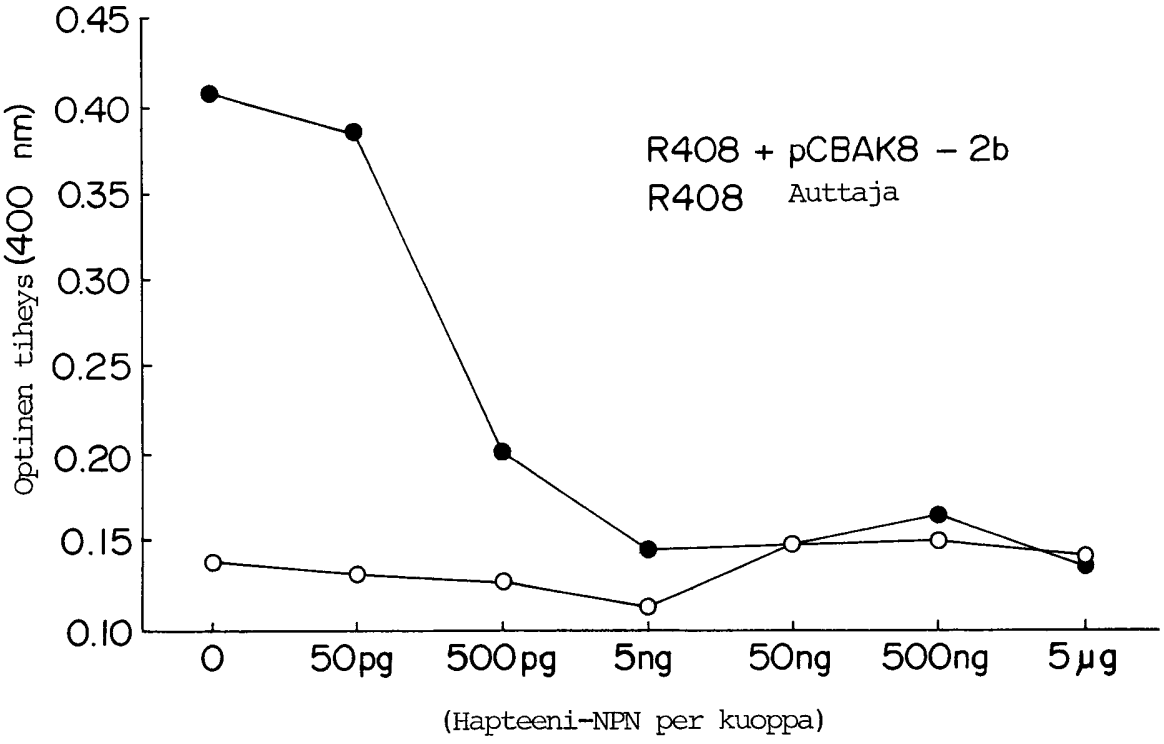

Optinen tiheys (400 nm)
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
R408 + pCBAK8 – 2b
R408 Auttaja
0
50pg
500pg
5ng
50ng
500ng
5µg
(Hapteeni-NPN per kuoppa)

FIG. 11

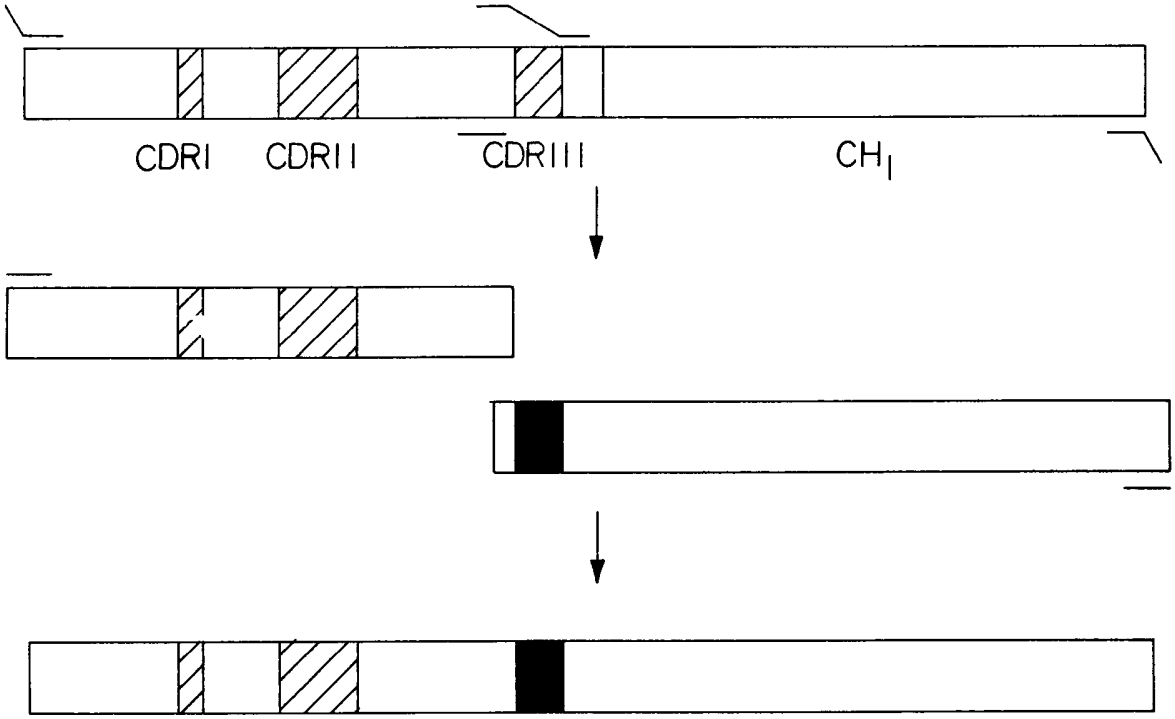


FIG. 12

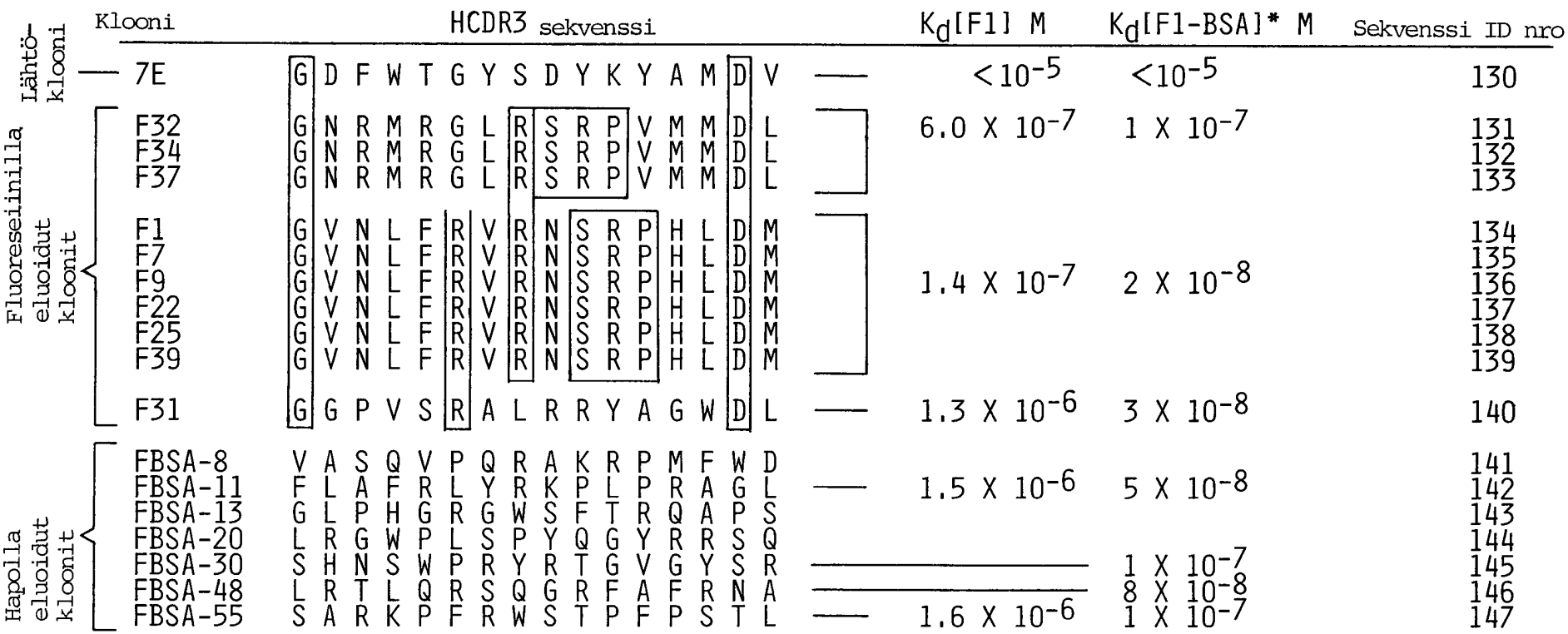

Klooni
HCDR3 sekvenssi
K_d[F1] M
K_d[F1-BSA]* M
Sekvenssi ID nro
Lähtö-klooni
Fluoreseiinilla eluoidut kloonit
Hapolla eluoidut kloonit
7E G D F W T G Y S D Y K Y A M D V — <10-5 <10-5 130
F32 G N R M R G L R S R P V M M D L 6.0 X 10-7 1 X 10-7 131
F34 G N R M R G L R S R P V M M D L 132
F37 G N R M R G L R S R P V M M D L 133
F1 G V N L F R V R N S R P H L D M 134
F7 G V N L F R V R N S R P H L D M 135
F9 G V N L F R V R N S R P H L D M 1.4 X 10-7 2 X 10-8 136
F22 G V N L F R V R N S R P H L D M 137
F25 G V N L F R V R N S R P H L D M 138
F39 G V N L F R V R N S R P H L D M 139
F31 G G P V S R A L R R Y A G W D L — 1.3 X 10-6 3 X 10-8 140
FBSA-8 V A S Q V P Q R A K R P M F W D 141
FBSA-11 F L A F R L Y R K P L P R A G L — 1.5 X 10-6 5 X 10-8 142
FBSA-13 G L P H G R G W S F T R Q A P S 143
FBSA-20 L R G W P L S P Y Q G Y R R S Q 144
FBSA-30 S H N S W P R Y R T G V G Y S R 1 X 10-7 145
FBSA-48 L R T L Q R S Q G R F A F R N A 8 X 10-8 146
FBSA-55 S A R K P F R W S T P F P S T L — 1.6 X 10-6 1 X 10-7 147

FIG. 13

	Klooni	Kevyen ketjun CDR3, joka vastaa Kabat-asemia 92-96	Sekvenssi ID nro
Lähtö-klooni	7E	Gly Ser Ser Leu Trp	148
Fluoreseiinilla eluoidut kloonit	p2	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p21	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p23	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p28	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p19	Thr Arg Pro Gly Val	149
	p15	Ser Phe Lys Asn Trp	150
	p11	Gly Tyr Arg Lys Trp	151

FIG. 14