



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁶: C 07 K 16/46 C 12 N 5/16 C 12 N 15/13

(21) Patentansøgning nr: PA 1990 01499

(22) Indleveringsdag: 1990-06-19

(24) Løbedag: 1989-10-04

(41) Alm. tilgængelig: 1990-08-17

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2000-01-10

(86) International ansøgning nr: PCT/US89/04402

(86) International indleveringsdag: 1989-10-04

(85) Videreførelsesdag: 1989-10-04

(30) Prioritet: 1988-10-19 US 259943

(73) Patenthaver: The Dow Chemical Company, 2030 Dow Center Abbott Road, Midland, MI 48640, USA

(72) Opfinder: Peter Mezes, 5101 Oakridge Drive, Midland, MI 48640, USA
Brian Gourlie, 3713 Orchard Drive, Midland, MI 48640, USA
Mark Rixon, 4110 Castle Drive, Midland, MI 48640, USA

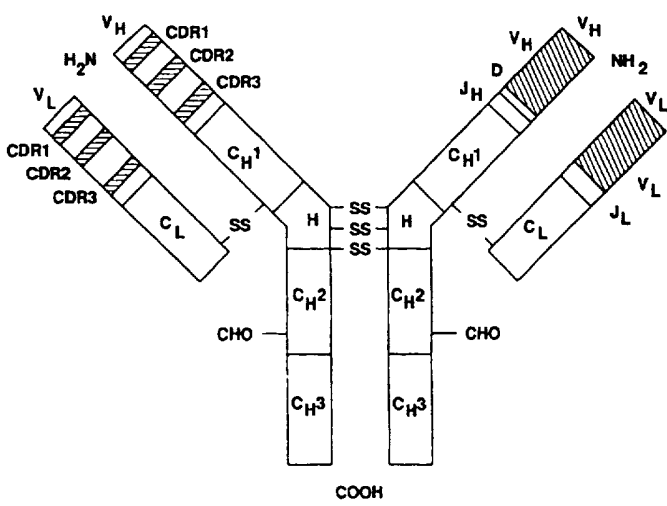
(74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1553 København V, Danmark

(54) Benævnelse: **Selektivt reaktivt antistof eller funktionelt fragment deraf , konjugat omfattende antistoffet eller dets funktioneller fragment, fremgangsmåde til fremstilling af konjugatet, DNA-sekvens kodende for mindst én selektivt reaktiv del af antistoffet,**

(57) Sammendrag:

En familie af kimære antistoffer med høje affiniteter over for et højmolekylært tumor-forbundet sialyleret glycoproteinantigen (TAG72) af human oprindelse. Disse antistoffer har (1) dyre-V_H- og -V_L-sekvenser med høj affinitet, som formidler TAG72binding og (2) humane C_H- og C_L-regioner. De menes at frembringe signifikant færre bivirkninger, når indgivet til mennesker i kraft af deres humane C_H- og C_L-antistofområder. Nukleotid- og aminosyresekvenser af V_H TAG V_H, CC46 V_H, CC49_H, CC83 V_H og CC92 V_H og CC49 V_L-, CC83 V_L- og CC92 V_L-idiotypsekvenser er beskrevet såvel som in vivo-metoder til behandling og diagnostisk analyse under anvendelse af disse kimære antistoffer.

FIG.1



Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte, selektivt reaktive antistoffer eller funktionelle fragmenter deraf, konjugater omfattende sådanne antistoffer eller funktionelle fragmenter deraf, DNA-sekvenser, som koder for i det mindste selektivt reaktive antistofdele, ekspressionsvehikler indeholdende sådanne DNA-sekvenser, en fremgangs-

5 måde til fremstilling af ekspressionsvehikler og celler transformeret med disse vehikler, midler omfattende de selektivt reaktive antistoffer eller funktionelle fragmenter deraf samt en fremgangsmåde til fremstilling af transformerede værter.

Antistoffer er specifikke immunoglobulinpolypeptider (Ig-polypeptider), som fremstilles af hvirveldyrers immunsystem, som reaktion på udfordringer af fremmede proteiner, glycoproteiner, celler eller andre antigene fremmede stoffer. Den sekvens af begivenheder, som muliggør, at organismen kan overkomme invasion af fremmede celler eller få rensset systemet for fremmede celler, er i det mindste delvis forstået. En vigtig del af

15 denne fremgangsmåde er fremstillingen af antistoffer, som specifikt binder til et bestemt fremmed stof. Bindingspecificiteten af sådanne polypeptider til et bestemt antigen er meget forfinet og den række af specificiteter, som det individuelle hvirveldyr er i stand til at danne, er bemærkelsesværdigt med hensyn til dets kompleksitet og variationsevne. Millioner af

20 antigener er i stand til at fremkalde antistofreaktioner, hvor hvert antistof næsten udelukkende er rettet mod det bestemte antigen, som fremkaldte det.

To hovedkilder for hvirveldyrers antistoffer benyttes for tiden

25 - dannelse in situ af mæmmale B-lymfocytter og dannelse i cellekultur af B-cellehybrider. Antistoffer dannes in situ som

et resultat af differentieringen af ikke fuldt udviklede B-lymfocytter i plasmaceller, som forekommer som reaktion på som stimulering med specifikke antigener. I de ikke-differentierede B-celler er delene af DNA, som koder for de forskellige regioner på immunoglobulinkæderne, adskilt i det genome DNA. 5 Sekvenserne samles sekventielt før ekspression. Et resume af denne proces er blevet givet af Gough, Trends in Biochem. Sci. 6, 203 (1981).

10 Det opnåede omlejrrede gen er i stand til ekspression i den fuldt udviklede B-lymfocyt til fremstilling af det ønskede antistof. Selv når et bestemt pattedyr udsættes for et enkelt antigen, opnås der imidlertid ikke en ensartet antistofpopulation. In situ-immunreaktionen over for ethvert særligt antigen defineres af den mosaik af reaktioner over for forskellige determinanter, som er til stede på antigenet. Hver undergruppe 15 af homologe antistoffer bidrages af en enkelt population af B-celler - således er in situ-dannelse af antistoffer "polyklon".

20 Denne begrænsede, men iboende heterogenitet, er blevet overvundet i adskillige bestemte tilfælde ved brug af hybridomateknologi til dannelse af "monoklone" antistoffer i cellekultur af B-cellehybridomaer ["se Kohler og Milstein, C., Nature 256, 495-497 (1975)].

25 Ved denne proces sammensluttet de relativt kortlivede eller dødelige splenocytter eller lymfocytter fra et pattedyr, som er

blevet injiceret med antigen, med en udødelig tumorcellelinie, hvorved der således fremstilles hybridceller eller "hybridomaer", som er både udødelige og i stand til at fremstille B-cellens genetisk kodede antistof. De således dannede hybrider segregeres i enkelte genetiske stammer ved udvælgelse, fortynding og vækst igen, og hver stamme repræsenterer således en enkelt genetisk linie. De producerer derfor antistoffer, som der er sikkerhed for er homogene over for et ønsket antigen. Disse antistoffer kaldes "monoklone", idet der henvises til deres rene genetiske herkomst.

10

Monoklone antistoffer med monospecificitet har i høj grad haft indflydelse på immunologi, og deres anvendelighed er allerede blevet vist inden for sådanne videnskaber som biologi, farmakologi, kemi og andre. Sådanne monoklone antistoffer har fundet udbredt anvendelse ikke blot som diagnostiske reagenser [se f.eks. Immunology for the 80's, udgiver Voller, A., Bartlett, A., og Bidwell, D., MTP Press, Lancaster, (1981), men også terapi (se f.eks. Ritz, J. og Schlossman, S.F., Blood 59, 1-11, (1982)].

20 Monoklone antistoffer, som er fremstillet af hybridomaer, har en vigtig ulempe, selvom de teoretisk er effektive som beskrevet ovenfor, og klart er at foretrække sammenlignet med polyklone antistoffer på grund af deres specificitet. Til mange anvendelser er brugen af monoklone antistoffer, som er fremstillet i ikke-humane dyr, alvorlig begrænset, når der er tale om, at monoklone antistoffer skal anvendes i mennesker. Gen-

25

tagne injektioner af et "fremmed" antistof i mennesker, såsom et museantistof, kan føre til skadelige hypersensitivitetsreaktioner. Et sådant monoklont antistof, som hidrører fra en ikke-human kilde, forårsager, når det indgives til mennesker, en antistofreaktion mod ikke-humant antistof (ANHA). Se f.eks. Shawler et al., Journal of Immunology 135, 1530-1535 (1985) for en diskussion om en specifik ANHA-reaktion forårsaget af anvendelse af murint afledte antistoffer, human anti-museantistofreaktion (HAMA-reaktion).

- 5
- 10 Det menes, at dyreimmunoglobuliner med humane konstante regioner vil give en mindre ANHA-reaktion, når indgivet til mennesker, end dyreimmunoglobuliner med ikke-humane konstante regioner. Som sådanne menes monoklone antistoffer med gode bindingsaffiniteter for udvalgte antigener og med humane konstante regioner at have stor potentiel anvendelighed til immunologisk diagnose og behandling af menneskepatienter med cancer.
- 15

Der er indtil nu blevet gjort forskellige forsøg på at fremstille human-afledte monoklone antistoffer ved anvendelse af humane hybridomaer. F.eks. er der blevet fremstillet humane/humane hybridomaer [Olsson, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 77, 5429 (1980)]; humane/murine hybridomaer [(Schlom, J., et al. (ibid) 77, 6841 (1980)] og flere andre xenogene hybridkombinationer. Humane monoklone antistoffer er også blevet fremstillet ved transformation af lymfocytter under anvendelse af Epstein-Barr-virus. Sådanne hybridomaer kan imidlertid potentielt indeholde patogene humane virusser. Alternativt

er primære antistofproducerende B-celler blevet udødeliggjort in vitro ved transformation med viralt DNA. Uheldigvis er udbytter af monoklone antistoffer fra humane hybridomacellelinier relativt lave (1 µg/ml i humane hybridomaer sammenlignet med 100 µg/ml i musehybridomaer), og produktionsomkostninger er høje.

Selvom humane immunoglobuliner i høj grad er ønskede ved immunologisk diagnose og behandling af menneskecancerpatienter, har humane hybridomateknikker endnu ikke nået et stadie, hvor der let kan opnås humane monoklone antistoffer med ønskede antigene specificiteter. Endvidere kan forskere af indlysende etiske grunde ikke immunisere humane individer med udvalgte toksiske eller på anden måde skadelige antigener for at danne antistoffer mod det specifikke antigen. Dette lægger store restriktioner på immunologisk diagnose og behandling af menneskepatienter.

Fremstillingen af human-afledte monoklone antistoffer er bestemt mulig, men er stadig ikke effektiv på baggrund af dens lave reproducerbarhed og de andre ovenfor beskrevne problemer [se endvidere Nature 300, 316-318 (1982)]. Som en konsekvens heraf hidrører de fleste monoklone antistoffer fra ikke-humane dyr.

Et monoklont antistof, som reagerer med høj bindingsaffinitet over for humane tumorantigener, men som ikke genkendes som et

fremmed stof af mennesker, er i høj grad ønskeligt. En fremgangsmåde til overvindelse af denne vanskelighed, er kunstigt at danne et antistof, som meget ligner et humant antistof og ikke genkendes som et fremmed stof inden i menneskelegemet, dvs. et kimært eller "menneskeliggjort" antistof.

5

Typisk for kimære antistoffer efterligner den variable region i både lette og tunge kæder de variable regioner i antistoffer hidrørende fra en pattedyrsart, mens de konstante dele er homologe med sekvenserne i antistoffer hidrørende fra mennesker. En klar fordel ved sådanne kimære former er, at de variable regioner f.eks. hensigtsmæssigt kan hidrøre fra for tiden kendte kilder under anvendelse af let tilgængelige hybridomaer af B-celler fra ikke-humane værtsorganismer i kombination med konstante regioner hidrørende fra f.eks. humane cellepræparater. Mens specificiteten af den variable region ikke påvirkes af dens kilde er det mindre sandsynligt, at den konstante region værende human ville fremkalde en immunreaktion fra et humant individ, når antistofferne injiceres, end den konstante region fra en ikke-human kilde.

20 Et kendt humant tumorantigen er tumorassocieret glycoprotein (TAG72). TAG72 er associeret med overfladen af visse tumorceller af human oprindelse, specifik LS174T-tumorcellelinien. LS174T [American Type Culture Collection (herf ATCC) nr. CL 188] er en variant af LS180-tarmadenocarcinomlinie (ATCC nr. CL 187).

25

Karyotypen af LS174T ligner den hos LS180, idet der mangler et X-kromosom i en større del af cellerne. Der er blevet præsenteret data, som beskrevet i Johnson V.G. et al., Cancer Res. 46, 850-857 (1986), til karakterisering af TAG72-molekylet som et mucin. Denne konklusion er baseret på de følgende iagttagelser: (a) TAG72 har en høj molekylvægt ($>1 \times 10^6$), som vist ved dens udelukkelse fra en Sepharose® CL-4B-søjle; (b) massefylden af TAG72 bestemt ved ligevægtscentrifugering i CsCl var 1,45 g/ml, hvilket indikerer et kraftigt glycosyleret glycoprotein; (c) TAG72 har en ændring i vandring efter neuraminidasefordøjelse, hvilket indikerer, at det er et kraftigt sialyleret molekyle med en righed af O-glycosidiskalt koblede oligosaccharider, som er karakteristiske for muciner; (d) blodgruppeantigener, som almindeligvis findes på muciner, findes på affinitets-oprenset TAG72; og (e) Chondroitinase ABC-fordøjelse havde ingen virkning på TAG72, hvilket viser, at TAG72-epitopet ikke udtrykkes på en chondroitinsulfatproteoglycan.

Der er blevet udviklet adskillige murine monoklone antistoffer, som har bindingspecificitet for TAG72. Et af disse monoklone antistoffer betegnet B72.3, er ét murint IgG1, der er fremstillet af hybridoma B72.3 (ATCC nr. HB-8108). B72.3 er et monoklont første generationsantistof, som er udviklet under anvendelse af et humant brystcarcinomekstrakt som immunogenet (se Colcher, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 3199-3203 (1981); og US patentskrifterne nr. 4.522.918 og nr. 4.612.282). Som anvendt heri menes der med betegnelsen "monoklont første generationsantistof" et monoklont antistof, som er

fremstillet under anvendelse af som immunogenet, et råcelle-ekstrakt.

Andre monoklone antistoffer rettet mod TAG72 betegnes "CC" (coloncancer). Monoklone CC-antistoffer er en familie af murine monoklone andengenerationsantistoffer. Som anvendt heri
5 menes der med udtrykket "monoklont andengenerationsantistof" et monoklont antistof, som er fremstillet under anvendelse af som immunogenet, et antigen, der er oprenset med et monoklont førstegenerationsantistof. Monoklone CC-antistoffer blev fremstillet under anvendelse af TAG72 oprenset med B72.3. En
10 diskussion af metoden til fremstilling af CC-antistofferne er anført i US patentansøgning 7-073.685 (USPA 7-073.685), idet ansøgningen blev indleveret af Schlom et al. 15. juli 1987 og er tilgængelig for offentligheden fra the National Technical Information Service. På grund af deres relativt gode bindings-
affiniteter for TAG72 er de følgende CC-antistoffer blevet deponeret hos ATCC, idet der er blevet anmodet om begrænset
15 adgang: CC49 (ATCC nr. HB 9459); CC83 (ATCC nr. HB 9453); CC46 (ATCC nr. HB 9458); CC92 (ATCC nr. 9454); CC30 (ATCC nr. HB 9457); CC11 (ATCC nr. 9455); og CC15 (ATCC nr. HB 9460).

20

Inden for den kendte teknik er der ikke blevet isoleret noget humant antistof, som binder relativt stærkt til TAG72. Passende antistoffer må derfor blive udformet.

Det er kendt, at funktionen af et Ig-molekyle er afhængig af
25 dets tredimensionelle struktur, hvilket på sin side er afhængig af dets primære aminosyresekvens. Således kan ændring af aminosyresekvensen i et Ig påvirke dets aktivitet i ugunstig

retning. Endvidere kan en ændring i DNA-sekvensen, som koder for Ig'et påvirke evnen hos cellen indeholdende DNA-sekvensen til at udtrykke, secernere eller samle Ig.

- 5 I USPA 7-073.685 beskrives, at CC-antistofferne kan ændres i deres kimære form ved at erstatte f.eks. konstante museregioner med humane konstant region-(Fc)-områder ved DNA-rekombineringsteknikker, som er kendt inden for området. Det menes, at de forslag, der er anført i USPA 7-073.685 ikke førte til et faktisk forsøg på at udtrykke nogle som helst kimære Ig-polypeptidkæder, heller ikke til at fremstille Ig-aktivitet og
10 heller ikke til at secernere og samle Ig-kæder til de ønskede kimære Ig'er.

Det er derfor overhovedet ikke klart ud fra den kendte teknik at kendte DNA-rekombineringsteknikker rutinemæssigt vil frem-
15 bringe et kimært dyre-humant antistof ud fra udvalgte DNA-kilder, som frembringer funktionelle kimære antistoffer, der binder specifikt til udvalgte humane carcinomaer, og som reducerer fremkomsten af ANHA-bivirkninger, når indgivet til mennesker.

- 20 Ifølge den foreliggende opfindelse er der nu overraskende tilvejebragt et hidtil ukendt antistof af den i krav 1 angivne art eller et fragment deraf, der er i stand til selektivt at reagere med et særligt antigen eller en særlig antigenfamilie.

Ifølge opfindelsen er der også tilvejebragt hidtil ukendte antistof- eller antistoffragment-konjugater af den i krav 2 omhandlede art til diagnostiske formål samt af den i krav 4
25 angivne art til terapeutiske formål. Ligeledes ifølge opfindelsen anvises en fremgangsmåde af den i krav 15 angivne art til fremstilling af sådanne konjugater.

Den foreliggende opfindelse angår endvidere DNA-sekvenser af den i krav 8 angivne art, hvilke sekvenser i det mindste koder for en selektivt reaktiv del af et antistof ifølge opfindelsen, og biologisk funktionelle ekspressionsvehikler ifølge krav 10 indeholdende sådanne DNA-sekvenser og anviser også en fremgangsmåde af den i krav 16 angivne art til fremstilling af rekombinante ekspressionsvehikler.

Ydermere angår opfindelsen celler ifølge krav 11 som vært transformeret med det omhandlede biologisk funktionelle ekspressionsvehikel samt anviser en fremgangsmåde som angivet i krav 17 til fremstilling af en transformeret vært.

Endelig angår opfindelsen et middel af den i krav 13 angivne art omfattende et antistof eller antistoffragment ifølge opfindelsen eller et middel af den i krav 14 angivne art omfattende et antistof- eller antistoffragmentkonjugat ifølge opfindelsen.

Fig. 1 illustrerer en grundlæggende immunoglobulinstruktur, idet de enzymatiske kløvningssteder er vist.

Fig. 2 illustrerer nukleotidsekvenserne af $V_H\alpha$ TAG V_H , CC46 V_H , CC49 V_H , CC83 V_H og CC92 V_H .

Fig. 3 illustrerer aminosyresekvenserne af $V_H\alpha$ TAG V_H , CC46 V_H , CC49 V_H , CC83 V_H og CC92 V_H .

Fig. 4a illustrerer nukleotidsekvensen, og fig. 4b illustrerer den tilsvarende aminosyresekvens af CC49 V_L .

Fig. 5a illustrerer nukleotidsekvensen, og fig. 5a illustrerer den tilsvarende aminosyresekvens af CC83 V_L .

Fig. 6a illustrerer nukleotidsekvensen, og fig. 6b illustrerer den tilsvarende aminosyresekvens af CC92 V_L.

5 Fig. 7 illustrerer nukleotidsekvensen af HindIII-PstI-fragmentet isoleret fra plasmidet pGD1.

Fig. 8 illustrerer plasmidkortet for pBLUESCRIPT SK(-).

10 Fig. 9 illustrerer plasmidkortet for pRL101.

Fig. 10 illustrerer et restriktionsenzymkort for genom CC49 L-kæde-DNA-indsættelse i pRL101.

15 Fig. 11 illustrerer plasmidkortet for pRL200.

Fig. 12 illustrerer et restriktionsenzymkort for genom CC83 L-kæde DNA-indsættelse i pRL200.

20 Fig. 13 illustrerer nukleotidsekvensen af EcoRI-BamHI-fragmentet, som er isoleret fra plasmidet pNP9.

Fig. 14 illustrerer plasmidkortet for pHH49.

25 Fig. 15 illustrerer plasmidkortet for pHS83.

Fig. 16 viser nukleotidsekvensen af CC49 V_H, idet de understregede segmenter viser de sekvenser, som er udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

30 Fig. 17 viser nukleotidsekvensen af CC83 V_H, idet de understregede segmenter viser sekvenserne, som er udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

35 Fig. 18 viser aminosyresekvensen af CC49 V_H, idet de understregede segmenter viser sekvenserne, som er bestemt ved proteinsekvensbestemmelse.

Fig. 19 viser aminosyresekvensen af CC83 V_H, idet de understregede segmenter viser sekvenserne, som er bestemt ved proteinsekvensbestemmelse.

5 Fig. 20 viser resultaterne af en SDS-polyacrylamidgel med resultaterne af PNGase F-behandling af CC83-antistof.

Fig. 21 illustrerer restriktionsenzymkortet for human gamma 1, gamma 2, gamma 3 og gamma 4.

10

Fig. 22 illustrerer plasmidkortet for pSV2gpt/R/B.

Fig. 23 illustrerer plasmidkortet for pSV2gpt- γ 1-7,8.

15 Fig. 24 illustrerer plasmidkortet for pSV2gpt- γ 1-2,3.

Fig. 25 illustrerer plasmidkortet for pSV2gpt- γ 2.

Fig. 26 illustrerer plasmidkortet for pSV2gpt- γ 3.

20

Fig. 27 illustrerer plasmidkortet for pSV2gpt- γ 4.

Fig. 28 illustrerer plasmidkortet for p49 γ 1-7,8.

25 Fig. 29 illustrerer plasmidkortet for p49 γ 1-2,3.

Fig. 30 illustrerer plasmidkortet for p49- γ 2.

Fig. 31 illustrerer plasmidkortet for p49- γ 3.

30

Fig. 32 illustrerer plasmidkortet for p49- γ 4.

Fig. 33 illustrerer plasmidkortet for p38 γ 1-7,8.

35 Fig. 34 illustrerer plasmidkortet for p83 γ 1-2,3.

Fig. 35 illustrerer plasmidkortet for p83- γ 2.

Fig. 36 illustrerer plasmidkortet for p83-γ3.

Fig. 37 illustrerer plasmidkortet for p83-γ4.

5 Fig. 38 illustrerer den samlede reaktion til dannelse af hybridgener baseret på metoden beskrevet af Horton et al., Gene 77, 61 (1989).

10 Figurerne 39A, 39B og 39C viser biofordelingen og fuldstændig legemsretention af CH44-1.

Fig. 40A og 40B viser biofordelingen og fuldstændig legemsretention af CH84-1.

15 Immunoglobulinet ifølge opfindelsen er blevet udviklet for at løse problemerne med murine monoklone antistoffer, som er beskrevet i den kendte teknik. Det er karakteriseret ved at have en kimer struktur sammensat af en tung kæde variabel region, som kodes af DNA hidrørende fra V_HαTAG.

20

Definitioner

Som anvendt heri refererer "immunoglobulin" til et tetramer eller aggregat deraf, uanset om specifik immunoreaktiv aktivitet er en egenskab. "Antistoffer" refererer til sådanne samlinger, som har signifikant kendt specifik immunoreaktiv aktivitet over for et antigen, og som omfatter lette og tunge kæder med eller uden kovalent binding mellem dem. "Ikke-specifikt immunoglobulin" ("NSI") betyder sådanne immunoglobuliner, som ikke har kendt specificitet over for et antigen.

30

35 Den grundlæggende immunoglobulinstrukturen i hvirveldyrssystemer er relativt godt forstået. [Edelman, G.M., Ann. N.Y. Acad. Sci., 190, 5 (1971)]. Som det ses i fig. 1 er enhederne sammensat af to identiske lette polypeptidkæder med molekylvægt på ca. 23.000 dalton og to identiske tunge kæder med molekylvægt 53.000-70.000. De fire kæder er forbundne ved

hjælp af disulfidbindinger i en "Y"-konfiguration, hvor de lette kæder er sammenstillede med de tunge kæder startende ved Y'ets mund og fortsættende gennem forskellighedsregionen.

5 Tunge kæder er klassificeret som gamma (γ), my (μ), alpha (α), delta (δ) eller epsilon (ϵ), med nogen underklasser blandt dem. Denne kædes natur, idet den har en lang konstant region, fastlægger antistoffets "klasse", som IgA, IgD, IgE, IgG eller IgM.

10

Lette kæder er klassificeret som enten kappa (κ) eller lambda (λ). Hver tung kædeklasse kan bindes med enten en let κ - eller λ -kæde. Generelt er de lette og tunge kæder kovalent bundet til hinanden og "hale"-delene af de to tunge kæder er bundet til hinanden ved hjælp af kovalente disulfidbindinger, når immunoglobulinerne dannes enten af hybridomaer eller af B-celler. Hvis ikke-kovalent forbindelse af kæderne kan gennemføres i den korrekte geometri, vil aggregatet af ikke-disulfid-forbundne kæder imidlertid stadig være i stand til reaktion med antigenet.

20

Aminosyresekvenserne løber fra en N-ende ved de forgrenede grænser af Y'et til C-enden ved bunden af hver kæde. Ved N-enden er der en variabel region og ved C-enden er der en konstant region.

25

Udtrykkene "konstant" og "variabel" anvendes funktionelt. De variable regioner i både lette (V_L)- og tunge (V_H)-kæder afgør bindingsgenkendelse og specificitet over for antigenet. De konstante regionsområder i lette (C_L)- og tunge (C_H)-kæder giver vigtige biologiske egenskaber, såsom antistofkædeforbinding, sekretion, transplacental mobilitet og komplementbinding.

30

35 Den variable region er koblet i hver kæde til den konstante region ved en bindingsdel, som forbinder V-gensekvensen og C-gensekvensen. Denne forbindingsdel forekommer ved det genome

niveau og forbinder nukleotidsekvenser via rekombineringssteder. Forbindingssekvensen er kendt for tiden som en "J"-sekvens i det lette kædegen, som koder for ca. 12 aminosyrer og som en kombination af en "D"-sekvens og en "J"-sekvens i det
5 tunge kædegen, som sammen koder for ca. 25 aminosyrer.

"Kimære antistof" refererer for denne opfindelses formål til et antistof, som i den tunge kæde har en variabel regionamino-
10 syresekvens, som kodes for af en nukleotidsekvens hidrørende fra et murint kimliniegen og en konstant regionamino-
syresekvens, som kodes for af en nukleotidsekvens hidrørende fra et humant gen.

Den foreliggende opfindelse er imidlertid ikke ment snævert at
15 være begrænset til blot at erstatte murine C-gensekvenser, som koder for konstante immunoglobulinregioner med humane C-gense-
kvenser, som koder for konstante immunoglobulinregioner. Den foreliggende opfindelse er således ikke begrænset til, hvor-
vidt sammenslutningspunktet er ved den variable/konstante-
20 grænse.

Ved hjælp af forskellige teknikker er det nu muligt at frem-
stille ændrede kimære antistoffer, kimære kompositantistoffer
og fragmenterede kimære antistoffer, som der kodes for af nu-
25 kleotidsekvenser beskrevet heri.

"Komposit"-immunoglobuliner omfatter variable polypeptidregio-
ner, som ikke tidligere er fundet forbundet med hinanden i
30 naturen. Det er ikke afgørende, hvorvidt nogle af de ovenfor
nævnte er kovalent eller ikke-kovalent aggregeret, så længe at
aggregeringen er i stand til selektivt at reagere med et be-
stemt antigen eller antigenfamilie.

"Ændrede antistoffer" betyder antistoffer, hvor aminosyrese-
35 kvenserne især i den variable region, er blevet varieret. På
grund af betydningen af DNA-rekombineringsteknikker for denne
opfindelse behøver man ikke at være begrænset til aminosyre-

sekvenserne af antistoffer valgt fra naturlige kilder, idet aminosyresekvenser af antistofferne kan omudformes til opnåelse af ønskede egenskaber. De mulige variationer er mange og går fra ændring af blot en eller få aminosyrer til fuldstændig omformning af en variabel og/eller konstant antistofregion.

Ændringer i den variable region vil blive foretaget for at forbedre antigenbindingsegenskaberne. Ændringer i den konstante region vil almindeligvis blive foretaget for at forbedre de cellulære procesegenskaber, såsom komplementfiksering, vekselvirkning med membraner og andre effektorfunktioner. Ændringer kan foretages ved standardrekombineringssteknikker og også ved oligonukleotidrettet mutageneseteknikker [Dalbadie-McFarland, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 6409 (1982)].

"Fragmenter" af immunoglobuliner omfatter segmenter af proteolytisk-kløvede eller rekombinant-fremstillede dele af et antistofmolekyle, som er i stand til selektivt at reagere med et bestemt antigen eller antigenfamilie. Ikke-begrænsende eksempler på sådanne proteolytiske og/eller rekombinerede fragmenter omfatter "Fab", "F(ab')₂" og "Fab'", idet deres proteolytiske kløvningssteder er vist i fig. 1 såvel som "Fv" og "V_H". Med et "Fv"-fragment menes, at dele af let kædes variable regioner og tung kædes variable regioner er koblet sammen generelt ved deres carboxyender. Rekombineringssteknikker til fremstilling af Fv-fragmenter er anført i WO 88/01649, WO 88/06630, WO 88/07085, WO 88/07086 og WO 88/09344. Med et "V_H"-fragment menes, at den variable region har i det mindste en del af en tung kædes variable region, som er i stand til at blive anvendt som en antigenbindingsfunktionalitet. Fremstillingen og brugen af en let kædes variable region (V_L) som en antigenbindingsfunktionalitet er anført i en artikel med titlen "Development of biologically active peptides based on antibody structure" af Williams et al. som findes i Proc. Natl. Sci. (USA) 86, 5537-5541 (1989).

I forbindelse med denne opfindelse er "dyr" ment at omfatte bovine dyr, porcine dyr, gnavere og primater, omfattende men-

nesker, og andre.

"Ekspressionsvektor" er givet en funktionel definition af enhver DNA-sekvens, som er i stand til at udøve ekspression af en bestemt DNA-kode i en passende vært, er indbefattet i dette udtryk. For tiden er sådanne vektorer ofte i form af plasmider og således anvendes "plasmid" og "ekspressionsvektor" ofte i flæng. Opfindelsen er imidlertid ment at omfatte sådanne andre former for ekspressionsvektorer, som tjener ækvivalente funktioner, og som fra tid til anden kan blive kendt inden for området.

Ved "transformation" menes indføringen af DNA i en modtagende værtscelle, som ændrer genotypen og således resulterer i en ændring i den modtagende celle.

"Værtsceller" refererer til celler, som er blevet rekombinant transformeret med vektorer, der er konstruerede under anvendelse af DNA-rekombineringsteknikker. Som defineret heri er antistoffet eller modifikation deraf produceret af en værtscelle i kraft af denne transformation.

Ved beskrivelser af fremgangsmåder til isolering af antistoffer fra rekombinerede værtsorganismer anvendes udtrykkene "celle" og "cellekultur" i flæng for at angive kilden for antistof med mindre det klart er specificeret på anden måde. Med andre ord, udvinding af antistof fra "cellerne" kan betyde enten fra nedroterede hele celler eller fra cellekulturen indeholdende både mediet og de suspenderede celler.

Forkortelser

Nukleinsyrer, aminosyrer, peptider, beskyttelsesgrupper, aktive grupper og lignende dele er, når de er forkortet, forkortet efter IUPACIUB (Commission on Biological Nomenclature) eller ifølge praksis inden for de omhandlede områder. De følgende er eksempler.

Reagenser

EDTA: Ethylendiamintetraeddikesyre

SDS: Natriumdodecylsulfat

5

Nukleinsyrer

RNA: Ribonukleinsyre

DNA: Deoxyribonukleinsyre

10

Nitrogenholdige baserPurinerPyrimidiner

15

A: Adenin

T: Thymin

G: Guanin

C: Cytosin

U: Uracil

20

Både DNA og RNA indeholder lange kæder af phosphorsyre, en sukkerart og nitrogenholdige baser. DNA er en dobbeltstrenget helix, hvor sukkeren er 2-deoxyribose, hvorimod RNA er enkeltstrenget, hvor sukkeren er D-ribose. De fire nitrogenholdige baser, som karakteriserer DNA-nukleotider, er bundne i komplementære par ved hjælp af hydrogenbindinger til dannelsen af dobbeltspiralen af DNA: adenin er bundet til thymin; guanin er bundet til cytosin. I RNA er thymin erstattet med uracil i de nævnte DNA-par.

25

Aminosyrer

30

Gly: glycin

Phe: phenylalanin

Ala: alanin

Tyr: tyrosin

Val: valin

Thr: threonin

Leu: leucin

Cys: cystein

35

Ile: isoleucin

Met: methionin

Ser: serin

Glu: glutaminsyre

Asp: asparaginsyre

Trp: tryptophan

Lys: lysin	Pro: prolin
Arg: arginin	Asn: asparagin
His: histidin	Gln: glutamin

5 Variabel region

10 DNA'et, som koder for den tunge kæde består af en V_H -gensekvens, en D_H -gensekvens og en J_H -gensekvens. DNA'et som koder for den lette kæde består af en V_L -gensekvens og en J_L -gensekvens.

V_H -gensekvens

15 Den foreliggende opfindelse er rettet mod udvalgte kimære antistoffer med V_H -regionen kodet af en DNA-sekvens hidrørende fra et kimliniegen, som er specifikt reaktivt over for TAG72 ($V_H\alpha$ TAG), hvis sekvens er anført i fig. 2. De kimære antistoffer er udvalgt på basis af deres evne til at binde TAG72, dvs. hvor den variable region binder til TAG72 i det mindste 25% mere end den variable region af B72.3 binder til TAG 72.

20 Generelt måles bindingsaffiniteterne af det kimære antistof og B72.3 ved hjælp af den samme teknik. Eksempler på teknikker til måling af antistofbindingsaffinitet er anført i de følgende referencer: Scatchard G., Annals of the N.Y. Acad. of Sciences 51, 660 (1949); Steward, M.W. og Petty, R.E., Immunology 23, 881 (1972); Muraro, R., et al., Cancer Research 48, 4588 (1988); og Heyman, B., J. of Immunol. Methods 68, 193-204 (1984).

30 En fagmand inden for området vil forstå at som et resultat af den foreliggende opfindelse, dvs. nukleotidsekvensen af (og aminosyresekvenserne kodet af) $V_H\alpha$ TAG, er den foreliggende opfindelse ment at omfatte effektive homologe nucleotidsekvenser og tilsvarende aminosyresekvenser. "Effektivt homologe" refererer til identitet eller næsten identitet af nukleotid- eller aminosyresekvenser. Således vil det forstås i denne beskrivelse, at mindre sekvensvariation kan forekomme inden for homo-

35

loge sekvenser, og at hvilke som helst sekvenser, som har i det mindste 80% homologi, er bedømt at være ækvivalente.

5 Homologi udtrykkes ved den brøkdelt eller procentdel af matchende baser (eller aminosyrer) efter at to sekvenser (muligvis ikke med den samme længde) er blevet stillet op overfor hinanden. Udtrykket stillet op over for hinanden anvendes i den betydning, som er defineret af Sankoff og Kruskal i kapitel et i deres bog, *The Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, Addison-Westley, Reading, MA (1983). Groft sagt stilles to 10 sekvenser op over for hinanden ved at maksimere antallet af matchende baser (eller aminosyrer) mellem de to sekvenser med indsættelsen af et minimalt antal af "blind-" eller "nul-" baser i den ene eller den anden af sekvenserne for at opnå den 15 maksimale overlappning.

Som det må forstås inden for området kan forkert matchede nukleotider forekomme ved den tredje eller usikre base i codonet 20 uden at forårsage aminosyresubstitutioner i slutpolypeptidsekvensen. Ligeledes kan mindre nukleotidmodifikationer (f.eks. substitutioner, indsættelser eller deletioner) i visse gensekvensregioner tolereres og anses for usignifikante, når som helst sådanne modifikationer resulterer i ændringer i aminosyresekvens, som ikke ændrer slutproduktets funktionalitet. 25 Det er blevet vist, at kemisk syntetiserede kopier af hele eller dele af gensekvenser kan erstatte de tilsvarende regioner i det naturlige gen uden tab af genfunktion.

30 Homologer af specifikke DNA-sekvenser kan identificeres af fagmanden inden for området under anvendelse af forsøget med krydshybridisering af nukleinsyrer under betingelser med stringens, som det er velkendt inden for området [som beskrevet i *Nucleic Acid Hybridization*, Hames and Higgs (udgivere), IRL Press, Oxford, UK (1985)]. Givet to sekvenser er 35 algoritmer tilgængelige for beregning af deres homologi: f.eks. Needleham og Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453 (1970);

og Sankoff og Kruskal (citeret ovenfor) side 23-29. Ligeledes er kommercielle servicer tilgængelige til udførelse af sådanne sammenligninger, f.eks. Intelligenetics, Inc. (Palo Alto, CA).

5 D_H- og J_H-gensekvenser

10 D_H- og J_H-gensegmenter forekommer i forskellige typer, selvom typen af D- eller J-gensegment, som vælges, ikke er afgørende for opfindelsen. Dvs. D_H og J_H kan hidrøre fra et hvilket som helst dyr. Foretrukne dyr omfatter mus og mennesker. Humane D_H- og/eller J_H-gensegmenter er selvsagt særlig foretrukne, men opfindelsen er ikke således begrænset, hvis et D- eller J-gensegment fra en anden dyreart giver en vigtig egenskab, dvs. forøget binding til TAG72.

15

Eksempler på murine D_H- og J_H-sekvenser er anført i "Organization, Structure, and Assambly of Immunoglobulin Heavy Chain Diversity DNA Segments", Kurosawa og Tonegawa, J. Exp. Med. 155, 201 (1982); og "Sequences of the Joining Region Genes for 20 Immunoglobulin Heavy Chains and Their Role in Generation of Antibody Diversity", Gough og Bernard, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 509 (1981).

25

Eksempler på humane D_H- og J_H-sekvenser er anført i en artikel med overskriften "Human Immunoglobulin D Segments encoded in Tandem Multigenic Families" af Siebenlist et al. i Nature 294, 631 (1981); og eksempler på humane J_H-sekvenser er anført i "Structure of the Human Immunoglobulin μ Locus; Characterization of Embryonic and Rearranged J and D Genes" af Ravetch et al., Cell. 27, 583 (1981).

30

V_L- og J_L-gensekvenser

35 Generelt kan hvilke som helst V_L- og J_L-gensekvenser anvendes, som koder for en del af et V_L, der er komplementært til det V_H, som kodes for af en nukleotidsekvens, der er effektivt homologt med V_HαTAG. Ved "komplementær" menes et V_L, som bin-

der til V_H 'et, og som giver en variabel antistofregion med en bindingsaffinitet på mindst 25% mere end B72.3 som målt ved en hvilken som helst standardteknik til måling af bindingsaffinitetskonstanter.

5

Den type af V_L - og J_L -gensegment, som vælges, er ikke afgørende for opfindelsen. Dvs. V_L og J_L kan hidrøre fra et hvilket som helst dyr. Foretrukne dyr omfatter mus og mennesker. Humane V_L - og/eller J_L -gensegmenter er selvsagt særligt foretrukne, men opfindelsen er ikke begrænset således, hvis et J_L -gensegment fra en anden art giver en vigtig egenskab, dvs. forøget binding til TAG72.

10

Murine J_L -sekvenser er anført i en artikel med overskriften "The nucleotide Sequence of a 5,5-kilobase DNA Segment Containing the Mouse Kappa Immunoglobulin J and C Region Genes" af Max, et al. i J. Biol. Chem. 256, 5116-5120 (1981). Humane J_L -sekvenser er anført i en artikel med overskriften "Evolution of Human Immunoglobulin κ J Region Genes" af Heiter et al. i The Journal of Biological Chemistry 357(2), 1516-1522 (1982).

15

20

Variable regioners oprindelse

Given de ovenfor nævnte oplysninger er det nu muligt at udlede adskillige specifikke udførelsesformer for variable antistofregioner inden for den foreliggende opfindelses omfang, dvs. med effektiv homologe V_H -sekvenser til $V_H\alpha$ TAG og binding til TAG72 på mindst 25% mere end den variable region af B72.3 binder til TAG72, idet bindingsaffiniteterne af antistoffet og B72.3 måles ved hjælp af den samme teknik. Der er flere mulige teknikker anført nedenfor.

30

Naturligt fremstillede variable regioner

35

Som reaktion på et immunogen, TAG72, vil et immuniseret dyr udvikle udvalgte antistofproducerende B-celler. Antistoffernes

variable region, som fremstilles af B-cellerne, vil blive kodet af omlejret tunge og lette kæde-kimlinie-DNA. F.eks. vil den omlejlrede tunge kimliniekæde omfatte V-, D- og J-genseg-
5 menter omfattende ledersekvensen såvel som eventuelle introner, som senere kan fjernes. DNA'et, som koder for let kæde, vil omfatte V- og J-genseg-
10 menter omfattende ledersekvensen såvel som eventuelle introner, som senere kan fjernes.

Forskelligartethed kan være et resultat af somatiske mutationer, som forekommer i en B-celle under produktiv omlejring af $V_H\alpha$ TAG. Disse somatiske mutationer er nukleotidændringer, som
15 muligvis vil eller som muligvis ikke vil resultere i en aminosyreændring, der ændrer aktiviteten over for TAG72 af det produktivt omlejlrede V_H .

15

Screeningsteknikker

Monoklone eller polyklone antistoffer kan screenes til bestemmelse af hvilke af nævnte antistoffer, som selektivt binder
20 til TAG72. Sådan screening kan udføres ved hjælp af en række velkendte fremgangsmåder, såsom fastfaseradioimmunoanalyse, enzymkoblede, immunosorbentanalyser, rosetteanalyser og blokeringsanalyser. De ovenfor beskrevne fremgangsmåder er velkendte inden for området.

25

Nukleotidsekvenserne for variable regioner, som koder for antistoffer, der er fremstillet fra den produktive omlejring af $V_H\alpha$ TAG, er nu blevet opnået. Ud over nukleotidsekvensen for $V_H\alpha$ TAG, viser fig. 2 også nukleotidsekvenserne, som koder for
30 de tunge kæders variable regioner i henholdsvis CC46-, CC49-, CC83- og CC92-antistoffer. Fig. 3 viser aminosyresekvenserne af $V_H\alpha$ TAG V_H , CC46 V_H , CC49 V_H , CC83 V_H og CC92 V_H svarende til nukleotidsekvenserne, som er anført i fig. 2. En sammenligning af nukleotid- og aminosyresekvenserne af $V_H\alpha$ TAG V_H ,
35 CC46 V_H , CC49 V_H , CC83 V_H og CC92 V_H viser et meget påfaldende træk, nemlig at kæderne har ekstraordinær lighed.

Den relative lighed mellem DNA'et, som koder for CC46 V_H-, CC49 V_H-, CC83 V_H- og CC92 V_H-regionerne, især i det 5'-flankerende segment, bekræfter at disse DNA-sekvenser hidrører fra V_HαTAG. Somatiske mutationer, som forekommer under produktiv omlejring af V_H-regiongenet, som skal udtrykkes i en B-celle, giver anledning til nogle nukleotidændringer som muligvis vil eller muligvis ikke vil resultere i en homolog aminosyreændring mellem to produktivt omlejlrede V_HαTAG-producerende hybridomaer.

Nukleotidsekvenserne og tilsvarende aminosyresekvenser af CC49 V_L er vist i figurerne henholdsvis 4a og 4b. Nukleotidsekvenserne og tilsvarende aminosyresekvenser af CC83 V_L er vist i figurerne henholdsvis 5a og 5b. Nukleotidsekvenserne og tilsvarende aminosyrer af CC92 V_L er vist i figurerne henholdsvis 6a og 6b.

Sondeteknikker

Andre antistoffer, som kodes af DNA hidrørende fra V_HαTAG kan udledes ved anvendelse af V_HαTAG som en hybridiseringssonde. Almindeligvis kunne en sonde fremstillet ud fra DNA'et eller RNA'et af V_HαTAG eller omlejlrede gener indeholdende det rekombinerede V_HαTAG anvendes af fagmanden inden for området til at finde homologe gener i ukendte hybridomaer. Sådanne homologe antistoffer vil have en DNA-sekvens, hvis mRNA hybridiserer med sonden af hele eller en del af V_HαTAG-kimliniegenet og dets flankerende regioner. Ved "flankerende regioner" er ment at omfatte sådanne DNA-sekvenser fra 5'-enden af V_HαTAG til 3'-enden af opstrømsgenet og fra 3'-enden af V_HαTAG til 5'-enden af nedstrømsgenet.

Rationelt syntetiserede variable regioner

En anden yderligere metode er den rationelle syntese af ændrede variable regioner af de heri beskrevne antistoffer såvel som antistoffer fundet via sondering. En sådan metode har fle-

re potentielle fordele. En forsker ville således ikke være nødt til at screene immuniserede værtsdyr i et forsøg på først at udvælge sådanne antistoffer, som binder til TAG og dernæst udvælge sådanne antistoffer, som specifikt har V_H -regioner, der kodes af DNA hidrørende fra $V_H\alpha$ TAG.

Mutagenteknikker

V_H - og/eller V_L -gensegmenterne kan "ændres" ved mutagenese. Eksempler på teknikker omfatter addition, deletion eller ikke-konservativ substitution af et begrænset antal af forskellige nukleotider eller den konservative substitution af mange nukleotider med det forbehold, at den rette læseramme bevares.

Substitutioner, deletioner, indsættelser eller en hvilken som helst underkombination kan forenes til opnåelse af en slutkonstruktion. Da der er 64 mulige codonsekvenser, men kun 20 kendte aminosyrer, er den genetiske kode degenereret i den betydning, at forskellige codoner kan give den samme aminosyre. Koden er imidlertid præcis for hver aminosyre således, at der er mindst et codon for hver aminosyre, dvs. hvert codon giver en enkelt aminosyre og ingen anden. Det vil være indlysende, at under translation skal den rette læseramme bevares for at opnå den rette aminosyresekvens i det endeligt fremstillede polypeptid.

Teknikker til additioner på i forvejen fastlagte aminosyresteder med en kendt sekvens er velkendte. Eksempler på teknikker omfatter oligonukleotid-formidlet stedrettet mutagenese og polymerasekædereaktion.

Teknikker til deletioner på i forvejen fastlagte aminosyresteder med en kendt sekvens, er velkendte. Eksempler på teknikker omfatter oligonukleotid-formidlet stedrettet mutagenese og polymerasekædereaktion.

Teknikker til substitutioner på i forvejen fastlagte aminosyresteder med en kendt sekvens er velkendte. Eksempler på tek-

nikker omfatter stedrettet mutagenese og polymerasekædereaktionsteknikken.

5 Oligonukleotidstedrettet mutagenese involverer i det væsentlige hybridisering af et oligonukleotid, som koder for en ønsket mutation med en enkelt streng af DNA indeholdende regionen, som skal muteres, og anvendelse af den enkelte streng som en skabelon for udstrækning af oligonukleotidet til fremstilling af en streng indeholdende mutationen. Denne teknik er i
10 forskellige former beskrevet af Zoller, M.J. og Smith, M., Nuc. Acids Res. 10, 6487-6500 (1982); Norris, K., Norris, F., Christiansen, L. og Fii, N., Nuc. Acids Res. 11, 5103-5112 (1983); Zoller, M.J. og Smith, M., DNA 3, 479-488 (1984); Kramer, W., Schughart, K. og Fritz, W. J., Nuc. Acids Res. 10,
15 6475-6485 (1982).

Polymerasekædereaktion (PCR) involverer i det væsentlige eksponentiel forstærkning af DNA in vitro under anvendelse af sekvensspecificerede oligonukleotider. Oligonukleotiderne kan
20 om ønsket inkorporere sekvensændringer. Polymerasekædereaktionsteknikken er beskrevet i Mullis og Faloona, Meth. Enz. 155, 335-350 (1987). Eksempler på mutagenese under anvendelse af PCR er beskrevet i Higuchi et al., Nucl. Acids Res. 16, 7351-7367 (1988), Ho et al., Gene 77, 51-59 (1989) og "Engineering Hybrid Restriction Genes Without the Use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension", Horton et al., Gene 77, 61 (1989).
25

30 Ændring af antistoffets variable regioner kan være særligt anvendeligt ved terapeutisk brug af monoklone antistoffer. På nuværende tidspunkt, når et kimært antistof omfattende et fuldstændigt muse-variable område indgives til et menneske, genkender menneskelegemets immunsystem det muse-variable område, skønt i mindre omfang end et fuldstændigt murint antistof,
35 som fremmed og frembringer en immunreaktion der overfor. Således er dets effektivitet betragteligt reduceret ved efterfølgende injektioner af museantistoffet eller kimært antistof i

mennesket på grund af indvirkningen af legemets immunsystem over for det fremmede antistof. Ændringer af de murine V_H - og V_L -regioner kan således reducere den humane immunreaktion over for det ændrede antistof.

5

Rekombineringssteknikker

10 Antistofferne kan konstrueres ved rekombineringssteknikker. Med andre ord kunne en fagmand inden for området in vitro fremstille en fuldstændig genkodning for de tunge og lette kæders variable regioner, fordi nukleotidsekvenserne af forskellige V_H - og V_L -kodende regioner nu er tilvejebragt.

15 Det konstruerede gen kan udformes, hvor udvalgte D_H - og J_H -gensegmenter er i funktionel kombination med et udvalgt V_H -gensegment, dvs. $V_H\alpha$ TAG-segmentet eller V_H -gensegmentet af CC49 eller CC83.

20 F.eks. vil det konstruerede DNA, som koder for tung kæde, omfatte D_H - og J_H -gensekvenser, som støder op til 3'-enden af kimlinie- $V_H\alpha$ TAG-gensegmentet, hvorved CDR3 og skelet (FR) 4 af V_H -området færdiggøres. En ledersekvens kan være til stede, men kan efterfølgende fjernes.

25 Afhængig af den anvendte lette kæde kan det også være nødvendigt at tilvejebringe et konstrueret DNA, som koder for let kæde. Et sådant DNA-gen vil omfatte et V_L -gensegment i funktionel kombination, f.eks. stødende op til et J_L -gensegment omfattende ledersekvensen, som efterfølgende kan fjernes. J_L -gensegmentet vil variere afhængig af, hvorvidt den lette kæde er af λ - eller κ -systemet. J-regionsekvensen støder op til enden af V_L -exonet til færdiggørelse af FR 4 af V_L -området. En sådan konstruktion kan udføres ved teknikker, som anvendes til at konstruere V_H -genet.

30
35

Det konstruerede gen kan udformes ved konventionelle rekombineringssteknikker, f.eks. til tilvejebringelse af en genindsæt-

telse i et plasmid, som er i stand til ekspression. Derefter kan plasmiderne udtrykkes i værtsceller. Eksempler på biologiske rekombineringssteknikker er anført nedenfor.

5 Ved tilvejebringelse af et fragment, som koder enten for den lette kædes eller tunge kædes variable region, vil det sædvanligvis være ønskeligt at indbefatte hele eller en del af intronet nedstrøms fra J-regionen, især hvor den variable region hidrører fra værten, hvori det sammensluttede gen skal udtrykkes. Når intronet er bevaret vil det være nødvendigt, at der er funktionelle splejsningsacceptor- og -donorsekvenser ved intronenderne. Intronet mellem J og den konstante region af det sammensluttede gen kan primært være intronsekvensen forbundet med (1) den konstante region, (2) J-området, eller (3) 10 dele af hver. Sidstnævnte kan være et spørgsmål om hensigtsmæssighed, hvor der er et hensigtsmæssigt restriktionssted i intronerne fra de to kilder. Det kan være nødvendigt at tilvejebringe adaptere for at forbinde intronet til den konstante region. I nogle tilfælde kan hele eller en del af intronet 20 modificeres ved deletion, nukleotidsubstitution eller nukleotidsubstitutioner eller indsættelse til fremme af manipuleringslethed, ekspression eller lignende. Fortrinsvis bør en tilstrækkelig mængde af intronet være til stede for at indeholde en fremmer, som er funktionelt aktiv med den naturligt forekommende promotor. 25

Alternativt kan det være hensigtsmæssigt at have det sammensluttede gen fri for intronet mellem J-genet og C-genet. Således vil 3'-enden af J-genet støde op til 5'-enden af C-genet. 30 Man kan anvende en exonuklease og ved anvendelse af forskellige fordøjelsesperioder kan man tilvejebringe forskellige 3'-ender, som derefter kan anvendes til binding til den konstante region og udvælgelse foretages for et funktionelt produkt på en række måder; eller ved splejsning med overlappende 35 forlængelse under anvendelse af polymerasekædereaktionsteknologi, se Horton et al., supra. I dette tilfælde vil der almindeligvis blive anvendt en kunstig promotor, som ikke behøver at være funktionel aktiv sammen med en fremmer.

I en foretrukken udførelsesform kan generne, som koder for V_H- og V_L-regionerne, ændres ved at erstatte i det mindste en del af de komplementaritetsbestemmende regioner (CDR'er) i de lette eller tunge kæders variable områder af antistoffet med analoge dele af CDR'er fra et antistof med en anden specificitet. Et eksempel på en teknik, hvor CDR'er erstattes, er beskrevet i europæisk patentansøgning nr. 0.239.400 og i PCT-ansøgning nr. WO 88/09344. I et ændret antistof ifølge opfindelsen vil kun CDR'erne i antistoffet være fremmede over for et menneskelegeme, og dette skulle minimere bivirkninger, hvis anvendt til behandling af mennesker. Humane og muse-skeletregioner har imidlertid karakteristiske træk, som adskiller humane fra muse-skeletregioner. Således kan et antistof sammensat af muse-CDR'er i et humant skelet godt ikke være mere fremmed over for legemet end et ægte humant antistof.

Nukleotidsekvenserne svarende til V_H-aminosyresekvenserne af V_HαTAG, CC46, CC49, CC83 og CC92 såvel som CC49-, CC83- og CC92-V_L-gensegmenterne tilvejebringes. Det er således tænkt, at CDR'er fra antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse kunne podes på skeletregionerne af et humant antistof.

Generelt kan CDR-regionerne fra et humant V_H- eller V_L-område erstattes af CDR'er fra V_H- eller V_L-regionerne i antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse. Eksempler på humane antistoffer, hvorfra skeletdelene kan anvendes, omfatter human plasmacytoma NEWM, [Jones et al., "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse", Nature 321, 522-525 (1986)], som er offentlig tilgængelig fra Dr. Greg Winter; og forskellige andre humane V_H- og V_L-gener tilgængelige fra Dr. Terrence Rabbits, som begge er forskere fra the Medical Research Council, 20 Park Crescent, London, W1N 4AL.

Fastlæggelsen af hvad der udgør et CDR og hvad der udgør en skeletregion kan foretages på basis af aminosyresekvenserne af et udvalgt Ig som anført i Kabat et al., Sequences of Proteins

of Immunological Interest, fjerde udgave (1987), U.S. Dept. of Health and Human Services, NIH.

5 De fire skeletregioner antager overvejende en β -lagkonformation, og CDR'erne danner løkker, som forbinder og i nogle tilfælde udgør en del af β -lagstrukturen.

10 Endvidere er ikke alle aminosyreresterne i løkkeregionerne opløsningsmiddeltilgængelige og i et tilfælde er aminosyrerester i skeletregionerne involveret i antigenbinding. [Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E.V. og Poljak, R.J., Science 233, 747-753, (1986)].

15 Det er også kendt, at de variable regioner i de to dele af et antigenbindingssted holdes i den korrekte orientering ved ikke-kovalente inter-kæde-reaktioner. Disse kan involvere aminosyrerester inden i CDR'erne.

20 Det er således muligvis ikke nødvendigt for at overføre antigenbindingskapaciteten fra et variabelt område til et andet at erstatte alle CDR'erne med de fuldstændige CDR'er fra den variable donorregion. Det kan være nødvendigt blot at overføre sådanne rester, som er nødvendige for antigenbindingsstedet, og dette kan involvere overførsel af skeletregionrester såvel
25 som CDR-rester.

30 Det er således klart at blot at erstatte et eller flere CDR'er med komplementære CDR'er ikke altid resulterer i et funktionelt ændret antistof. Givet de forklaringer, der er anført i EP patentansøgning nr. 0 239 400, vil det imidlertid være inden for en fagmands område, enten ved udførelse af rutineforsøg eller ved forsøgs- og fejl-test at opnå et funktionelt ændret antistof.

35 Fortrinsvis ændres de variable områder i både de tunge og lette kæder ved i det mindste delvis CDR-erstatning og om nødvendigt ved delvis skeletregionerstatning og sekvensændring.

Selvom CDR'erne kan hidrøre fra et antistof af den samme klasse eller endda underklasse som antistoffet, hvorfra skelet-regionerne hidrører, er det forudset, at CDR'erne vil hidrøre fra et antistof af en anden klasse og fortrinsvis fra et antistof fra en anden art.

Variable kompositregioner

- 10 V-genet, som koder for V_L , er almindeligvis det samme V-gen, som koder for det V_L forenet med det valgte V_H . F.eks. anvendes V-genet, som koder for V_L -regionerne hos CC49 og CC83, hensigtsmæssigt, når der anvendes V-genet, som koder for V_H henholdsvis hos CC49 og CC83.
- 15 Overraskende, fordi V_H -regionerne i antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse kodes af V_H -gener hidrørende fra V_H -TAG, kan kompositantistoffer med fordel dannes. Med andre ord kan V_H -regionen fra et antistof ifølge den foreliggende opfindelse hensigtsmæssigt forenes med V_L -regionen fra et
- 20 andet antistof ifølge den foreliggende opfindelse. Selvom aminosyresekvenserne i CC49- og CC83-tunge kæder overfladisk set er nært beslægtede, ville det forventes, at en ændring af få eller endda en aminosyre drastisk ville påvirke antistoffets bindingsfunktion, dvs. at de opnåede antistoffer generelt
- 25 antages at være et ikke-specifikt immunoglobulin (NSI), dvs. manglende antistofkarakter, (se europæisk patentansøgning nr. 0 125 023).
- 30 Ganske overraskende har det nu vist sig, at et antistof med den krævede V_H ifølge opfindelsen ikke behøver at blive rekombineret kun med en V_L fra det samme naturligt forekommende dyreantistof. F.eks., som også anført i eksemplerne, er det muligt at fremstille et kimært antistof med en tung kæde med en V_H fra CC83 og en let kæde med et V_L fra CC49, hvor det så-
- 35 ledes dannede kompositantistof har en bindingspecificitet 25% større end bindingsaffiniteten af B72.3 til TAG72.

Konstante regionerTung kæde-område (C_H-område)

- 5 C_H-områderne kan være af forskellige humane isotyper, dvs. IgG (f.eks. IgG₁, IgG₂, IgG₃ og IgG₄), IgA, IgD, IgM såvel som de forskellige undertyper af de individuelle grupper.

For en omtale af human $\gamma 1$ kan der henvises til Ellison et al.,
10 "The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C-gamma-1 gene", Nucl. Acid Res 10, 4071-4079 (1982); Takahashi et al., "Structure of human immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family", Cell 29, 671-679 (1982). For en omtale af human gamma 2 ($\gamma 2$) kan der henvises til Krawinkel
15 et al., "Comparison of the hinge-coding segments in human immunoglobulin gamma heavy genes and the linkage of the gamma 2 and gamma 4 subclass genes, EMBO J 1, 403-407 (1982); Ellison et al., "Linkage and sequence homology of two human immunoglobulin gamma heavy chain constant region genes, Proc.
20 Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 1984-1988 (1982); Takahashi et al., infra. For en omtale af human gamma 3 ($\gamma 3$), se Krawinkel et al. infra, og Takahashi et al., infra. For en omtale af human gamma 4 ($\gamma 4$) kan der henvises til Ellison et al., "Nucleotide sequence of a human immunoglobulin C-gamma-4 gene, DNA 1,
25 11-18 (1981), Krawinkel et al. infra, og Takahashi et al., infra.

For en omtale af det humane μ kan der henvises til Rabbitts et al., Human Immunoglobulin Heavy Chain Genes: Evolutionary
30 Comparisons of C μ , C δ og C γ genes and Associated Swisch Sequences", Nucl. Acid Res. 9, 4509-45024.

For en omtale af human α kan der henvises til Flanagan et al., "Mechanisms of Divergence and Convergence of the Human Immunoglobulin alpha 1 and alpha 2 Constant Region Gene Sequences", Cell 36, 681-688 (1984).
35

For en omtale af det humane δ kan der henvises til White et al., "Human Immunoglobulin D: Genomic Sequences of the Delta Heavy Chain", Science 228, 733-737 (1985).

- 5 For en omtale af det humane ϵ kan der henvises til Max et al., "Duplication and Deletion in the Human Immunoglobulin ϵ Genes", Cell 29, 691-699 (1982).

Let kædeområde (C_L -område)

10

C_L -området kan være human kappa (κ) eller human lambda (λ).

- 15 For en omtale af human κ kan der henvises til "Cloned Human and Mouse Kappa Immunoglobulin Constant and J Region Genes Conserve Homology in Functional Segments", Heiter et al., Cell 22, 197-207, November (1980).

- 20 For en omtale af human λ kan der henvises til "Processed Genes: A Dispersed Human Immunoglobulin Gene Bearing Evidence of RNA-Type Processing", Hollis et al., Nature 296, 321-325 (1982).

- 25 C_H - og/eller C_L -gensegmenterne kan "ændres" ved mutagenese. Eksempler på teknikker omfatter addition, deletion eller ikke-konservativ substitution af et begrænset antal af forskellige nukleotider eller den konservative substitution af mange nukleotider forudsat, at der bevares den rette læseramme. Endvidere kan hele områder af proteinet ændres, f.eks. ved erstatning af C_H3 med C_H2 . Denne substitution foretages på DNA-niveau ved indsættelse, deletion eller substitution af hele
- 30 sekvensexoner.

35

Konstruktion af antistoffer

Immuniseringer

5 Den første teknik til fremstilling af antistoffer, hvad enten monoklone eller polyklone, hvilke antistoffer har V_H -regioner, som kodes af DNA hidrørende fra $V_H\alpha$ TAG, er at immunisere et værtsdyr med oprenset TAG72. Eksempler på protokoller for immunisering af et værtsdyr med TAG72 er anført i US patentskrift nr. 4.522.918 og nr. 4.612.282 under anvendelse af et
10 humant brystcarcinomekstrakt som immunogenet og US patentansøgning nr. 7.073.685 (som er tilgængelig for offentligheden) under anvendelse af TAG72, som er oprenset med B72.3, som immunogenet.

15

Derefter screenes monoklone eller polyklone antistoffer, som er fremstillet ud fra immuniseringsprotokollen, til bestemmelse af, hvilke af antistofferne, som selektivt binder til TAG72. En sådan screening kan opnås ved hjælp af en lang række
20 velkendte procedurer, såsom fastfaseradioimmunoanalyse, enzymkoblede immunosorbentanalyser, rosetteanalyser og blokeringsanalyser. De ovenfor nævnte procedurer er velkendte inden for området.

25

Syntese af aminosyresekvenser

Immunoglobuliner ifølge den foreliggende opfindelse kan syntetiseres ud fra de aminosyrer, som de udgøres af. Egnede teknikker er Merrifield-fastfasemetoden, som er beskrevet i J.
30 Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963). Denne fastfasemetode til syntetisering af sekvenser af aminosyrer er også beskrevet på siderne 1-4 i en bog af Stewart og Young, Solid Phase Peptide Synthesis (W. H. Freeman and Co., San Francisco, 1969).

35

Konstruktion af DNADNA, som koder V_H og V_L

- 5 DNA'et, som koder for antistoffets tunge og lette kæder, kan opnås ud fra en række kilder, som er kendt for fagmanden inden for området, f.eks. genomt DNA, cDNA, syntetisk DNA eller en kombination deraf.
- 10 Celler, som koder for den ønskede sekvens, kan isoleres, og genomt DNA fragmenteres ved hjælp af en eller flere restriktionsenzymmer. Det genome DNA kan omfatte eller omfatter muligvis ikke naturligt forekommende introner. De opnåede fragmenter kan derefter klones og screenes under anvendelse af en
- 15 tung kæde-J-regionsonde (J_H -sonde) for tilstedeværelsen af DNA-sekvensen, som koder for polypeptidsekvensen, der har interesse. DNA-fragmenter, som er isoleret ved præparativ agarosegelelektroforese liggeres. Rekombinerede plaquer af bibliotekerne screenes med en muse- J_H -sonde.
- 20 DNA'et kan også opnås ud fra et cDNA-bibliotek. Messenger-RNA, som koder for tung eller let kæde, isoleres fra en passende kilde, enten fuldstændigt udviklede B-celler eller en hybridomakultur under anvendelse af standardteknikker for RNA-isolering og anvendelsen af oligo-dT-cellulosekromatografi til
- 25 segregation af poly-A-mRNA'et. Poly-A-mRNA'et kan yderligere fraktioneres til opnåelse af sekvenser med passende størrelse til kodning for aminosyresekvenserne i den lette eller tunge kæde i det ønskede antistof efter behov.
- 30 Et cDNA-bibliotek fremstilles derefter ud fra blandingen af mRNA under anvendelse af en passende primer, fortrinsvis en nukleinsyresekvens, som er karakteristisk for det ønskede cDNA. En sådan primer kan syntetiseres baseret på antistoffets
- 35 aminosyresekvens. Alternativt kan cDNA fra ikke-fraktioneret poly-A-mRNA fra en cellelinie, som fremstiller det ønskede antistof eller poly-dT, også anvendes. Det opnåede cDNA er

eventuelt størrelsesfraktioneret på polyacrylamidgel og derefter forlænget med f.eks. dC-rester til sammenføjning med pBR322 eller en anden passende kloningsvektor, som er blevet kløvet af et passende restriktionsenzym, såsom PstI, og forlænget med dG-rester. Alternative metoder til dannelse af kloningsvektorer indeholdende cDNA'et under anvendelse af andre haler og andre kloningsvektorrester kan selvsagt også anvendes, men det ovenfor stående er en standard og et foretrukket valg. En passende værtscellestamme, typisk *Escherichia coli* (E. coli), transformeres med de sammenføjning kloningsvektorer og de succesrige transformanter identificeres ved hjælp af f.eks. ampicillin- eller tetracyclinresistens eller andre fænotypekarakteristika, som er iboende i kloningsvektorplasmidet.

15

Succesrige transformanter udtages og overføres til mikrotiter-skåle eller anden bærer til yderligere vækst og bevaring. Nitrocellulosefilteraftryk af disse voksende kulturer sondebehandles derefter med passende nukleotidsekvenser indeholdende baser, som vides at være komplementære med de ønskede sekvenser i cDNA'et. Der kan anvendes flere sondetyper, fortrinsvis syntetiske enkeltstrengede DNA-sekvenser, som er mærket ved kinasebehandling med γ -³²P ATP. Cellerne fikseret til nitrocellulosefilteret lyseres, DNA'et denatureres og fikseres derefter før omsætning med kinasebehandlet sonde. Kloner, som hybridiserer med succes, påvises ved kontakt med en fotoplade, hvorefter plasmider fra de voksende kolonier isoleres og sekvensbestemmes ved hjælp af metoder, som er kendte inden for området, til bekræftelse af, at de ønskede dele af genet er til stede.

30

De ønskede genfragmenter udskæres og halebehandles for at sikre passende læseramme med kontrolsegmenterne, når indsat i passende ekspressionsvektorer. Typisk sættes nukleotider til 5'-enden til indbefatning af et startsignal og et passende anbragt restriktionsendonukleasested.

35

Fordi opfinderne har tilvejebragt nukleotidsekvenserne af V_HATAG, kan DNA'et også syntetisk syntetiseres, f.eks. under anvendelse af et model 380 DNA-synteseapparat fra Applied Biosystems® og konstrueres ved hjælp af standardteknikker.

5

Endelig er et eksempel på en teknik med anvendelse af en kombination af de ovenfor nævnte teknikker ved at splejse med overlappende forlængelse under anvendelse af polymerasekæde-reaktionsteknologi, se Horton et al., supra. Generelt kan en syntetisk syntetiseret primer med en såkaldt "logrende hale" indsættes med en udvalgt sekvens, f.eks. genomt DNA. Derefter forstærkes sekvenserne og splejses sammen.

10

DNA, som koder for C_H og C_L.

15

DNA-fragmentet, som koder for aminosyresekvensen for den humane konstante region, kan opnås ved screening af kromosomalt DNA fra celler, som fremstiller humant immunoglobulin.

20

Vektorer

Det ønskede DNA-fragment kan anbringes i en biologisk funktionel ekspressionsvehikel, som kan indeholde passende kontrolsekvenser, som ikke er til stede i det udvalgte DNA-fragment. Ved "biologisk funktionelt" menes, at ekspressionsvehiklen tilvejebringer replikation og/eller ekspresion i en passende vært, enten ved opretholdelse som et ekstrakromosomalt element eller ved integration i værtsgenomet. Der er et stort antal vektorer tilgængelige, eller de kan let fremstilles og er velkendte for fagmanden inden for området.

25

30

En række plasmider, såsom de, der er beskrevet i europæisk patentansøgning nr. 0036776, nr. 0048970 og 0051873, er blevet beskrevet, som allerede indeholder en promotor i læseramme med genet og forligelig med den foreslåede værtselle.

35

Vektorerne og fremgangsmåderne beskrevet heri er egnede til brug i en lang række mikroorganismer, enten prokaryote eller

eukaryote, som er modtagelige for transformation. Plasmidet vil være i stand til replikation i mikroorganismen, især en bakterie.

5 Generelt indeholder plasmidvektorer indeholdende de passende promotorer, som kan anvendes af den mikrobielle organisme til
ekspression af dens eget protein, også kontrolsekvenser, ribo-
sombindingssteder og transkriptionsafslutningssteder. Generelt
10 anvendes replicon- og kontrolsekvenser, som hidrører fra ar-
ter, der er forligelige med værtscellen i forbindelse med
disse værter.

Mindre eller større SV40-fragmenter kan også anvendes, forud-
sat at der er indbefattet den ca. 250 basepar (bp) sekvens,
15 som strækker sig fra HindIII-stedet mod PvuII-stedet anbragt i
det virale origin for replikation. Endvidere er det også mu-
ligt og ofte hensigtsmæssigt at anvende promotor- eller kon-
trolsekvenser, som normalt forbindes med den ønskede gense-
kvens forudsat, at sådanne kontrolsekvenser er forligelige med
20 værtscellesystemerne.

Endelig skal plasmidet hensigtsmæssigt indeholde et gen, et
markørgen, som er i stand til at give en fenotyp egenskab, der
muliggør udvælgelse af værtsceller indeholdende ekspressions-
25 vektoren. Særlig egnede er et gen, som giver overlevelsesse-
lektion. Overlevelsesselektion kan opnås ved at tilvejebringe
resistens over for et vækstinhiberende stof eller tilvejebrin-
ge en vækstfaktorevne til en bakterie, som mangler en sådan
evne.

30 Generelt foretrækkes prokaryoter. F.eks. er pBR322 et plasmid
hidrørende fra en E. coli-art [Bolivar et al., Gene 2, 95
(1977)] særlig egnet. pBR322 indeholder gener for ampicillin
og tetracyclinresistens og giver således en let metode til
35 identifikation af transformerede celler.

Selvom disse prokaryoter er de mest almindeligt anvendte om-
fatter andre mikrobielle stammer, som kan anvendes, E. coli-

stammer, såsom *E. coli* B, *E. coli* K12-stamme 294 (ATCC nr. 31446) og *E. coli* X1776 (ATCC nr. 31537), *E. coli* W3110 (F^- , γ^- , prototrop, ATCC nr. 27325), bacilli, såsom *Bacillus subtilis*, og andre enterobacteriaceae, såsom *Salmonella typhimurim* eller *Serratia marcescens*, og forskellige *Pseudomonas*-arter kan anvendes. Disse eksempler er ment udelukkende at være illustrative.

Ud over prokaryoter kan eukaryote mikrober også anvendes. *Saccharomyces cerevisiae* eller almindelig bagegær er den mest almindeligt anvendte blandt eukaryote mikroorganismer, selvom en række andre stammer er almindeligt tilgængelige.

For ekspression i *Saccharomyces* anvendes almindeligvis f.eks. plasmidet YRp7 [Stinchcomb, et al., *Nature* 282, 39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7, 141 (1979); Tschemper, et al., *Gene* 10, 157 (1980)]. Dette plasmid indeholder allerede *trp1*-genet, som giver en selektionsmarkør for en mutantstamme af gær, som mangler evnen til at vokse i tryptophan, f.eks. ATCC nr. 44076 eller PEP4-1 [Jones, *Genetics* 85, 12 (1977)]. Tilstedeværelsen af *trp1*-læsionen som et karakteristika ved gærværtscellegenomet giver derefter et effektivt miljø til påvisning af transformation ved vækst ved fravær af tryptophan.

Enhver plasmidvektor indeholdende en gærforligelig promotor, replikationsorigin og afslutningssekvens er egnet til brug i gær. Passende promotorsekvenser i gærvektorer omfatter promotorerne for 3-phosphoglyceratkinase [Hitzeman, et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)] eller andre glycolytiske enzymer [Hess, et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7, 149 (1968); Holland et al., *Biochemistry* 17, 4900 (1978)].

Til brug i pattedyrceller tilvejebringes kontrolfunktionerne på ekspressionsvektorerne ofte ved hjælp af viralt materiale. F.eks. hidrører almindeligt anvendte promotorer fra polyoma, Adenovirus 2, og oftest Simian Virus 40 (SV40). De tidlige og sene promotorer i SV40-virus er særligt egnede, fordi de begge

let opnås ud fra viruset som et fragment, som også indeholder det SV40-virale replikationsorigin [Fiers, et al., Nature 273, 113 (1978)].

- 5 F.eks. indeholder pSV2neo et gen for ampicillinresistens, neomycinresistens, som er under kontrol af en SV40-promotor. Således giver pSV2neo en let metode til identifikation af celler, som er transformeret med gener, for både den variable
- 10 dyre-region og konstante humane region.

Fremstilling af kimært DNA

Generne, som koder for den tunge kæde eller den lette kæde, vil blive konstrueret ved at forbinde 5'-enden af et DNA-fragment, som koder for den konstante region med 3'-enden af et DNA-fragment, som koder for den variable region. DNA-sekvensen, som koder for antistofaminyresekvensen, kan opnås i forbindelse med promotoren og replikationsstedet fra genomt DNA. I den udstrækning, at værtscellerne genkender de transkriptionelle regulatoriske signaler og translationsinitieringssignaler forbundet med de heterologe gener, da kan regionen 5' og 3' af den variable regionkodningssekvens bevares med den variable regionkodningssekvens og anvendes til transkriptional og translational initieringsregulering. Den ikke-kodende region 3' for den konstante region kan bevares for dens transkriptionsafslutningsregulatoriske sekvenser, såsom afslutning og polyadenylering. Ved henvisning til 5' eller 3' for en dobbeltstreng er det ment at angive retningen af transkription, idet 5' er opstrøms fra 3'.

30 Intronsekvensen mellem den variable region for hver respektiv kæde kan forbindes til det tilsvarende humane konstante DNA-fragment på et hvilket som helst hensigtsmæssigt restriktionssted. Ved tilvejebringelse af et fragment, som koder for den variable region, vil det sædvanligvis være ønskeligt at indbefatte en del af intronet nedstrøms fra J-regionen. Når intronet bevares vil det være nødvendigt, at der er funktionelle

35

splejseacceptor- og -donorsekvenser ved intronenderne. Den tilstødende ikke-kodende region 5' for den variable region vil normalt omfatte sådanne sekvenser, som er involveret med initiering af transkription og translation, såsom TATA-kassen, aflukningssekvens og CAAT-sekvens. Sædvanligvis overstiger den 5'-ikke-kodende sekvens ikke ca. 1-2 kilobaser (kb).

En fremmersekvens bør forekomme mellem J-regionen og den konstante region. Den anvendte fremmer kan være fremmeren fra enten (1) dyre-V-regionen eller (2) den humane konstante region.

Ved bevarelse af 3'-regionen, som naturligt støder op til DNA-sekvensen, som koder for den konstante region, kan transkriptionsafslutningssignalerne tilvejebringes for genet. I de tilfælde, hvor transkriptionsafslutningssignalerne ikke er tilstrækkeligt funktionelle i ekspressionsværtscellen, da kan der erstattes med en 3'-region, som er funktionel i værtscellen. Hensigtsmæssigt kan den ikke-kodende 3'-region opnås fra en ikke-kodende tilstødende 3'-region af en konstant region fra ekspressionsværtscellen. Den 3'-ikke-kodende region kan forbindes til den konstante region ved hjælp af en hvilken som helst af de metoder, som tidligere er beskrevet for manipulering og liggering af DNA-fragmenter. Denne region kunne derefter anvendes som en byggeblok ved fremstilling af genet.

Fremstilling af ekspressionsvehikler

Konstruktion af passende ekspressionsvehikler indeholdende de ønskede kodnings- og kontrolsekvenser kan fremstilles på følgende måde. Enderne af vektorerne og DNA-fragmenterne kan derefter genlignes til dannelse af de ønskede ekspressionsvehikler. De anvendte fremgangsmåder er ikke afhængige af DNA-kilden eller den påtænkte vært.

DNA-fragmenter, som koder for den lette kæde og tunge kæde, kan indsættes i en separat ekspressionsvehikel eller i den

5 samme vektor. Fortrinsvis samles de sammensluttede gener, som koder for de lette og tunge kimære kæder i to forskellige ekspressionsvektorer, som kan anvendes til co-transformation af en modtagende celle, enten samtidig eller på hinanden følgende.

10 Metoderne til indsættelse af DNA-fragmenterne indeholdende de kimære gener i ekspressionsvektorer omfatter anvendelse af restriktionsendonukleaser. "Restriktionsendonukleaser" (eller "restriktionsenzym") er hydrolytiske enzymer, som er i stand til katalysering af stedspecifik kløvning af DNA-molekyler. Stedet for restriktionsendonukleasevirkning bestemmes af forekomsten af en specifik nukleotidsekvens. En sådan sekvens betegnes genkendelsesstedet for restriktionsendonukleasen. Mange 15 restriktionsendonukleaser fra en lang række bakteriearter er blevet isoleret og karakteriseret med hensyn til nukleotidsekvensen af deres genkendelsessteder. Nogle restriktionsendonukleaser hydrolyserer phosphodiesterbindingerne på begge strenge på det samme punkt frembringende stumpe ender. Andre 20 katalyserer hydrolyse af bindinger adskilt af få nukleotider fra hinanden frembringende frie enkeltstrengede regioner ved hver ende af det kløvede molekyle. Sådanne enkeltstrengede ender er selv-komplementære, følgelig cohæsive, og kan anvendes til at genforbinde det hydrolyserede DNA. Eksempler på 25 restriktionsenzym omfatter Aat II, Bam HI, Eco RI, Hind III, Nde I, Spe I, Xba I, Sac I, Bgl II, Pst I, Sal I og Pvu II.

30 Endvidere kan ekspressionsvektoren have en polykobler indsat deri, som har en lang række unikke restriktionssteder. Ved fordøjelse af ekspressionsvektoren med de passende restriktionsenzym vil polykobleren kløves således, at i det mindste et DNA-fragment indeholdende genet kan indsættes. Når polykobleren muliggør skelnelige ender, kan DNA-fragmentet indsættes i en enkelt retning. Når enderne er ens vil indsættelse af 35 DNA-fragmentet resultere i plasmider med to forskellige retninger.

5 Kløvningen udføres ved behandling af plasmidet med et restriktionsenzym eller restriktionsenzymer. Generelt anvendes ca. 10 µg plasmid eller DNA-fragmenter med ca. 10 enheder enzym i ca. 100 µl pufferopløsning. Endonukleasefordøjelse vil normalt udføres ved en temperatur i intervallet fra 37° til 65°C ved en pH-værdi på fra 7 til 9. (Passende puffere og substratmængder for bestemte restriktionsenzymer er anført af fremstilleren). Reaktionstiden vil være fra 1 til 18 timer.

10 Det kan være hensigtsmæssigt at forhindre genligering af den kløvede vektor ved forbehandling med alkalisk phosphatase. Specifikke betingelser er anført af fremstilleren.

15 Efter at restriktionsenzymfordøjelsen er fuldstændig, fjernes protein ved ekstraktion med phenol og chloroform. Nukleinsyren udvindes fra den vandige fraktion (indeholdende ca. 0,3 M natriumacetat) ved præcipitation med ca. 2,5 volumer ethanol.

20 Beskrivelser af kløvningsmetoder med restriktionsenzymer kan findes i de følgende artikler: Greene et al., *Methods in Molecular Biology*, bind 9, udgiver Wickner, R. B., Marcel Dekker, Inc., New York, "DNA Replication and Biosynthesis"; Mertz og Davis, *Proc. Nat. Acad. Sci., (USA)*, 69, 3370 (1972).

25 Størrelsesadskillelse af de kløvede fragmenter ved agarosegelelektroforese udføres let for at følge reaktionsforløbet. Når fordøjelsen har foregået til den ønskede grad, kan endonukleasen inaktiveres ved opvarmning over 65°C i ca. 10 minutter eller ved organisk ekstraktion.

30 Det ønskede fragment oprenses derefter fra fordøjelsesmateriale. Passende oprensningsteknikker omfatter gelelektroforese eller saccharosegradientcentrifugering.

35 Plasmidvehiklen og fremmede DNA-fragmenter liggeres derefter med DNA-ligase til gencirkeldannelse. Denne fremgangsmåde refereres til som sammenslutning og DNA-ligering.

Et passende pufferbehandlet medium indeholdende DNA-fragmenterne, DNA-ligase og passende co-faktorer anvendes. Den anvendte temperatur vil være mellem 25°C og 4°C. Når DNA-seg-
5 menterne hydrogenbinder, vil DNA-ligasen være i stand til at indføre en covalent binding mellem de to segmenter. Det anvendte tidsrum til sammenslutningen vil variere med den anvendte temperatur, saltopløsningens natur såvel som naturen af de klæbrige ender eller cohæsive ender. Generelt kan tidsrummet for liggering være 5 til 18 timer. Se Maniatis T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, supra.
10

Værtsceller

Derefter kan ekspressionsvehikelkonstruktionerne anvendes til
15 at transformere en passende værtscelle. Passende værtsceller omfatter celler, som hidrører fra encellede såvel som fler-cellede organismer.

De kimære immunoglobulingener kan udtrykkes i ikke-lymfoide
20 celler, såsom bakterier eller gær.

Forskellige encellede mikroorganismer kan transformeres, såsom bakterier. Dvs. sådanne encellede organismer, som er i stand til at blive dyrket i kultur eller ved fermentering. Da bakterier almindeligvis er de mest hensigtsmæssige organismer at
25 arbejde med, vil bakterier herefter refereres til som eksempler på de andre encellede organismer. Bakterier, som er modtagelige for transformation, omfatter medlemmer af Enterobacteriaceae, såsom stammer af Escherichia coli; Salmonella; Bacillaceae, såsom Bacillus subtilis; Pheumococcus; Streptococcus og Haemophilus influenzae.
30

Når udtrykt i bakterier bliver immunoglobulinets tunge kæder og lette kæder en del af inklusionslegemer. Kæderne må derefter
35 isoleres, oprensnes og derefter samles til funktionelle immunoglobulinmolekyler.

Udover prokaryoter kan eukaryote mikrober, såsom gærkulturer, også anvendes. *Saccharomyces cerevisiae* eller almindelig bagegær er den mest almindelig anvendte blandt eukaryote mikroorganismer, selvom der er en række andre stammer almindeligt tilgængelige. Tilstedeværelsen af trp1-læsionen som en egen-
5 skab hos gærværtscellegenomet, giver et effektivt miljø til påvisning af transformation ved vækst ved fravær af tryptophan.

Udover mikroorganismer kan kulturer af celler hidrørende fra flercellede organismer også anvendes som værter. Principielt er en hvilken som helst sådan cellekultur anvendelig, hvad enten fra hvirveldyr- eller ikke-hvirveldyrkulturer forudsat, at cellelinien er en, som i det mindste oprindeligt fremstil-
10 lede antistoffer. Propargering af hvirveldyrceller i kultur er blevet en rutineprocedure i de senere år [Tissue Culture, Academic Press, Kruse og Patterson, udgivere (1973)]. Eksempler på sådanne egnede værtcellelinier er Sp2/0, VERO- og HeLa-celler, kinesisk hamsteræggestokcellelinier og W138-, BHK-,
15 COS-7- og MDCK-cellelinier.
20

Den foretrukne modtagelsescellelinie er en plasmacytomacelle, såsom B-lymfocytter eller hybridomaceller. Plasmacytomaceller kan syntetisere, samle og udskille immunoglobuliner, som er
25 kodet af transformerede immunoglobulingener. Endvidere har de mekanismen for glycosylering af immunoglobulinet. Sp2/0 er en foretrukken modtagelsescelle, fordi det er en immunoglobulin-ikke-producerende plasmacytomacelle. Cellen producerer kun immunoglobulin, som er kodet af de transformerede immunoglobulingener. Plasmacytomaceller kan dyrkes i kultur eller i mus's peritonæum, hvor udskilt immunoglobulin kan opnås fra ascites-
30 væske.

Transformation af værtsceller

35 Transformation af værtsceller udføres på følgende måde. Ekspressionsvehiklen liniariseres, og DNA'et indsættes i værts-

celler til fremstilling af antistoffet. Eksempler på fremgangsmåder til indsættelse af DNA'et i værtsceller omfatter elektroporation, protoplastfusion, calciumphosphat-præcipitation eller andre konventionelle teknikker, hvor der anvendes dextransulfat og PEG.

Hvis der anvendes celler uden vældige cellevægsbarrierer som værtsceller, kan transformation udføres ved hjælp af calciumphosphatpræcipitationsmetoden som beskrevet af Graham og Vander Eb, *Virology*, 52, 546 (1978).

Hvis der anvendes prokaryote celler eller celler, som indeholder væsentlige cellevægskonstruktioner, er den foretrukne transformationsfremgangsmåde calciumbehandling under anvendelse af calciumchlorid som beskrevet af Cohen, F.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 2110 (1972).

Værtscellerne kan transformeres enten via co-transformation eller målrettet transformation.

Til co-transformation kan generne, som koder for den lette kæde og tunge kæde, anvendes til transformation af separate cellekulturer, enten fra den samme art eller fra forskellige arter, separate plasmider for let og tung kæde kan anvendes til at co-transformere en enkelt cellekultur eller endelig kan et enkelt ekspressionsplasmid indeholdende begge gener og i stand til at udtrykke generne for både let og tung kæde transformeres ind i en enkelt cellekultur.

Ved den målrettede transformationsteknik transformeres værtscellerne med gener, som koder for den lette kæde, og cellerne indeholdende den lette kædemarkør udvælges. Den lette kæde findes under anvendelse af cytopletning eller muligvis ved påvisning af den lette kæde i supernatanten, hvis den er blevet udskilt. Celler, som er udvalgt for at have den lette kæde, transformeres med den tunge kædekonstruktion, og opnåede celler, som endvidere indeholder den tunge kædemarkør, udvælges.

Det er kendt, at nogen udødelige lymfoide cellelinier, såsom plasmacytomacellelinier i deres normale tilstand, udskiller isolerede Ig-lette eller -tunge kæder. Hvis en sådan cellelinie transformeres med vektoren indeholdende den kimære tunge eller lette kæde ifølge den foreliggende opfindelse vil det således ikke være nødvendigt at transformere cellelinien eller en anden cellelinie med den anden Ig-kæde forudsat, at den normalt secernerede kæde er komplementær med det variable område af Ig-kæden, som kodes af vektoren, der indledningsvis blev anvendt til transformation af cellelinien.

Udvælgelse og ekspression af transformerede værtsceller

- Cellerne kan almindeligvis efter transformation af værtscellerne dyrkes i ca. 48 timer for at muliggøre ekspression af markørgener. Cellerne anbringes derefter i et selektivt medium, hvor ikke-transformerede celler dræbes udelukkende efterladende celler, som er transformerede med DNA-konstruktionerne.
- Tunge og lette kæder eller dele deraf kan fremstilles isoleret fra hinanden og antistoffer og fragmenter deraf kan opnås. Sådanne fremstillinger nødvendiggør brugen af teknikker til samling af isolerede kæder.
- Muligheden for ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen at fremstille tunge og lette kæder eller dele deraf isoleret fra hinanden giver muligheden for at opnå unikke samlinger af immunoglobuliner, Fab-regioner og envalente antistoffer. Det er muligt, at rekombinere de tunge og lette kæder in vitro, ødelagt kun ved kløvning af disulfider mellem kæder og at genvinde antistofaktivitet selv uden genoprettelse af disulfider mellem kæder [se Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 50, 753 (1963)9].
- De transformerede celler dyrkes under betingelser, som er passende for fremstillingen af de lette kæder og/eller tunge kæder og undersøges for tung og/eller let kædeproteinsyntese.

Eksempler på analyseteknikker omfatter enzymkoblet immunosorbentanalyse (ELISA), radioimmunoanalyse (RIA) eller fluorescensaktiveret cellesortering (FACS), immunohistokemi og lignende.

5

Monoklone antistoffers bindingsaffinitet over for TAG72 bestemmes ved hjælp af metoder, som er velkendte inden for området (se Heyman, B. et al., J. Immunol. Methods 68, 193-204 (1984) og som beskrevet detaljeret i eksemplerne givet her-

10

efter). Udvalgte positive kulturer underklones for at isolere rene transformerede kolonier. En passende teknik til opnåelse af underkloner er via den begrænsede fortyndingsmetode, som beskrives af McKeara i Monoclonal Antibodies, Plenum Press, N.Y. (1980).

15

Hybridomaer, som fremstiller sådanne kimære antistoffer, kan dyrkes under anvendelse af kendte fremgangsmåder. De transformerede celler kan udskille store mængder af de lette kæder og/eller tunge kæder ved dyrkning in vitro, såsom ved systemer med hule fibre, spinderkultur, statisk kultur eller in vivo, såsom ascitesproduktion.

20

De kimære antistoffer kan fremstilles i store mængder ved injicering af hybridoma ind i det peritoneale hulrum hos pristæn-primede mus og efter et passende tidsrum (ca. 1-2 uger) indsamling af ascitesvæske fra mus, hvilket giver en meget høj titer af homogent monoklont antistof, og isolering af de monoklone antistoffer derfra ved fremgangsmåder, som er velkendte inden for området [se Stramignoni, P. et al., Intl. J. Cancer 31, 543-552 (1983)]. Hybridomaerne dyrkes op in vivo som tumorer i dyr, hvorfra serumet eller ascitesvæske kan give op til ca. 50 mg/ml monoklone antistoffer. Sædvanligvis vil injektion (fortrinsvis interperitoneal) på ca. 10^6 til 10^7 histoforligelige hybridomaceller i mus eller rotter give en tumordannelse efter få uger. Antistofferne kan derefter opsamles

30

35

og bearbejdes ved hjælp af velkendte metoder. Se generelt Immunological Methods, bind I & II, udgivere Lefkovits, I. og Pernis B., (1979 & 1981) Academic Press, New York, N.Y.; og Handbook of Experimental Immunology, udgivere Weir, D., (1978) Blackwell Scientific Publications, St. Louis, MO.)

Antistofferne kan derefter lagres i forskellige pufferopløsninger, såsom phosphatpuffret saltopløsning (PBS), som giver en generel stabil antistofopløsning til yderligere brug.

10

De kimære antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse kan fragmenteres under anvendelse af kendte proteaseenzymer, f.eks. papein og pepsin, til opnåelse af i høj grad immuno-reaktive F(ab')₂-, F(ab')- og Fab-fragmenter. Endvidere kan aktive fragmenter af Ig, som er dannet ved proteolyse (ca. 50.000 molvægt) opspaltes til deres fuldstændigt reducerede tunge kæde- og lette kædekomponenter og ganske effektivt rekonstrueres til opnåelse af et aktivt antistof [Haber, E., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 52, 1099 (1964); Whitney, D.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 53, 524 (1965)]. Reaktiviteten af de opnåede F(ab')₂-, F(ab')- og Fab-fragmenter bestemmes ved fremgangsmåder, som er beskrevet ovenfor, for det fuldstændige monoklone antistofmolekyle.

25

Anvendelse af antistofferne

Antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse såvel som immunoreaktive fragmenter eller rekombinanter deraf giver enestående fordele ved brug til en lang række cancerbehandlinger. Ud over evnen til at binde specifikt til maligne celler og lokalisere tumorer har antistofferne konstante, variable regioner, som ikke i påviselig grad binder til normale celler, såsom fibroblaster, endotelceller eller epitelceller i hovedorganerne.

35

Specifikt er antistofferne, immunoreaktive fragmenter eller rekombinanter deraf egnede til, men ikke begrænset til, de

følgende typer af cancerbehandling: (1) diagnostiske in vivo-analyser konjugeret til en billeddannelsesmarkør til in situ-påvisningen af carcinomlæsioner, som yderligere beskrevet nedenfor; (2) in vivo-terapi under anvendelse af antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse alene eller konjugeret til et terapeutisk middel, såsom et radionuklid, toksin, effektorceller, andre antistoffer eller via en komplementmekanisme, som er beskrevet nedenfor; og (3) radioimmunoledet kirurgi, som beskrevet nedenfor.

10

Endvidere er det nu også muligt med et farmaceutisk middel omfattende antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse i en farmaceutisk acceptabel, ikke-toksisk, steril bærer, såsom fysiologisk saltopløsning, ikke-toksiske puffere og lignende.

15

Injicerbare midler ifølge den foreliggende opfindelse kan være enten i suspension eller opløsningsform. I opløsningsform opløses komplekset (eller når ønsket de separate komponenter) i en farmaceutisk acceptabel bærer. Sådanne bærere omfatter et passende opløsningsmiddel, konserveringsmidler, såsom benzylalkohol, om nødvendigt, og puffere. Egnede opløsningsmidler omfatter f.eks. vand, vandige alkoholer, glycoler og phosphonat- eller carbonatestere. Sådanne vandige opløsninger indeholder ikke mere end 50% af det organiske opløsningsmiddel efter volumen.

25

Injicerbare suspensioner som midler ifølge den foreliggende opfindelse nødvendiggør et flydende suspenderingsmedium som en bærer med eller uden hjælpestoffer. Suspenderingsmediet kan f.eks. være vandig polyvinylpyrrolidon, inerte olier, såsom vegetabiliske olier eller i høj grad raffinerede mineralolier eller vandig carboxymethylcellulose. Passende fysiologisk acceptable hjælpestoffer, om nødvendigt, til at holde komplekset i suspension, kan vælges blandt fortykkelsesmidler, såsom carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidon, gelatine og alginaterne. Mange overfladeaktive midler er også egnede som suspenderingsmidler, f.eks. lecithin, alkylphenol, polyethylen-

30

35

oxidaddukter, naphthalensulfonater, alkylbenzensulfonater og polyoxyethylensorbitanestrene. Mange stoffer, som påvirker hydrofobiciteten, massefylden og overfladespændingen af det flydende suspensionsmedium, kan bidrage til at fremstille injicerbare suspensioner i individuelle tilfælde. F.eks. er siliconeantiskumningsmidler, sorbitol og sukkerarter egnede suspenderingsmidler.

På grund af at cancerceller er heterogene og som en følge deraf vil et enkelt monospecifikt kimært antistof muligvis ikke være i stand til at genkende alle celler, som udtrykker forskellige epitoper af en tumor.

Det kan således være hensigtsmæssigt at indgive flere forskellige kimære antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse. Den sekventielle brug af disse forskellige antistoffer bør i alt væsentligt reducere de anti-idiotype reaktioner hos menneskepatienter, når sammenlignet med gentaget brug af et enkelt antistof. F.eks. kunne CH92, CH88 og CH44 indgives sekventielt til en patient. Da disse antistoffer har forskellige lette kæder og faktisk forskellige CDR3-regioner, skulle anti-idiotype reaktioner være minimeret.

In vivo-diagnostiske analyser

Ved anvendelse af in vivo-diagnostiske analyser for humane tumorer eller metastase deraf konjugeres antistofferne, immunoreaktive fragmenter eller rekombinanter deraf, til en markør, indgives til en patient, og derefter påvises billeddannelsesmarkøren i patienten ved at udsætte patienten for et passende påvisningsmiddel.

Indgivelse og påvisning af antistof-billeddannelsesmarkørkonjugatet såvel som metoder for konjugering af antistoffet til billeddannelsesmarkøren udføres ved fremgangsmåder, som er ganske kendte eller let bestemmes som beskrevet, f.eks. i Goldenberg, D.M. et al., New England J. Med., 298, 1384-1388

(1978); Goldenberg, D.M. et al., J. Amer. Med. Assoc. 280, 630-635 (1983); Goldenberg, D.M. et al., Gastroenterol. 84, 524-532 (1983); Siccardi, A.G. et al., Cancer Res. 46, 4817-4822 (1986); Epenetos, A.A. et al., Cancer 55, 984-987 (1985); Philben, V.J. et al., Cancer 57, 571-576 (1986); Chiou, R. et al., Cancer Inst. 76, 849-855 (1986); Colcher, E. et al., Cancer Res. 43, 736-742 (1983); Colcher, E. et al., Laboratory Research Methods in Biology and Medicine Immunodiagnosics, New York, Alan R. Liss, side 215-258 (1983); Keenan, A.M. et al., J. Nucl. Med. 25, 1197-1203 (1984); Colcher D. et al., Cancer Res. 47, 1185-1189 (1987); Estaban, J.M. et al., Intl. J. Cancer 39, 50-59 (1987); Martin, D.T., et al., Curr. Surg. 41, 193-194 (1984); Martin, E.W. Jr. et al., Hybridoma 5, S97-S108 (1986); Martin, D.T. et al., Am. J. Surg. 150, 672-675 (1985); Meares et al., Anal. Biochem. 142, 68-78 (1984); og Krejcarek et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm. 77, 581-585 (1977).

Dosen vil variere afhængig af patientens alder og vægt. Generelt bør dosen være effektiv til at visualisere eller påvise tumorsteder adskilt fra normalt væv. Fortrinsvis vil en engangsdosis være på mellem 0,1 til 200 mg af et antistof/mærke-konjugat per patient.

Eksempler på billeddannelsesmarkører, som kan konjugeres til antistoffet, er velkendte for fagmanden inden for området og omfatter stoffer, som kan påvises ved diagnostisk billeddannelse under anvendelse af en gammascanner eller en håndholdt gammasonde eller positronemissionstomografi eller lignende, som beskrevet i de ovenfor citerede referencer, og stoffer, som kan påvises ved kernemagnetisk resonansbilleddannelse under anvendelse af et kernemagnetisk resonansspektrometer eller lignende, som beskrevet i de ovenfor citerede referencer.

Egnede eksempler på stoffer, som kan påvises under anvendelse af en gammascanner eller lignende, omfatter f.eks. radioisotoper, såsom ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu ,

^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re og $^{99\text{m}}\text{Tc}$. ^{125}I , ^{123}I , ^{153}Sm og $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foretrækkes på grund af deres lave energi og egnethed til bredt interval-påvisning.

5 Et eksempel på et stof, som kan påvises under anvendelse af et kernemagnetisk resonansspektrofometer eller lignende er gadolinium (Gd).

In vivo-cancerbehandling

10

Ved denne fremgangsmåde kan antistof/terapeutisk middel-konjugatet bringes til carcinomstedet, hvorved carcinomvævet direkte udsættes for det terapeutiske middel.

15 Antistofferne ifølge den foreliggende opfindelse, immunreaktive fragmenter eller rekombinanter deraf, kan indgives i en farmaceutisk effektiv mængde til in vivo-behandling af humane carcinomaer eller metastase deraf. En "farmaceutisk effektiv mængde" af antistoffet, det immunreaktive fragment eller re-

20 kombinanten deraf, konjugeret eller ikke-konjugeret til et terapeutisk middel, betyder, at mængden af nævnte antistoffer i det farmaceutiske middel bør være tilstrækkelig til at give effektiv binding med antigenene, over for hvilke antistofferne har specifik affinitet. Det farmaceutiske middel kan

25 indgives i en enkelt eller flere doser.

Fremgangsmåder til fremstilling og indgivelse af konjugater af antistoffet, immunreaktive fragmenter eller rekombinanter deraf og et terapeutisk middel er velkendte eller kan let bestemmes af fagmanden inden for området. Endvidere vil passende doser afhænge af patientens alder og vægt og det anvendte terapeutiske middel og er velkendte eller kan let bestemmes af fagmanden inden for området. Repræsentative protokoller er beskrevet i de nedenfor citerede referencer.

30

35

Eksempler på konjugater af antistof og terapeutisk middel, som kan anvendes ved terapi, omfatter de følgende: (1) antistoffer

koblet til radionuklider, såsom ^{131}I , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{47}Sc , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{67}Ga , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{153}Sm , ^{123}I og ^{111}In som beskrevet f.eks. i Goldenberg, D.M. et al., Cancer Res. 41, 4354-4360 (1981); Carrasquillo, J.A. et al., Cancer Treat. Rep. 68, 317-328 (1984); Zalcborg, J.R. et al., J. Natl. Cancer Inst. 72, 697-704 (1984); Jones, D.H. et al., Int. J. Cancer 35, 715-720 (1985); Lange, P.H. et al., Surgery 98, 143-150 (1985); Kaltovich, F.A. et al., J. Nucl. Med. 27, 897 (1986), Order, S.E. et al., Int. J. Radiother. Oncol. Biol. Phys. 8, 259-261 (1982), Courtenay-Luck, N. et al., Lancet 1, 1441-1443 (1984) og Ettinger, D.S. et al., Cancer Treat. Rep. 66, 289-297 (1982); (2) antistoffer koblet til lægemidler eller biologiske reaktionmodifikationsmidler, såsom methotrexat, adriamycin og lymfokiner, såsom interferon, som beskrevet f.eks. i Chabner, B. et al., Cancer, Principles and Practice of Oncology, Philadelphia, PA, J.B. Lippincott Co. bind 1, side 290-328 (1985); Oldham, R.K. et al., Cancer, Principles and Practice of Oncology, Philadelphia, PA, J.B. Lippincott Co., bind 2, side 2223-2245 (1985); Deguchi, T. et al., Cancer Res. 46, 3751-3755 (1986); Deguchi, T. et al., Fed. Proc. 44, 1684 (1985); Embleton, M.J. et al., Br. J. Cancer 49, 559-565 (1984) og Pimm, M.V. et al., Cancer Immunol. Immunother. 12, 125-134 (1982); (3) antistoffer koblet til toksiner, som f.eks. beskrevet i Uhr, J.W. et al., Monoclonal Antibodies and Cancer, Academic Press, Inc., side 85-98 (1983), Vitetta, E.S. et al., Biotechnology and Bio. Frontiers, udgiver P.H. Abelson, side 73-85 (1984) og Vitetta, E.S. et al., Sci., 219, 644-650 (1983); (4) heterofunktionelle antistoffer, f.eks. antistoffer koblet eller forenet med et andet antistof således, at komplekset binder både til carcino- met og effektorceller, f.eks. dræberceller, såsom T-celler, som beskrevet f.eks. af Perez, P. et al., J. Exper. Med. 163, 166-178 (1986); og Lau, M.A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 8648-8652 (1985); og (5) native, dvs. ikke-konjuge- rede eller ikke-kompleksbundne antistoffer, som beskrevet af f.eks. Herlyn, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79, 4761-4765 (1982), Schulz, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci.,

(USA) 80, 5407-5411 (1983); Capone, P.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 80, 7328-7332 (1983); Sears, H.F. et al., Cancer Res. 45, 5910-5913 (1985); Nepom. G.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 81, 2864-2867 (1984); Koprowski, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81, 216-219 (1984) og Houghton, A.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) 82, 1242-1246 (1985).

10 Fremgangsmåderne til forening af antistoffet eller antistof-fragmentet til et ønsket terapeutisk middel, som ovenfor beskrevet, er konventionelle og velkendte inden for området. F.eks. de metoder, som er anført i de ovenfor angivne referencer.

15 Radioimmunoledet kirurgi

20 Antistoffer, immunoreaktive fragmenter eller rekombinante deraf er vigtige inden for radioimmunoledt kirurgi (RIGS). Ved RIGS, som er en intraoperativ behandling, lokaliseres tumorer og udskæres. Et antistof, som er mærket med en billeddannelsesmarkør injiceres i patienten og bundet antistof lokaliseres ved hjælp af en håndhældt gammapåvisningssonde (GDP) og udskæres. Et eksempel på GDP er Neoprobe®, kommercielt tilgængelig fra Neoprobe® Corporation, Tampa, FL. Se Martin et al., 25 "Radioimmunoguided surgery: a new approach to the intraoperative detection of tumor using antibody B72.3", Amer. J. Surg. 156, 386-392 (1988); Martin et al. "Radioimmunoguided surgery: intraoperative use of antibody 17-1A in colorectal cancer", Hybridoma 5, S97-S108 (1986).

30 Indgivelse og påvisning af antistof/billeddannelsesmarkør-konjugatet såvel som fremgangsmåder til konjugering af antistof-fet til billeddannelsesmarkøren, opnås ved fremgangsmåder, som er kendte eller let kan bestemmes af fagmanden inden for området, som beskrevet f.eks. ovenfor.

35 Dosen vil variere afhængig af patientens alder og vægt, men generelt er en engangsdosis på 0,1 til 200 mg antistof/markør-

konjugat per patient tilstrækkelig.

5 De følgende ikke-begrænsende eksempler er blot til illustration af konstruktionen og ekspressionen af kimære DNA-sekvenser, som koder for antistofferne ifølge opfindelsen. Alle temperaturer, som ikke er angivet på anden måde, er i Celcius. Alle procentangivelser, som ikke på anden måde er angivet, er efter vægt.

10 Eksempler

Erstatning af konstante muse-regioner

15 CC-antistoffer blev udledt fra mus og er signifikant mindre i stand til at udøve effektorfunktioner, som besiddes af de humane konstante regioner.

20 I de følgende eksempler er udvalgte antistoffer således "menneskeliggjorte" ved genetisk at fjerne de konstante regioner i de tunge og lette kæder og erstatte dem med deres humane ækvalenter.

25 Lette konstante musekædereiongener blev erstattet med det humane kappa-gen (κ -gen), og tunge musekædegener blev erstattet med hver af de fire humane gammaisotyper (γ_1 , γ_2 , γ_3 og γ_4). Hver af disse fire gammaisotyper har enestående biologiske egenskaber. For et generelt overblik se "The Human IgG subclasses", Hamilton, R.G. (1989) Doc. No. CB0051-289, Calbiochem Corporation.

30

Fremstilling af tung og let variabel kædereion

Isolering af let CC49-kæde

35 CC49-hybridomaceller udskiller et antistof med en tung kæde af IgG₁-isotype og en kappa let kæde.

Samlet DNA fra CC49-hybridomaceller, Balb/C-musenyreceller og NSI-plasmacytomaceller blev isoleret ved hjælp af fremgangsmåder, som er anført i Cell; 24, 353-356 (1981).

5 Generelt blev ca. 10-20 µg af det ekstraherede DNA fra hver cellelinie fordøjet til fuldstændighed med 80 enheder Bam HI, Eco RI, Hind III, Spe I, Xba I, Sac I, Bgl II og Pst I i 50-100 mikroliter af en reaktionsblanding indeholdende den passende reaktionspuffer ved 37°C natten over.

10 Dernæst blev det samlede ekstraherede DNA fra hver cellelinie underkastet Southern-hybridiseringsteknik udviklet af E.M. Southern [J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)]. DNA-fragmenterne blev fraktioneret på basis af deres størrelse ved hjælp af elektroforese på en 0,8% agarosegel. De dobbeltstrengede DNA-fragmenter blev modificeret til enkeltstrengede DNA-fragmenter i en alkalisk opløsning, og derefter blev et nitrocellulosefilter anbragt i nær kontakt med gelen til overførsel af de modificerede DNA-segmenter til filteret i nærværelse af en opløsning med høj saltkoncentration.

20 Hybridisering blev udført under anvendelse af en tilfældig primet ³²P-mærket L-kæde som sonden.

25 Nærmere bestemt var sonden et 1,71 kilobasepar (kbp) Hind III-Pst I-fragment indeholdende kodningsexonerne for de murine J_L-regioner (J1-J5) og blev isoleret fra plasmidet pGD1. En nukleotidsekvens af sondefragmentet er anvist i fig. 7. Dette plasmid er beskrevet i "Site Directed Cleavage of Immunoglobulin Gene Segments by Lymphoid Cell Extracts", Agostaro et al., Can. J. Biochem. Cell. Biol. 63, 969-976 (1985). Plasmidet blev tilvejebragt af Nobumichi Hozumi og John Roder, Mt. Sinai Research Institute, Toronto, Ontario, Canada.

35 Til radiomærkning af sonden blev α³²dCTP leveret fra Amersham, Arlington Heights, IL, USA og det tilfældige priming-sæt blev leveret fra Pharmacia Piscataway, NJ, USA.

Signalerne i Southern-overførsler blev visualiseret ved autoradiografi under anvendelse af Kodak X-OMAT® AR-film. Der blev ikke iagttaget noget tydeligvis omlejret bånd. I forhold til standarderne blev der således ikke påvist noget unikt bånd på autoradiogrammet for CC49-DNA'et, som var fordøjet med Hind III. Det kunne imidlertid ikke udelukkes fra Southern-resultaterne, at det omlejrte bånd for L-kæden var maskeret ved et bånd, som vandrede i CC49, Hind III-fordøjet DNA parallelt med båndet, som var et resultat af Hind III-fordøjelse af musenycelle-DNA (repræsenterende kimlinie-DNA'et). Dette viste sig faktisk at være tilfældet.

Fremstilling af plasmid indeholdende muse-V_L-gener

LAMBDA-ZAP®, en lambda-baseret indsættelseskloningsvektor, som er i stand til selv-udskæring, blev leveret fra Stratagene Co., La Jolla, Californien, USA. LAMBDA-ZAP® er beskrevet på siderne 20-21 i Stratagene-kataloget fra 1987. De kohæsive ender (cos-ender) af LAMBDA-ZAP® blev ligeret natten over ved at følge fremstillernes protokol.

20 mikrogram af det ligerede LAMBDA-ZAP® blev fordøjet med 5 mikroliter (15 enheder) Spe I, leveret fra New England Biolabs, Inc. Det samlede fordøjelsesvolumen var 100 mikroliter. Efter 55 minutters fordøjelse blev yderligere 6 enheder Spe I tilsat. Efter 70 minutter blev reaktionen standset ved phenolekstraktion og ethanolpræcipitation, som blev udført efter Stratagene's protokol.

Fordøjelse med Spe I-restriktionsenzym resulterer i produktion af "klæbrige ender" ved begge ender. Disse klæbrige ender blev modificeret med T4-DNA-polymerase til dannelse af halv-indfyldte Spe I-klæbrige ender, f.eks. 5'ACT/3'TCATG. For at opnå den halvindfyldte reaktion blev DNA-pelleten, som var opnået ved ethanolpræcipitationen ovenfor, opløst i 8 mikroliter vand. Hertil blev sat 2 mikroliter 10 millimolært dTTP, 2 mikroliter 10 millimolært dCTP, 2 mikroliter af Stratagene's

10X ligasepuffer, 4 mikroliter genioniseret, destilleret vand og 2 mikroliter af et Klenow-fragment fra Bethesda Research Laboratories (BRL). Reaktionen blev udført ved omgivelsernes temperatur i 30 minutter. Reaktionen blev standset ved inaktivering af DNA-polymerasen ved 65°C i 10 minutter.

160 mikrogram totalt CC49-hybridoma-DNA (indeholdende den lette musekædepromotor og L- og VJ-exonerne) blev fordøjet til fuldstændighed med Hind III. Fragmenter på mellem ca. 1 kb til ca. 20 kb blev udskåret af 0,8% agarosegeler. DNA'et blev oprenset under anvendelse af GENE CLEAN®, som er kommercielt tilgængelig fra BIO 101 (La Jolla, CA, USA).

De totalt CC49-hybridoma-DNA-Hind III-fordøjede fragmenter blev halvfylde svarende til LAMBDA-ZAP®'s Spe I-fragmenter med den undtagelse, at dATP og dGTP blev anvendt. De halvfylde Hind III-fordøjede fragmenter frembragte 5'AGCTT/3'GAA-klæbrige ender, som er forlignelige med det Spe I-halvfylde * LAMBDA-ZAP®-fragment ovenfor.

Efter phenolekstraktion og ethanolpræcipitation ifølge beskrivelserne af Maniatis, blev de totalt CC49-hybridoma-Hind III modificerede og LAMBDA-ZAP® Spe I-modificerede DNA-fragmenter ligeret ved hjælp af T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktionen blev foretaget under anvendelse af en 6,1 mikroliter ligeringsblanding indeholdende følgende: ca. 0,2 mikrogram af det totalt CC49-hybridoma-Hind III-modificerede DNA i en 3 mikroliter opløsning, ca. 1 mikrogram af LAMBDA-ZAP® Spe I-modificeret DNA i en 1 mikroliter opløsning, 0,6 mikroliter af Stratagene's 10X ligasepuffer, 0,5 mikroliter 10 millimolar ATP og 1 mikroliter Stratagene-ligase. Dette blev inkuberet natten over i et vandbad, og temperaturen sænket trinvis fra ca. 18°C til ca. 4°C. Denne ligering fjernede både Hind III- og Spe I-stederne.

Et genomt bibliotek af ligeret blanding blev fremstillet efter Stratagene's protokol. 2 mikroliter af den ovenfor fremstillede ligeringsblanding blev kort beskrevet anvendt i Stratage-

ne's Gigapack Gold-emballeringsystem ifølge retningslinierne fra fremstilleren. Femten 150 mm plader med en densitet på 50.000 plaquer per plade blev screenet ifølge fremstillere
5 nitrocellulosefiltre, leveret af Schleicher-Schuell, Keene, NH, USA. Den <32P>-tilfældigt mærkede sonde hidrørende fra pGD1, som er beskrevet ovenfor, blev anvendt til hybridiseringen. Der blev opnået to positive kloner.

10 Hver klon blev plaqueoprenset, og rekombinerede plasmider (fagemider) af LAMBDA-ZAP® indeholdende den variable CC49-L-kæde-region blev opnået ved anvendelse af Stratagene's auto-
matiske udskæringsprotokol. Vektordelen af det opnåede rekombinerede plasmid benævnes pBLUESCRIPT SK(-) og består af 2964
15 bp som beskrevet i Stratagene's katalog fra 1987. Et plasmidkort for pBLUESCRIPT SK(-) er vist i fig. 8.

DNA'et fra de to positive kloner blev delvis sekvensbestemt og var identiske. En af klonerne, som blev benævnt pRL101, blev
20 anvendt til yderligere undersøgelser.

Restriktionskortlægning af let CC49-kæde

pRL101 var 7,61 kb, og størrelsen af DNA-indsættelsen blev be-
25 stemt ved restriktionsenzymkortlægning til at være 4,65 kb. Et plasmidkort for pRL101 er vist i fig. 9. Et restriktionsenzymkort for genomt CC49-L-kæde-DNA-indsættelse i pRL101 er vist i fig. 10.

30 Isolering af let CC83-kædes variable region

De fremgangsmåder, som blev anvendt til at isolere let CC83-kæde var i alt væsentligt de, som blev anvendt til at isolere
let CC49-kæde med den følgende undtagelse.

35 Et genomt bibliotek indeholdende 7×10^5 plaquer blev screenet under anvendelse som sonden det <32P>-tilfældigt mærkede 1,71

Hind III-Pst I-fragment hidrørende fra pGD1, som ovenfor beskrevet. Der blev opnået en positiv klon. Den positive klon blev betegnet pRL200.

5 Restriktionskortlægning af let CC83-kæde

pRL200 var 7,44 kb, og størrelsen af DNA-indsættelsen blev bestemt ved restriktionsenzymkortlægning til at være 4,48 kb. Et plasmidkort for pRL200 er vist i fig. 11. Et restriktionsenzymkort for den genome CC83-L-kæde-DNA-indsættelse i pRL200 er vist i fig. 12.

Isolering af tung CC49-kædes variable region

15 Fremgangsmåderne, som blev anvendt til at isolere den tunge CC49-kæde, var i alt væsentligt de, som blev anvendt til at isolere let CC49-kæde omfattende screeningen af det samme CC49-Hind III-modificerede DNA.

20 Den til screening af biblioteket anvendte hybridiseringssonde blev dannet ud fra pNP9, som indeholder et 1,98 kbp Eco RI-Bam HI-fragment indeholdende kodningsexonerne for J_H3 og J_H4 af den tunge CC49-immunoglobulinkæde. Sondefragmentets nukleotidsekvens er vist i fig. 13. Plasmidet blev leveret af Dr. Nobumichi Hozumi og Dr. John Roder, Mt. Sinai Research Institute, Toronto, Ontario, Canada.

25 Et genomt bibliotek indeholdende $9,5 \times 10^5$ plaquer blev screenet, hvorfra der blev opnået en positiv klon. Den positive klon blev benævnt pHH49.

Restriktionskortlægning af tung CC49-kæde

35 pHH49 var ca. 7,0 kb, og størrelsen af DNA-indsættelsen blev bestemt ved restriktionsenzymkortlægning til at være ca. 4,0 kb. Et plasmidkort for pHH49 er vist i fig. 14.

Isolering af tung CC83-kæde variabel region

5 Fremgangsmåden, som blev anvendt til at isolere tung CC83-kæde, var i alt væsentligt de, som blev anvendt til at isolere tung CC49-kæde med de følgende undtagelser.

10 Ca. 13 mikrogram af ligeret LAMBDA-ZAP®-vektor-DNA blev fordøjet med 12 enheder Spe I, leveret fra New England Biolabs, Inc., i i alt 100 mikroliter af en passende puffer. LAMBDA-ZAP® blev fordøjet ved 37°C i 1 time. Reaktionsblandingen blev phenolekstraheret og ethanolpræcipiteret som ifølge Strategene's protokol. Det Spe I-fordøjede LAMBDA-ZAP® blev dephosphoryleret ifølge fremgangsmåderne, som er anført i Maniatis bortset fra, at der blev anvendt 40 gange overskud af
15 alkalisk kalvetarmphosphatase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA).

20 DNA fra CC83 blev fordøjet til fulstændighed med Spe I. Fragmenter på mellem ca. 3 kb til ca. 40 kb blev isoleret fra et 0,8% agarosegelstykke ved elektroeluering, som beskrevet af Maniatis og ligeret med den dephosphorylerede Spe I-skårne LAMBDA-ZAP®-vektor.

25 Et genomt bibliotek indeholdende 5×10^5 plaquer blev screenet under anvendelse af sonden dannet ud fra pNP9, hvis sekvens er anført i fig. 13. Der blev opnået en positiv klon. Den positive klon blev benævnt pHS83.

Restriktionskortlægning af tung CC83-kæde

30

pHS83 var 7,95 kb, og størrelsen af DNA-indsættelsen blev bestemt ved restriktionsenzymkortlægning til at være ca. 5 kb. Et plasmidkort for pHS83 er vist i fig. 15.

35

Sekvensbestemmelse af CC46-, CC49-, CC83- og CC92-mRNA

5 Totalt RNA fra ca. 1×10^7 CC49-celler, som var frosset ved -70°C , blev ekstraheret i alt væsentligt som beskrevet af Maniatis med de følgende undtagelser. Fire molær guanidinium-isothiocyanat og 2,5 molær natriumcitrat, pH-værdi 7,0, og en SW40Ti-rotor centrifugeret ved 31.000 o/m blev anvendt.

10 I alt 2,7 mg CC49-RNA blev isoleret. Efter centrifugering blev poly A+ mRNA oprenset ud fra ca. 1,68 mg RNA ved oligo(dT)-cellulosekromatografi under anvendelse af type 3 oligo(dT)-cellulose, leveret fra Collaborative Research, Inc., Bedford, MA, USA. Fremgangsmåden var som beskrevet af Aviv og Leder, Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 69, 1408 (1972). Der blev i alt
15 opnået 50,24 μg poly A+ mRNA fra 1,68 mg mRNA.

I alt 3,82 mg CC83-RNA blev isoleret fra ca. 1×10^7 celler. I alt 54,6 μg poly A+ mRNA blev isoleret fra 1,91 mg totalt RNA.

20 I alt 0,814 mg CC92-RNA blev isoleret fra ca. $2,6 \times 10^8$ celler. I alt 41,88 mikrogram poly A+ RNA blev isoleret fra 0,814 mg totalt RNA.

25 I alt 1,7 mg CC46-RNA blev isoleret ud fra ca. $2,89 \times 10^8$ celler. I alt 68,88 mikrogram poly A+ RNA blev isoleret fra 1,7 mg totalt RNA.

30 Syntetiske oligonukleotidprimere blev syntetiseret under anvendelse af et DNA-synteseapparat fra Applied Biosystems (Applied Biosystems (ABI), Foster City, CA, USA) Model 380 A ved phosphoramadit-baseret kemi som specificeret af ABI. Oligonukleotiderne blev oprenset, som specificeret af fremstilleren, efter elektroforese på en 20% polyacrylamidgel indeholdende 7M urinstof. Oligonukleotidkoncentrationer blev bestemt
35 spektrofotometrisk ved en optisk densitet på 260 nm, hvor 1 OD 260 nm enhed er lig med 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ enkeltstrenget DNA.

De følgende oligonukleotidprimere blev fremstillet til mRNA-sekvensbestemmelse: (1) Der blev anvendt til bestemmelse af den 3'-meste mRNA-sekvens i den lette kædes variable region for de lette CC49-, CC83- og CC92-kæder, K_L(-), en 22-mer:

5

5'-GGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3'

komplementær til kodningssekvensen for 5'-enden af den konstante region for museimmunoglobulinkæder.

10

Endvidere blev der anvendt, til bestemmelse af den resterende sekvens for let CC49-kæde, 49FR1(-), en 17-mer:

5'-GGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3'.

15

Endvidere blev der anvendt til bestemmelse af den resterende sekvens for let CC83-kæde, J4(-), en 24-mer:

5'-CCAACCTTTGTCCCCGAGCCGAACG-3'

20

og også 83L CDR2(-), en 17-mer:

5'-CAGGGACTCCAGTGTGC-3'.

25

Endvidere blev der anvendt til bestemmelse af den resterende sekvens for let CC92-kæde, J5(-):

5'-CGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3'.

30

For tunge CC46-, CC49-, CC83- og CC92- γ 1-kæder, CH1(-), en 24-mer:

5'-ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAGAT-3'

35

komplementær til kodningsekvensen af 5'-enden af den murine γ 1-tunge kædes konstante region. CH1(-) 24-meren anvendes til at bestemme den 3'-meste mRNA-sekvens af tung kædes variable regioner.

Endvidere blev der anvendt til bestemmelse af den resterende sekvens for den tunge CC49-kæde, JH4(-)-20-mer:

5'-GGTGACTGAGGTTCTTGAC-3'.

5

Endvidere blev der anvendt til bestemmelse af den resterende sekvens for den tunge CC83-kæde, JH2(-)-16-mer:

5'-CTGAGGAGACTGTGAG-3'.

10

Endvidere blev der anvendt til bestemmelse af den resterende sekvens for den tunge CC92-kæde og den tunge B72.3-kæde, B72.3/CC92 HC-20-mer:

15

5'-CCTTGAAGTTCTCATTGTAC-3'.

De følgende fremgangsmåder blev udført som anført af Jan Geliebter i BRL FOCUS 9, 1 (1987).

20

Oligonukleotidprimererne blev endemærket på følgende måde: 100 ng oligonukleotid blev forenet i 50 mM Tris HCl (pH-værdi 8), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 1 mM spermidin, 100 µCi (γ-³²P) ATP (Amersham, 5000 Ci/mmol) og 7 enheder T4-polynukleotid-kinase i et volumen på 13 µl. Reaktionen fik lov til at foregå ved 37°C i 30 minutter, derefter blev der opvarmet i 5 minutter ved 65°C for at inaktivere kinasen og derefter blev 7 µl vand tilsat til opnåelse af en koncentration på 5 ng/µl. De mærkede primere blev lagret ved -20°C, indtil der var brug for dem.

30

Separate prøver hver indeholdende ca. 13 mikrogram poly(A)⁺ mRNA af henholdsvis CC49, CC83, CC92 eller CC46 blev gensuspenderet i 10 µl sammenføjningspuffer [10 mM Tris HCl (pH-værdi 8,3), og 250 mM KCl].

35

En 5 ng prøve af ende-mærket oligonukleotidprimer blev sat til hver mRNA-prøve, opvarmet til 80°C i 3 minutter og sammenføjet

i 45 minutter ved 61°C, for $K_L(-)$ - og 65°C for $CH1(-)$ -oligo-nukleotiderne. AMV omvendt transkriptase (Boehringer Mannheim) blev anvendt i en mængde på 6 enheder for hver mRNA-sekvensbestemmelsesreaktion. Resten af sekvensbestemmelsen blev ud-
5 ført som anført i BRL FOCUS 9, 1 (1987).

Indledningsvise sekvensdata viste, at de tunge og lette kæder var omlejret på følgende måde: CC49-kappa-let-kæde anvendte en J5; CC49- $\gamma 1$ -tung-kæde anvendte en J_H4 ; CC83-let-kæde anvendte
10 en J4; CC83-gamma-1 anvendte en J_H2 . CC46-kappa-let-kæde anvendte en J2; CC46-tung-kæde anvendte en J_H3 . CC92-let-kæde anvendte en J5; CC92-gamma-1 anvendte en J_H2 .

Fig. 16 viser nukleotidsekvensen af CC49 V_H , idet de under-
15 stregede segmenter viser sekvenserne udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

Fig. 17 viser nukleotidsekvensen af CC83 V_H , idet de under-
20 stregede segmenter viser sekvenserne udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

Hele nukleotidsekvenserne CC46 V_H og CC92 V_H , som er vist i fig. 2, blev udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.
25

Fig. 4a viser nukleotidsekvensen af CC49 V_L , idet de under-
stregede segmenter viser sekvenserne udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

30 Fig. 5a viser nukleotidsekvensen af CC83 V_L , idet de under-
stregede segmenter viser sekvenserne udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

Hele nukleotidsekvensen af CC92 V_L , som er vist i fig. 6, blev
35 udledt under anvendelse af oligonukleotidprimere på mRNA.

Proteinsekvens

Oprensede murine CC49- og CC83-immunoglobulinmolekyler blev sendt til Dr. George Tarr hos the University of Michigan Protein sequencing-afdeling for NH₂-terminal aminosyresekvensanalyse. Dr. Tarr anvendte Edman-nedbrydningsmetoden, som modificeret af Tarr, G.E., i "Manual Edman Sequencing System", Microcharacterization of Polypeptides: A Practical Manual [John E. Shively, udgiver, Human Press, Inc., Clifton, N.J., side 155-194 (1986)]. Kort beskrevet reducerede og alkylerede Dr. Tarr immunoglobulinmolekylerne. De lette og tunge kæder fra immunoglobulinmolekylerne blev adskilt ved omvendt fase-HPLC.

Fig. 4b viser aminosyresekvensen for CC49 V_L, idet resultaterne fra aminosyresekvensbestemmelsen for de første 24 aminosyrer af fuldt udviklet CC49 V_L er understregne. Fig. 5b viser aminosyresekvensen for CC83 V_L, idet resultaterne for aminosyresekvensbestemmelsen for de første 51 aminosyrer af det fuldt udviklede CC83 V_L er understregne. ASN-20 kunne ikke bestemmes i den lette CC83-kæde på grund af tilstedeværelsen af N-koblede carbohydratrester i denne position, hvilket er vist i PNGaseF-forsøget nedenfor. En sekvens Asn-Ile-Thr svarer til consensussekvensen Asn-X-Thr/Ser for carbohydratvedhæftning til Asn.

Da de tunge kæder fra immunoglobuliner CC49 og CC83 er blokeret ved N-enden og utilgængelig for aminosyresekvensbestemmelse blev det native glycopeptid behandlet med cyanogenbromid (CNBr) til kløvning af methioninresterne. Kløvningen resulterede i fragmenter, som blev oprenset ved omvendt fase-HPLC. N-terminal aminosyresekvensbestemmelse blev udført på CNBr-fragmenterne.

Resultaterne af aminosyrebestemmelsen af et af CC49 V_H CNBr-peptidfragmenterne er vist som understregede rester i fig. 18. Resultaterne fra aminosyrebestemmelsen af et af CC83 V_H CNBr-

peptidfragmenterne er vist som understregede rester i fig. 19. Som med CC49 svarer alle andre peptidsekvenser til CNBr-fragmenter hidrørende fra den konstante region i muse- γ 1.

5 Bestemmelse af N-koblet carbohydrat på CC83-L-kæde

10 Dette forsøg blev udført for at bekræfte, at der er et N-koblet carbohydrat forbundet til den lette CC83-kæde formodentlig ved ASN-20 (se fig. 5b). Enzymet glycopeptidase F (PNGase F), som er isoleret fra kulturfiltratet af *Flavobacterium meningosepticum* [Tarentino, A. L. et al., *Biochemistry* 24, 4665-4671 (1985)] vil kløve højmannose og/eller biantennare komplekse
15 sukkere N-koblet til ASN til dannelse af en fri carbohydratstruktur og en ASP-rest fra ASN, hvortil den var forbundet. Forskel i molekylvægt mellem den glycosylerede og ikke-glycosylerede form for det samme peptid kan bestemmes ved SDS-PAGE.

20 Reaktionen med 12 mikrogram med og uden PNGase F (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) for de oprensede murine antistoffer CC49, CC83 og CC11 F(ab')₂ (en positiv kontrol) blev udført i et vandigt slutreaktionsvolumen på 40 mikroliter. 4 mikroliter 10 x puffer (1M kaliumphosphat, 0,1M dinatrium-EDTA, pH-værdi 7,4) blev sat til hver reaktionsblanding. Til de rør betegnet "med PNGase F" blev 7,5 mikroliter PNGase F
25 også tilsat, og alle rør blev inkuberet ved 37°C i 1 time. Til reaktionsrørene blev sat 40 mikroliter Laemmli 2X prøvefortyndingspuffer indeholdende β -mercaptoethanol. En 10% SDS-polyacrylamidgel blev elektroforeseret, gelen plettet med coomassie Brilliant Blue R-250 og afplettet. Fig. 20 viser resultaterne. Som vist i bane 2 forekommer et nyt bånd (*) i den PNGase F-behandlede CC83-prøve, men ikke i den ikke-behandlede CC83prøve (bane 3). Det nye bånd har en molekylvægt på ca. 2000-3000 mindre end det native lette kædebånd, som repræsenterer fjernelsen af en N-koblet carbohydratdel. Det eneste
35 consensusglycosyleringssted for den lette CC83-kæde er ved ASN 20, så det antages ved følgeslutning heraf, at dette er det faktiske sted for glycosylering, og dette er hvorfor det ikke

viste sig ved N-terminalsekvensanalyse af de lette CC83-kæder, som ASN. Den lette CC49-kæde ændrer ikke mobiliteten, når behandlet med PNGase F (bane 6), men der iagttages et nyt bånd for det tunge kædefragment af CC11 F(ab')₂ (bane 4*), som tjener som en positiv kontrol. mRNA-sekvensdata for tung CC11-kæde viser et consensusglycosyleringssted i V-området (resultater ikke vist). Standarderne (bane 1) er bovint serumalbumin (BSA), molvægt 68.000 og sojabønnetrypsininhibitor (STI), molvægt 21.500.

DNA-sekvens

Plasmid-DNA blev sekvensbestemt direkte under anvendelse af Sequenase DNA-sekvensbestemmelsessættet, leveret af United States Biochemical (USB), Cleveland, OH, USA. USB's protokol blev fulgt til sekvensbestemmelse af dobbeltstrenget DNA. DNA'et af hver variabel region blev sekvensbestemt under anvendelse af J_H- eller J_L-oligo bestemt ud fra mRNA-sekvensinformationen at være specifik for hvert produktivt omlejet henholdsvis tungt kædegen eller let kædegen.

Efter at de indledningsvise sekvenser var bestemt, blev sekvensen forlænget yderligere ved anvendelse af yderligere primere. De yderligere primere blev syntetiseret under anvendelse af information samlet fra de tidligere dannede sekvenser.

Under anvendelse af den ovenfor nævnte teknik blev DNA-sekvenserne af CC49's og CC83's hele tunge kædes variable regionexoner og lette kædes variable regionexoner. DNA-sekvensen blev samlet og analyseret under anvendelse af Hitachi's DNA-sekvensanalyseprogram DNASIS®.

De følgende oligonukleotidprimere blev fremstillet til DNA-sekvensbestemmelse:

(1) For begge lette kæder, C_κ-intron(-):

70

5'-GAAAACCTGTGTCTTACAC 3'.

(2) For CC49 let kæde, CC49 FRI(+):

5 5'-GTACCTGTGGGGACATTG 3',

og JK5(-)-23-mer

5'CGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3'.

10

(3) For CC83 let kæde, CC83 CDR2(-):

5'-CAGGGACTCCAGTGTGC 3',

15

CC83 L-intron (-):

5'GACTTCAAGATACAAATGTTAG-3',

og JK4(-)-20-mer:

20

5'-CCAACCTTGTCCCCGAGCCGAACG.

De fuldstændige nukleotidsekvenser for CC49 V_L og CC83 V_L er vist i henholdsvis figurerne 4a og 5a.

25

For CC49 tung kæde, J_H4 (-)-20-mer:

5'GGTGAAGGAGGTTCTTGAC-3',

30

og J_H4-intron (-):

5'-GCAATGCTCAGAAACTCC.

For CC83 tung kæde, JH2(-)-16-mer:

35

5'CTGAGGAGACTGTGAG-3'

og J_H2-intron(-):

5'-GCAGTAAAATCTATCTAAGCTG.

5 Derefter blev sekvensbestemmelsen af hver tung kæde forlænget med de følgende sekvenser: CC49/83 HC/5'(+)

5'-GCACTGCTCATGATATGCAAATC-3';

10 CC49/83 HC/5'(-)

5'-GATTTGCATATCATGAGCAGTGC-3':

og CC49/83 H-kæde FRI(-)

15

5'-CTCAGCGTCAGACTGCTG-3'.

De fuldstændige nukleotidsekvenser for CC49 V_H og CC83 V_H er vist i fig. 2.

20

Der blev foretaget sammenligninger mellem den karakteriserede mRNA-sekvens og den karakteriserede DNA-sekvens og mellem den karakteriserede aminosyresekvens med aminosyresekvensen forudsagt fra DNA-sekvensen. Baseret på disse sammenligninger blev plasmidklonerne identificeret at indeholde den korrekte DNA-sekvens for kodning af CC49 og CC83 tung og let kædes variable regioner.

25

De forudsagte aminosyresekvenser fra nukleotidsekvenserne af den tunge kædes variable regioner af CC49 og CC83 som vist i fig. 2 viser omfattende sekvenslighed overalt i skeletregionerne og hypervariable regioner 1 og 2. Hypervariable region 3 er ganske forskellig mellem de to på grund af rekombineringen af V_H-regionen med forskellige D- og J_H-sekvenser, idet at CC49 γ 1 tung kæde anvendte en J_H4 og CC83 gamma 1 anvendte en J_H2.

30

35

Den omfattende DNA-sekvenshomologi 5' for kodningsregionerne i CC49 og CC83 tung kædes variable regioner, viser at de to tunge kæders variable regioner hidrører fra de samme kimlinieexoner.

5

Isolering af V_HαTAG, kimlinieforstadiegen for den tunge kæde af CC46, CC49, CC83 og CC92

10

15

20

Fremgangsmåderne, som blev anvendt til at isolere kimlinieforstadiegenet for de tunge kæders variable regioner af CC46, CC49, CC83 og CC92 var i alt væsentligt de samme, som blev anvendt til at isolere CC49 tung kædes variable region bortset fra, at DNA'et, som blev anvendt til at danne LAMBDA-ZAP®-biblioteket, kom fra en irrelevant hybridomacellelinie (dvs. en cellelinie, som fremstiller antistoffer, som ikke væsentligt binder til TAG72). Et genombibliotek indeholdende ca. 900.000 plaquer blev screenet, hvorfra der blev isoleret en positiv klon. Den positive klon blev benævnt pV_HαTAG. pV_HαTAG var ca. 5,2 kb, og størrelsen af DNA-indsættelsen blev bestemt ved restriktionsenzymkortlægning til at være ca. 2,2 kb.

DNA-sekvens af V_HαTAG

25

De følgende oligonukleotidprimere blev anvendt til bestemmelse af DNA-sekvensen af V_HαTAG:

30

B72.3/CC92 HC-20-mer: 5'-CCTTGAACCTTCTCATTGTAC-3';
 CC49/CC83 HC 5'(+): 5'-GCACTGCTCATGATATGCAAATC-3';
 CC49/CC83 HC 5'(-): 5'-GATTTGCATATCATGAGCAGTGC-3';
 V_HαTAG IVS (+): 5'-CTAAAGTGGAGTCAGGGCCTG-3';
 V_HαTAG IVS (-): 5'-CAGGCCCTGACTCCACTTTAG-3';
 V_HαTAG CDR2 (+): 5'-GAATGGATTGGATATATTTCTC-3'.

35

Den fuldstændige nukleotidsekvens af V_HgαTAG er vist i fig. 2.

Isolering af humane tunge konstante gener

Plasmidkonstruktioner indeholdende de forskellige humane tunge
kæders konstante regioner (py1, py2, py3 og py4) blev leveret
5 af Dr. Ilan R. Kirsch fra the National Cancer Institute,
Bethesda, Maryland.

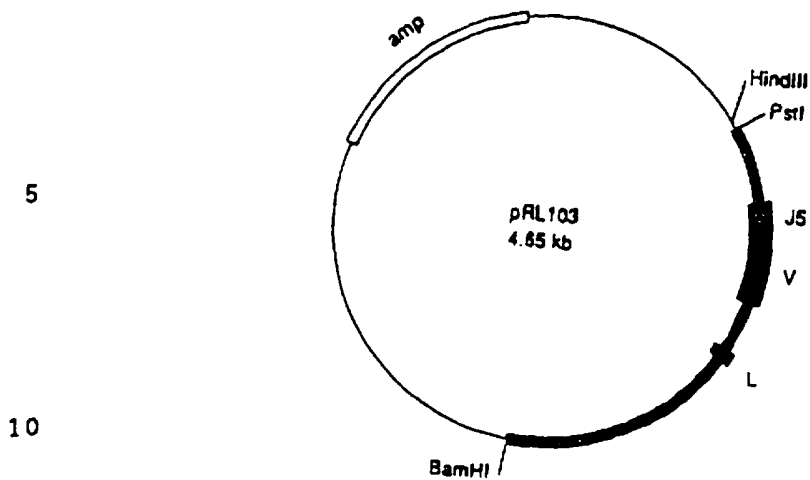
Restriktionsenzymkortlægning blev udført på disse gener til
bekræftelse af deres identitet. Restriktionskort for de humane
10 konstante regioner er vist i fig. 21.

Kimær let kædeMurin CC49 V-region

15 Hind III-stedet i det genome lette CC49-kæde-DNA lokaliseret i
den murine intronregion mellem J5 og C_K (se Max, Edward E. et
al., J. Biol. Chem. 256, 5116 (1981)) blev mistet ved klon-
ningsproceduren, hvor halv-indfyldte Hind III-steder blev
20 ligeret til halv-indfyldte Spe I-steder i LAMBDA-ZAP-vektoren.
Plasmidet pRL101 (fig. 9) bærer denne modifikation.

Intron-Hind III-stedet blev regenereret som beskrevet i trin-
nene nedenfor for at muliggøre, at et humant kimlinie-Hind
25 III-Bam HI-kappa-let-kæde-DNA-fragment (se Hieter, P. et al.,
J. Biol. Chem. 257, 1516 (1982)) kunne ligeres til den murine
variable region direkte. Alle trin blev udført under anvendel-
se af standardmolekylbiologiteknikker, som er familiære for
fagmanden inden for området, og kan findes i manualer, såsom
30 Maniatis.

Et 1,69 kb Bam HI-Pst I-fragment isoleres fra pRL101, som be-
skrevet supra. Et 2,96 kb Bam HI-Pst I-fragment isoleres fra
pBluescript SK(-) (leveret fra Stratagene), beskrevet supra.
35 De to fragmenter ligeres derefter, og pRL103 nedenfor isole-
res.



15 Plasmid pGD1 (beskrevet supra) blev fordøjet med PstI- og HindIII-restriktionsenzymmer til opnåelse af det nødvendige 1,03 kb intro-holdige fragment, og pRL103 blev også fordøjet med PstI- og HindIII-restriktionsenzymmer til fjernelse af det lille DNA-fragment i polykobleren.

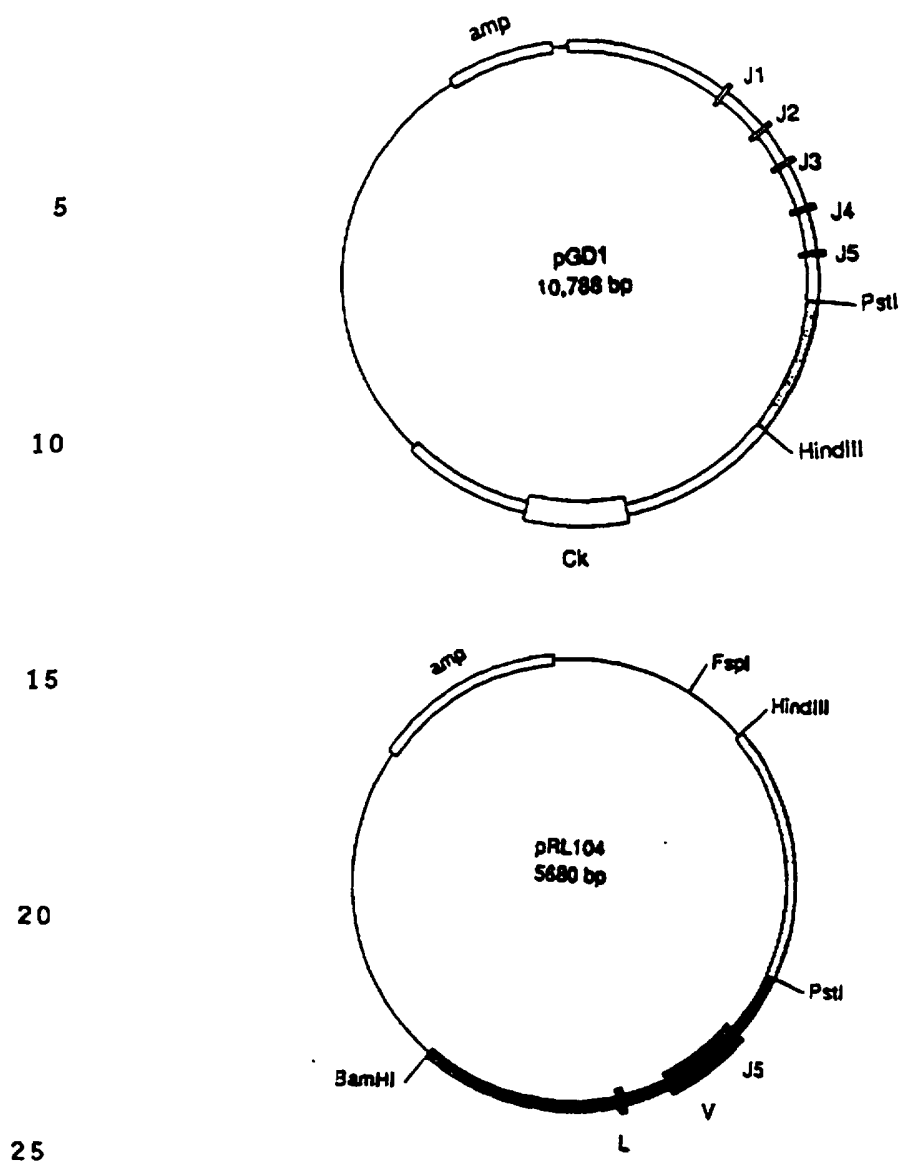
20 De opnåede fragmenter blev ligeret med T4-DNA-ligase til frembringelse af et 5,68 kb plasmid benævnt pRL104. Et delvis restriktionskort for pGD1 og pRL104 er vist nedenfor.

25

30

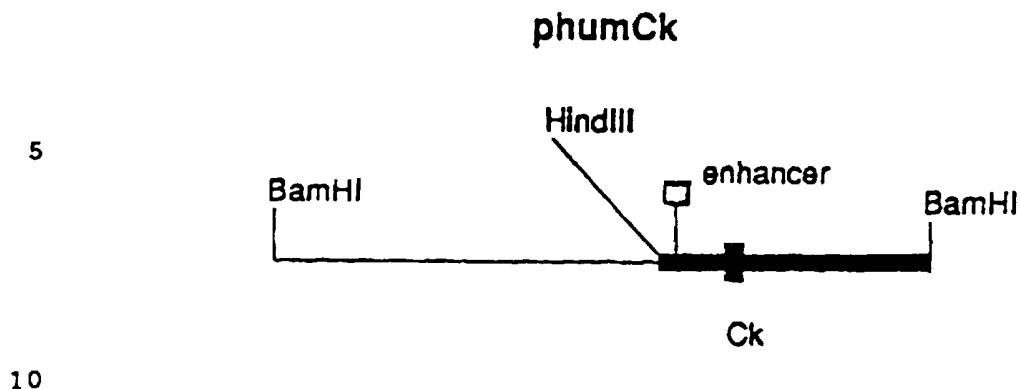
35

75



Human C κ -region

Plasmid phum C κ blev leveret fra Dr. John Roder, Mt Sinai Research Institute, Toronto, Ontario, Canada. Plasmidet hidrører fra pBR322 med et 12 kb Bam HI-fragment indeholdende det humane C κ -exon indsat deri. pBR322 er beskrevet på side 171 i Stratagene-kataloget fra 1987. 12 kb Bam HI-fragmentrestriktionskortet er vist nedenfor [fra Heiter, P. et al., J. Biol. Chem 257, 1516 (1982)].



Plasmidet phum C κ blev fordøjet med Hind III- og Bam HI-restraktionsenzzymer til opnåelse af et 5,0 kb fragment indeholdende det humane C κ -exon. pRL104 blev fordøjet med Fsp I- og Hind III-restraktionsenzzymer til opnåelse af et 4,2 kb fragment indeholdende de muse-let kædes variable exoner af CC49.

De to opnåede fragmenter blev forbundet med T4-DNA-ligase til frembringelse af et 9,2 kb fragment blandt blandingen af opnåede fragmenter. Denne blanding blev fordøjet med Bam HI til opnåelse af en 7,7 kb Bam HI CC49 L-kæde kimær konstruktion med Bam HI-klæbrige ender, som indeholder både de variable muse-regionexoner og det humane konstante region (kappa) exon. Disse konstruktioner udnytter de humane fremmersekvenser og de murine promotorsekvenser.

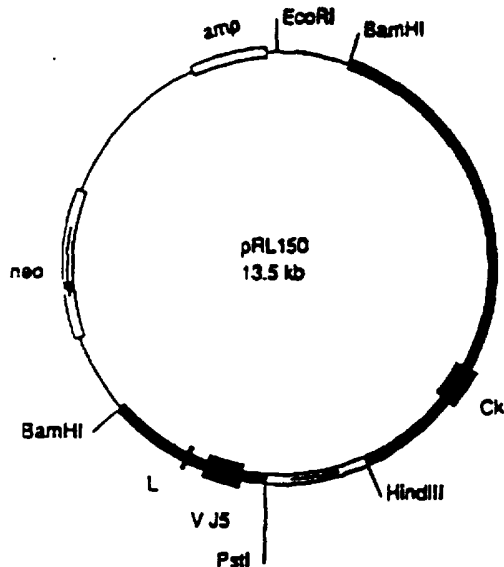
Det kimære Bam HI-fragment indeholdende både de murine let kædes variable regionexoner (L og VJ) og det humane konstante region kappa (κ) exon blev ligeret ind i Bam HI-stedet plasmidet pSV2neo (5,6 kb), et pBR322-afledt plasmid indeholdende det selekterbare markørgen neo (leveret fra ATCC). Tilstedeværelsen af det aktive neogen gør en celle modstandsdygtig over for vækstinhibering med Geneticin, et neomycinlignende lægemiddel også kaldet G418.

35

Det kimære Bam HI-fragment blev indsat i pSV2neo i begge retninger, som vist nedenfor. Begge transkriptionelle retninger

af det kimære lette kædegen i forhold til neogenet blev konstrueret. Plasmid pSV2neo blev lineariseret ved Bam HI-stedet, dephosphoryleret (ifølge fremgangsmåderne anført i Maniatis) under anvendelse af alkalisk kalvetarmphosphatase (til mod-
 5 virkning af selv-ligering) og ligeret med kimære CC49 L-kæde Bam HI-fragmenter fra ovenfor.

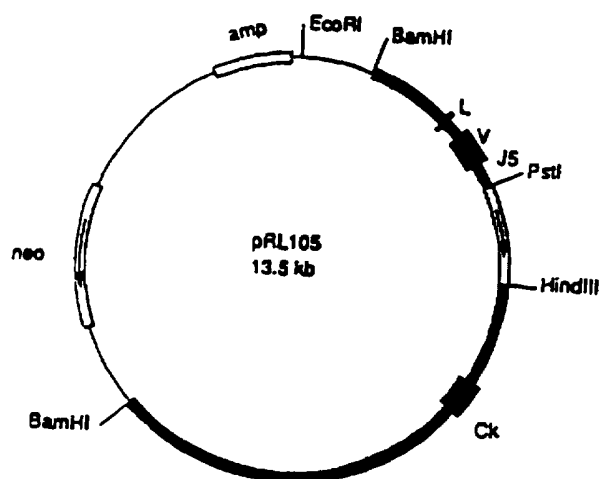
10



15

20

25



30

35

De transkriptionelle retninger af neogenet og den CC49-kimære lette kæde er vist ved pile i pRL150 og pRL105. Delene hidrørende fra pSV2neo er vist. Disse plasmider blev oprenset i stor målestok fra præparativ skala fermentering (1,0L) af E. coli-kloner replikerende hver af plasmiderne. De oprensede

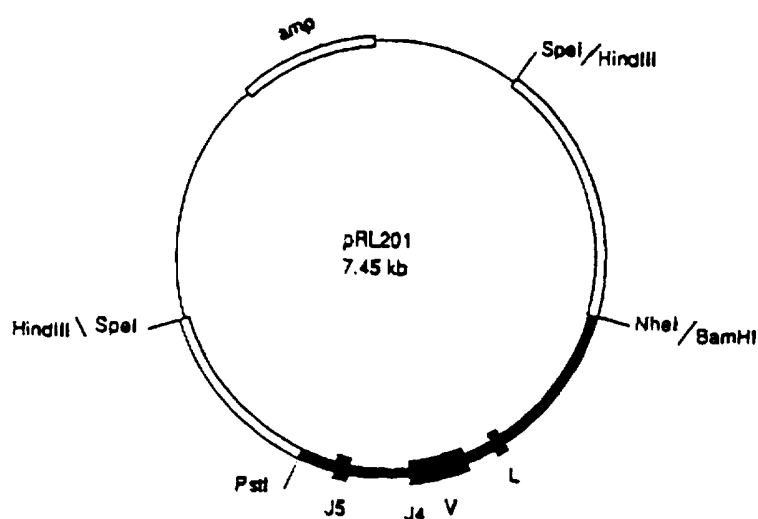
plasmider blev anvendt til at indføre den kimære CC49-lette kæde i SP2/0 plasmacytomaceller som nedenfor beskrevet.

Murin CC83 V_L-region og human C_K-region

5

Hind III-stedet i pRL200, som var mistet ved kloningsprocessen af CC83-let kæde blev regenereret af den samme grund som for den kimære lette CC49-kædekonstruktion. Regenereringen blev opnået på følgende måde. Plasmidet pRL200 blev lineariseret ved et unikt Nhe I-sted, og begge dets klæbrige ender blev omdannet til stumpede ender ved indfyldning med dNTP'er og DNA-polymerase I. En Bam HI-phosphoryleret kobler (leveret fra New England Biolabs) blev ligeret til det indfyldte sted. Det nye plasmid benævnes pRL201 og er vist nedenfor.

15

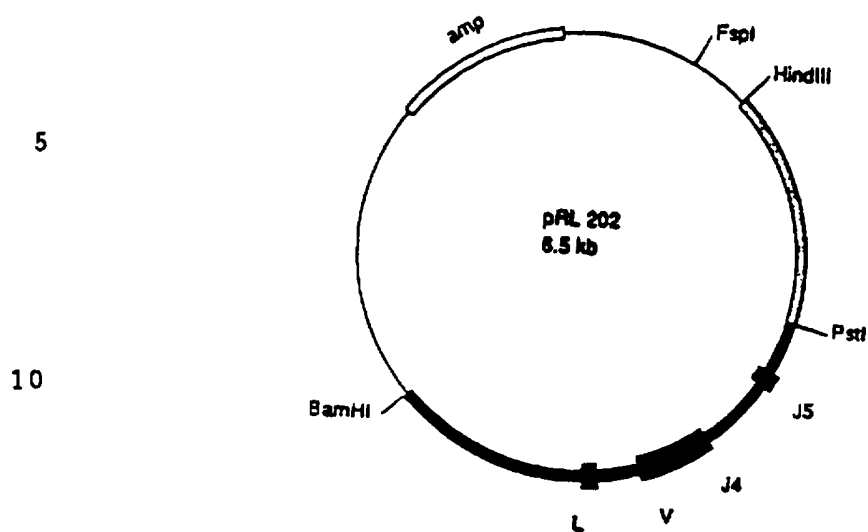


20

25

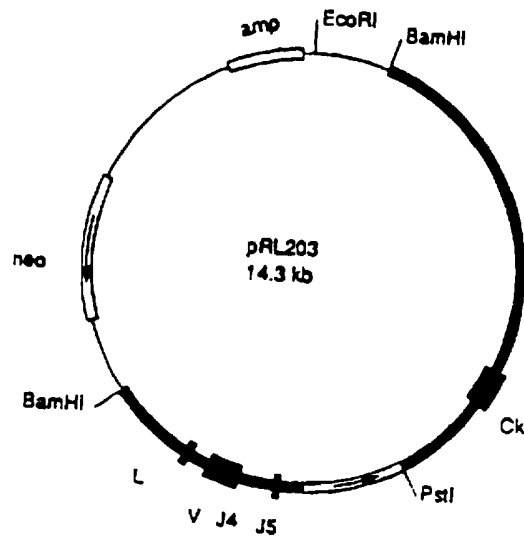
2,5 kb Bam HI-Pst I-fragmentet fra pRL201 indeholdende den lette CC83-kædes variable genome region-DNA blev hensigtsmæssigt ligeret til 4 kb Bam HI-Pst I-vektorfragmentet fra pRL104, som var beskrevet tidligere ved de lette CC49-kædekonstruktioner, og som allerede havde det Hind III-bærende intronfragment. Det nye plasmid benævnes pRL202 og er vist nedenfor.

35



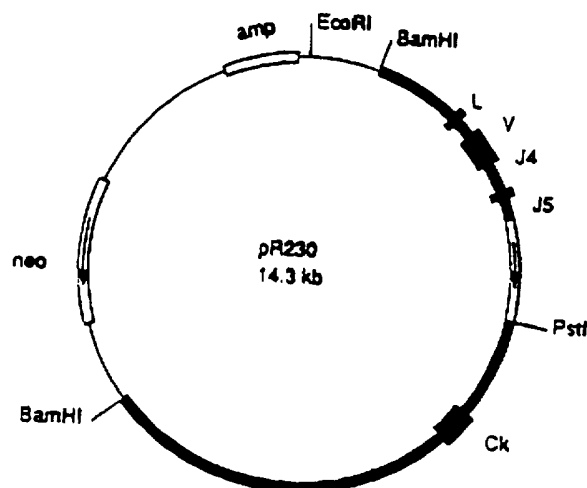
Det ca. 5,05 kb Fsp I-Hind III-fragment fra pRL202 blev isoleret og ligeret med det humane C κ -holdige 5,0 kb Hind III-BamHI-fragment allerede beskrevet for den kimære lette CC49-kædekonstruktion. Dannelsen af den lette CC83-kædevektor blev udført fra dette punkt på en måde identisk med den, som blev udført for den lette CC49-kæde. Den opnåede 8,5 kb Bam HI kimære CC83 lette kædekonstruktion blev også ligeret til pSV2-neoBam HI (phosphataseret) og plasmider med begge mulige retninger af indsættelsen blev opnået som vist i diagramform nedenfor.

5



10

15



20

25

De transkriptionelle retninger af neo-genet og den kimære lette CC83-kæde er vist ved pile i pRL203 og pRL230. Disse plasmider blev oprenset i stor målestok ud fra præparativ skala fermentering (1,0 l) i en kommerciel inkubator af *E. coli*-kloner replikerende hver af plasmiderne. De oprensede plasmider blev anvendt til at indføre den kimære lette CC83-kæde i Sp2/0 plasmacytomaceller, som beskrevet senere.

30

35

Alle fire af de kimære lette kædeplasmidkonstruktioner (pRL105, pRL150, pRL203 og pRL230) kan lineariseres ved fordøjelse med restriktionsenzymet Aat II. Aat II-stedet i plas-

miderne er i en region, som ikke er væsentlig for ekspres-
sionen af det kimære lette kædegen eller det selekterbare
markørgen, neo.

5 Kimære tunge kæder

Humane konstante gamma-genexoner

10 Plasmidvektoren, som blev anvendt til at bære de kimære tunge
kædekonstruktioner betegnes pSV2gpt anført i Mulligan og Berg,
"Selection of animal cells that express the E. coli gene
coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase", Proc.
Natl. Acad. Sci. (USA) 78(4), 2072-2076 (1982). pSV2gpt er et
15 pBR322-afledt plasmid indeholdende det selekterbare markørgen,
guaninphosphoribosyltransferase (gpt), som kan anvendes til
selektiv vækst i medier indeholdende mycophenolsyre. Til frem-
stilling af pSVgpt som en modtager for de humane Cy1-, Cy2-,
Cy3-, Cy4-exoner, blev det fordøjet med Eco RI og Bam HI. Det
fordøjede DNA blev fraktioneret på en 4% polyacrylamidgel og
20 4,5 kb vektorfragmentet blev udvundet fra gelen ved elektro-
eluering, som beskrevet i Maniatis. Dette liniariserede plas-
mid blev betegnet pSV2gpt/R/B, et plasmidkort er vist i fig.
22. Det er i stand til at acceptere Eco RI-Bam HI-afsluttede
fragmenter.

25

5' Hind III-stederne, som er til stede på de humane konstante
IgG1-regionfragmenter, blev omdannet til Eco RI-steder til
direkte kloning ind i Eco RI-stedet i pSV2-gpt. Til γ_1 , γ_2 , γ_3
og γ_4 blev Eco RI-stedet i vektor pBR322 anvendt.

30

Cy1

35 Fragmentet indeholdende Cy1-exoner blev opnået ved fordøjelse
og liniarisering af p γ_1 med Hind III efterfulgt af indfyldning
af de Hind III-klæbrige ender under anvendelse af alle fire
dNTP'er og Klenow-fragmentet af DNA-polymerase for at gøre
Hind III-enderne stumpede. En Eco RI-kobler blev ligeret til

de stumpede ender til erstatning af Hind III-stedet med et Eco RI-sted. Denne konstruktion blev derefter fordøjet med Eco RI og Bam HI til frigørelse af et 7,8 kb fragment indeholdende Cy1-exonerne. Dette fragment blev benævnt Cy1-7,8 kb.

5

Fragmentet blev hver ligeret ind i Eco RI-Bam HI-stederne i pSV2-gpt/R/B. Denne vektorudformning (pSV2-gpt- γ 1-7,2) muliggør, at der indsættes et hvilket som helst murint tung kædevariabelt regionen (med Eco RI-ender) i Eco RI-stedet i de humane tunge IgG-kædevektorer. Nærmere bestemt blev 125 ng af det humane Cy1-7,8 kb fragment ligeret til 100 ng af den linjariserede pSV2gpt/R/B-vektor i et volumen på 10 μ l under anvendelse af 400 enheder T4-DNA-ligase (leveret fra New England Biolabs). Frosne kompetente *E. coli* DH1-celler fra Invitrogen (San Diego, CA) blev transformeret med en ligeringsreaktions ifølge Invitrogen's protokol. Det opnåede plasmid blev betegnet pSV2gpty1-7,8. Et plasmidkort for pSV2gpty1-7,8 er vist i fig. 23.

Endvidere blev et andet kortere fragment indeholdende Cy1-exonerne dannet. Bekymringerne angående den samlede størrelse af den kimære tunge kædevektor med et 7,8 kb Cy1-fragment, en 4,8 kb pSV2-gpt/R/B-vektor og en variabel CC49-region på 1,9 kb (i alt = 14,2 kb) fremkaldte behovet for at reducere den store størrelse af 7,8 kb Cy1-Eco RI-Bam HI-fragmentet. Kodningsregionen på 7,8 kb Cy1 optager kun den første tredjedel af 5'-enden af fragmentet.

Størrelsesreduktion blev udført ved omdannelse af et nedstrøms Pvu II-sted til et Bam HI-sted ved stumpendat addition af en Bam HI-kobler. Hind III-stedet i γ 1 blev omdannet til et Eco RI-sted ved fordøjelse af γ 1 med Hind III, indfyldning af 3'-enden til dannelse af en stumpet ende og addition af Eco RI-koblere, som ovenfor. Pvu II-stedet 2,3 kb nedstrøms blev omdannet til et Bam HI-sted ved efterfølgende fordøjelse med Pvu II og ligation af Bam HI-koblere direkte til de stumpede Pvu II-ender. Denne konstruktion blev derefter fordøjet med Eco RI

og Bam HI til frigørelse af et 2,3 kb fragment indeholdende Cy1-exonerne. Det afkortede Eco RI-Bam HI-fragment (2,3 kb) indeholder stadig γ 1-exonerne og 3'-polyadenyleringssekvensen. Dette reducerer den samlede vektorstørrelse med 5,5 kb, hvilket gør den samlede konstruktion mere håndterlig (i alt = 8,7 kb).

Ca. 200 ng af det humane Cy1 2,3 kb fragment blev ligeret til 100 ng af den lineariserede plasmid-pSV2gpt/R/B-vektor i et volumen på 10 μ l under anvendelse af 400 enheder T4-DNA-ligase (New England Biolabs). Frosne kompetente E. coli-celler, leveret fra Invitrogen, blev transformeret med ligeringsreaktionen ifølge Invitrogens protokol. Det opnåede plasmid blev betegnet pSV2gpty1-2,3. Et plasmidkort for pSVgpty1-2,3 er vist i fig. 24.

DNA-fragmenter indeholdende de andre tre humane konstante IgG-regionexoner blev også isoleret. Cy2-exonerne blev udvundet fra plasmidet py2 som et 4,0 kb Eco RI-Bam HI-fragment. Cy3-exonerne blev udvundet fra plasmidet py3 som et 8,0 kb Eco RI-Bam HI-fragment. Cy4-exonerne blev udvundet fra plasmidet py4 som et 7,6 kb Eco RI-Bam HI-fragment. Fragmenterne blev separat ligeret ind i pSV2gpt/R/B som beskrevet for Cy1-7,8 og Cy1-2,3. Plasmidkort for de opnåede plasmider er vist i fig. 25, pSV2gpt- γ 2; fig 26, pSV2gpt- γ 3 og fig. 27 pSV2gpt- γ 4.

Kimære konstruktioner med tunge kæde:

De fuldstændige kimære konstruktioner med tung kæde variabel region human γ 1 konstant region blev dannet ved indsættelse af et fragment indeholdende de murine variable tunge kædere-regioner i plasmiderne indeholdende de humane γ 1-konstante regionexoner beskrevet som følger.

Eco RI-fragmenter indeholdende de murine tunge variable kæde-regioner fra CC49- og CC83-hybridomaceller blev derefter ligeret ind i hver af de γ 1- γ 4-holdige pSV2-gpt-vektorer (pSV2gpt- γ 1; pSV2gpt- γ 2; pSV2gpt- γ 3; pSV2gpt- γ 4) som følger:

CC49

Et fragment indeholdende de tunge variable kædereionexoner, som koder for den tunge variable CC49-kædereion, blev fremstillet ved fordøjelse af 14 µg af pHH49 med 50 enheder Eco RI (leveret fra BRL) ved 37°C i 2 timer. Fordøjelsesmateriale blev fraktioneret på en 4% polyacrylamidgel og 1,9 kb Eco RI-fragmentet indeholdende de tunge variable kædereionexoner fra CC49 blev udvundet ved elektroeluering som beskrevet af Maniatis. Dette fragment blev betegnet f49R.

Et fragment indeholdende 7,8 kb sekvensen, som koder for γ 1, blev fremstillet på følgende måde.

Ca. 50 µg af vektoren pSV2gpt γ 1-7,8 blev fordøjet med Eco RI. Det opnåede fragment blev dephosphoryleret (til forhindring af selv-ligering) under anvendelse af alkalisk kalvetarmphosphatase som beskrevet af Maniatis. Fragmentet blev oprenset ud fra 0,8% agarosegel ved elektroeluering. Denne vektor blev betegnet pSV2gpty1-7,8/R.

EcoRI-stedet er lokaliseret 245 bp opstrøms for transkriptionsinitieringsstederne og indeholder promotoren og de nødvendige vævsspecifikke sekvenser for effektiv ekspression. Intronregionerne 3' for de variable regioner indeholder de murine tung kædefremmersekvenser, som er fraværende på de humane tunge IgG-kædevektorer. Derfor udnytter de kimære tunge kædevektorer både murine promotor- og fremmersekvenser.

Ca. 325 ng liniariseret pSV2gpty1-7,8/R blev ligeret med 188 ng f49R i et volumen på 10 µl med en 1 enhed T4-DNA-ligase (BRL). Frosne kompetente *E. coli* AG-1-celler fra Stratagene blev transformeret med ligeringsreaktionen ifølge deres protokol. Det opnåede plasmid blev betegnet p49 γ 1-7,8. Fig. 28 illustrerer et plasmidkort for p49 γ 1-7,8.

Ca. 50 µg af vektoren pSV2gpty1-2,3 blev fordøjet som for SV2gpty1-7,8 med Eco RI. Det opnåede fragment blev dephospho-

ryleret under anvendelse af alkalisk kalvetarmphosphatase, som beskrevet af Maniatis. Fragmentet blev oprenset ud fra en 0,8% agarosegel ved elektroeluering. Det liniariserede plasmid blev betegnet pSV2gpty1-2,3/R.

5

Ca. 300 ng af det liniariserede plasmid pSV2gpty1-2,3/R blev ligeret med 188 ng f49R i et volumen på 10 μ l med 1 enhed T4 DNA-ligase (BRL). Frosne kompetente E. coli AG-1-celler fra Stratagene (La Jolla, CA) blev transformeret med ligeringsreaktionen ifølge deres protokol. Det opnåede plasmid blev betegnet p49y1-2,3. Fig. 29 illustrerer et plasmidkort fra p49y1-2,3.

10

Plasmiderne pSV2gpt-y2, pSV2gpt-y3 og pSV2gpt-y4 blev separat fordøjet med Eco RI til fremstilling af de liniære plasmidvektorer, henholdsvis pSV2gpt-y2/R, pSV2gpt-y3/R og pSV2gpt-y4/R. Hver af disse 3 liniære plasmidvektorer blev separat ligeret med f49R. Plasmidkort for de opnåede plasmider er vist i fig. 30, p49-y2; fig. 31, p49-y3; og fig. 32, p49-y4.

20

CC83

Kimære konstruktioner indeholdende den tunge kædes variable region af CC83 blev dannet på en lignende måde som de kimære konstruktioner af CC49. Et fragment indeholdende den tunge kædes variable regionexoner, som koder for den tunge CC83-kæderegion, blev fremstillet ved fordøjelse af 19 μ g pHS83 med 50 enheder Eco RI (leveret fra BRL) ved 37°C i 2 timer. Fordøjelsesmaterialet blev fraktioneret på en 4% polyacrylamidgel og 2,9 kb Eco RI-fragmentet indeholdende den tunge kædes variable regionexoner af CC83 blev udvundet ved elektroeluering som beskrevet i Maniatis. Dette fragment blev betegnet f83R.

25

30

Ca. 300 ng af det liniariserede plasmid pSV2gpty1-7,8/R, opnået som ovenfor, blev ligeret med 270 ng f83R i et volumen på 10 μ l med 1 enhed T4 DNA-ligase (leveret fra BRL). Frosne kompetente E. coli AG-1-celler, leveret fra Stratagene, blev

35

transformeret med ligeringsreaktionen ifølge Stratagene's protokol. Det opnåede plasmid blev betegnet p83 γ 1-7,8. Fig. 33 illustrerer plasmidkortet for p83 γ 1-7,8.

5 Ca. 90 ng liniariseret plasmid pSV2gpt γ 1-2,3/R, opnået som ovenfor, blev ligeret med 270 ng f83R i et volumen på 10 μ l med 1 en enhed T4 DNA-ligase (BRL). Frosne kompetente E. coli AG-1-celler fra Stratagene blev transformeret med ligeringsreaktionen ifølge Stratagene's protokol. Det opnåede plasmid
10 blev betegnet p83 γ 1-2,3. Fig. 34 illustrerer plasmidkortet for p83 γ 1-2,3.

Plasmiderne pSV2gpt- γ 2, pSV2gpt- γ 3 og pSV2gpt- γ 4 blev separat fordøjet som ovenfor for henholdsvis pSV2gpt- γ 2/R, pSV2gpt-
15 γ 3/R og pSV2gpt- γ 4/R med Eco RI til frembringelse af de liniære plasmidvektorer henholdsvis pSV2gpt- γ 2/R, pSV2gpt- γ 3/R og pSV2gpt- γ 4/R. Hver af disse tre liniære plasmidvektorer blev separat ligeret med f83R. Plasmidkort for de opnåede plasmider er vist i fig. 35, p83- γ 2; fig. 36, p83- γ 3; og fig.
20 37, p83- γ 4.

Alle ti af de cirkulære plasmidkonstruktioner (p49 γ 1-7,8; p49 γ 1-2,3; p83 γ 1-7,8; p83 γ 1-2,3, p49- γ 2; p83- γ 2; p49- γ 3; p83- γ 3; p49- γ 4; og p83- γ 4) blev derefter liniariseret til
25 transformation ved fordøjelse med restriktionsenzymet Nde I. Nde I-stedet i plasmiderne er i en region, som ikke er væsentlig for ekspressionen af det kimære immunoglobulingen eller det selekterbare markergen gpt. Det er nødvendigt for plasmiderne at være i en liniær form før transformation ind i en
30 modtagende celle for at fremme udvalgt integration af DNA'et ind i det genome værtscelle-DNA.

Bekræftelse af konstruktion

35 Da EcoRI-fragmenterne kan liggeres i begge retninger blev den korrekte retning bestemt ved fordøjelse med Nco I. I de ovenfor anførte konstruktioner bekræftes korrekte ligeringer for

plasmidkonstruktion ved udførelse af restriktionsenzymsted-kortlægning på plasmidet. Restriktionsenzymkortet dannet ved restriktionsenzymfordøjelse og gelelektroforese sammenlignes med det, som teoretisk kan dannes ud fra de individuelle udgangsfragmenter. På grund af erfaring med den transkriptionelle retning i de lette kædevektorer blev de tunge kædevektorer kun konstrueret i den modsatte transkriptionelle retning i forhold til gpt-genet.

10 Transformation af plasmider ind i museplasmacytomaceller

Når både kimære gener for let kæde og tung kæde blev transformeret ind i den samme celle opnås tetramere (H_2L_2) immunoglobuliner. Syntese og sekretion af disse "kimære" antistofproteiner blev opnået ved indførelse af de kimære (muse V:human C-region) gener i museplasmacytomaceller (Sp2/0). Transformation blev opnået ved elektroporation [Sahagan, B.G. et al., J. Immunology 137, 1066 (1986)].

20 Ekspression af kimære (muse V:human C-region) gener i transformerede museplasmacytomaceller (Sp2/0) opnås under anvendelse af to forskellige teknikker. Ved en måde kan forskellige forhold mellem let kæde-gener og tung kæde-gener indføres sammen. Dette refereres til som cotransformation. Alternativt kan stabile kloner, som bærer det kimære lette kædegen, opnås, og derefter anvendes i en anden metode, som der refereres til som målrettet transformation. Ved hver metode er målet at opnå kloner, som indeholder gener for både H-kæden og L-kæden, som fremstiller intakt H_2L_2 -immunoglobulin, som nævnt ovenfor.

30 A. Cotransformationer

Cotransformation involverer transformationen af celler med begge lægemiddelresistensmærkører på samme tidspunkt og efterfølgende udvælgelse med et eller begge lægemidler. Co-transformation af tunge kæde- og lette kædevektorer (i forhold på henholdsvis 1:1 og 1:10) blev oprindeligt udført udelukkende

under anvendelse af neo-udvælgelse. Neo-resistente cellelinier blev opnået, som udtrykte de første kimære IgG1-antistoffer med påviselig TAG72-bindingsaktivitet. Cotransformation blev udført i overensstemmelse med de protokoller, som er udført i 5
Cornelia Gorman, "High Efficiency Gene Transfer into Mammalian Cells", DNA Cloning, bind II, D.M. Glover, udgiver, IRL Press, Oxford, England (1985).

B. Målrettede transformationer

10

Konstruktioner indeholdende lette og tunge kimære immunoglobulin-
gener blev på hinanden følgende transformeret under anvendelse af ind i Sp2/0-museplasmacytomaceller. Målrettet transformation involverer transformation og udvælgelse med en vektor indeholdende et første lægemiddelresistensgen (dvs. Geneticin for den kimære lette kædegenvektor) efterfulgt af transformation og udvælgelse med en vektor indeholdende et andet lægemiddelresistensgen (dvs. mycophenolsyre for den kimære tunge kædegenvektor).

20

Neo-udvælgelse

Før transformation med pSV2neo-vektorer, som indeholder kimære lette kædekonstruktioner, blev lægemiddeludvælgelsesbetingelser for inhibering af vækst af ikke-transformerede Sp2/0-plasmacytomaceller [leveret fra the American Type Culture Collection (ATCC)] opnået ved titrering af det neomycinlignende lægemiddel Geneticin (GIBCO). Publicerede værdier for koncentrationer af Geneticin til brug ved lægemiddelselektion lå i intervallet fra 100-1000 µg/ml. Koncentrationer over 400 µg/ml viste sig at forhindre vækst af Sp2/0-celler i vores vævskulturmiljø.

30

Konstruktion af let kædeholdige celler

35

Sp2/0-museplasmacytomaceller blev indledningsvis transformeret med let kædeholdige pSV2-neo-vektorer på følgende måde. Celler

blev dyrket i RPMI 1640 medium med 5% føtalt kalveserum. Celler blev vasket i PBS og suspenderet til en koncentration på 1×10^7 levedygtige celler/ml PBS. 0,8 ml celler blev overført til en elektroportationscuvette (på is) indeholdende 20 μ g let

5 kædeholdig pSV2-neovektor (pRL105 og pRL150 for den CC49-kimære L-kæde og pRL203 og pRL230 for den CC83-kimære L-kæde) liniariseret med Aat II-restriktionsendonuklease. Aat II blev inaktiveret ved opvarmning af prøverne til 65°C i 10 minutter. Det liniariserede DNA blev ethanolpræcipiteret og derefter

10 opløst i 10-20 mikroliter PBS. Efter 15 minutter på is blev elektroportation udført under anvendelse af et Gene Pulser-elektroportationsapparat med tilsat kapacitetsforlænger (Bio-Rad) ved 0,2 kvolt og 960 μ F. Tidskonstanten (τ) var generelt ca. 26 msek.

15

Efter transformation fik celler lov til at komme sig på is i 15 minutter for at muliggøre afslapning af pertuberede membraner. Herefter blev cellerne suspenderet i 24 ml RPMI 1640 medium indeholdende 5% føtalt kalveserum (RPMI+) og overført

20 til en 96 eller 24 brøndplade. Til formindskelse af sandsynligheden for mere end en lægemiddelresistent celle per brønd, blev cellerne også fortyndet 10-gange i medium (RPMI+) og udpladet i en anden 96-brønd (eller 24-brønd) plade. Cellesuspensionen blev inkuberet ved 37°C og 5% CO₂-atmosfære.

25

Efter 48 timer (for at muliggøre ekspression af lægemiddelresistens) blev mediet fjernet og erstattet med medium indeholdende 1 mg/ml Geneticin.

30

Efter 7-10 dage blev Geneticin-resistente kloner subdyrket og cellerne screenet for kimære lette kæder ved cytopletning.

Cytopletning

35

Portioner af celler blev pelleteret på et præparatglas under anvendelse af en cytospin-2-centrifuge (Shandon, Inc.). Efter lufttørring blev cellerne fikseret i eddikesyre/ethanol (5

dele eddikesyre/95 dele ethanol). Efter skylning med PBS 3 gange (uden Ca^{+2} og Mg^{+2}) blev præparatglassene anbragt i et fugtigt kammer (100% relativ fugtighed) og plettet i 20 minutter med 20 μ l gede-anti-human kappa-FITC, et fluorescent farvestof-konjugeret antistof, som er specifik for humane lette kappa-kæder. Det konjugerede antistof blev fortyndet 1:3 med 1% BSA i PBS. Efter vask natten over med PBS blev præparatglassene monteret med fluoromount-G, histologisk monteringsmedium (leveret fra Southern Biotech) under et dækglas. Præparatglassene blev iagttaget med et Olympus model BH-2 mikroskop udstyret med en epi-illumining U.V.-anordning.

Baseret på fluorescens-intensiteten viste konstruktionerne med retningen af den lette kæde i modsat transkriptionel retning i forhold til retningen af transkription af neo^r-genet i vektoren sig at give den højeste L-kæde-ekspression. Derfor var pRL105 den foretrukne CC49-L kædekonstruktion og pRL230 var den foretrukne CC83-L-kædekonstruktion. Som et resultat af disse forsøg blev de følgende kimære let kæde-holdige cellelinier (hidrørende fra Sp2/0) anvendt til de målrettede transformationer:

For den kimære CC49-L-kæde blev der opnået en cellelinie (49K-13-13), som udtrykte den kimære lette kæde hidrørende fra CC49. Denne cellelinie blev anvendt til alle efterfølgende målrettede transformationer med kimære tunge kædevektorer til konstruktioner anvendende den kimære CC49 lette kæde.

For den kimære CC83-L-kæde blev der opnået tre cellelinier (83K-26-5, 83K-34-10 og 83K-42-2), som udtrykte den kimære lette kæde hidrørende fra CC83. En cellelinie (83K-26-5) plettede mere intens end de andre og havde lokaliserede regioner med cytoplasmisk immunofluorescens. Alle tre cellelinier blev sammenlignet med hensyn til deres relative evne til at fremstille store mængder af kimært antistof efter transformation med den kimære tunge CC83 g1-kædevektor. Flere kloner, som udtrykker kimære antistoffer, blev udledt fra elektroporation

af 83K-34-10-målet evd nogen af de andre to kimære lette kæde-
måcellelinier. Derfor blev den 83K-34-10-let kæde-cellelinie
anvendt som et mål for efterfølgende elektroporationer med
kimære tunge kædevektorer til konstruktioner indeholdende den
5 lette CC83-kædes variable region.

Dannelse af gpt-resistente kloner, som bærer CC49- og CC83-ki-
mære H-kædekonstruktioner

10 Før transformation med pSV2-gpt-vektorer, som indeholder ki-
mære tunge kædekonstruktioner, blev lægemiddeludvælgelse for
inhibering af vækst af ikke-transformerede Sp2/0-plasmacytoma-
celler [leveret fra the American Type Culture Collection
(ATCC)] etableret. Betingelser for lægemiddeludvælgelse af
15 celler, som er transformeret med pSV2-gpt-vektorer var vanske-
ligere at etablere. E. coli-gpt-genet, som koder for enzymet
guanosinphosphoribosyltransferase bibringer evnen til at ud-
nytte xanthin og hypoxanthin som substrater for biosyntesen af
guanin, når den mamale guaninmetaboliske vej inhiberes af
20 mycophenolsyre (MPA).

Publicerede værdier for koncentrationerne af MPA, som muliggør
væksten af andre lymfoide cellelinier, som var transformeret
med pSV2gpt-vektorer, viste sig at være næsten to størrelses-
25 ordener for høje til at muliggøre væksten af Sp2/0-celler
transformeret med pSV2-gpt-vektorer i vores vævskulturmiljø.
Som en følge heraf viste en koncentration på 0,1 µg/ml MPA sig
at være optimal for udvælgelse af gpt-resistens. Endvidere
viste anvendelsen af aminopterin og thymidin (for yderligere
30 at lukke af for guaninvejen) sig at være unødvendige.

Dannelse af kloner, som fremstiller kimært 44-antistof

CH44-1

5 49K-13-13-celler blev anvendt som et mål for kimære tunge
kædekonstruktioner. Cellerne blev transformeret med 20 µg
kimær tung kæde-DNA-vektor (p49γ1-7,8 eller p49γ1-2,3), som
var liniariseret ved en Nde I-fordøjelse. Transformation ved
10 elektroporation blev udført som beskrevet ovenfor for kimære
lette kæder.

Udvælgelse efter 48 timer blev imidlertid udført ved at
erstatte det geneticin-holdige medium med medium indeholdende
geneticin og 0,3 µg/ml mycophenolsyre, 250 µg/ml xanthin og 10
15 µg/ml hypoxanthin.

Transformerede celler voksede til makroskopisk synlige kolo-
nier i løbet af 14 dage. På dette tidspunkt blev 50 µl super-
natent fjernet og analyseret ved ELISA-metoder for binding til
20 TAG og ekspresion af human IgG-konstant region. Brønde inde-
holdende celler med positiv TAG-binding blev udvidet til
24-brøndplader med friskt lægemiddeludvælgelsesmedium og fik
lov til at vokse i 3-7 dage.

25 Subkloning blev udført på følgende måde. Levedygtige celle-
tællinger blev bestemt, og cellerne blev genpladet i to 96-
brøndplader. En plade fik 50 levedygtige celler og den anden
250 levedygtige celler. De ikke-subklonede celler blev udvidet
til 6-brøndplader indtil celletætheden var tilstrækkelig til
30 at muliggøre lagring i flydende nitrogen i det tilfælde, at
gen-underkloning ville være nødvendigt.

Efter subkloning blev de kloner, som havde den højeste kimære
antistofproduktion udvalgt til kimær antistofproduktion i bio-
35 reaktorer.

CH44-2

5 De metoder, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH44-1 blev gentaget med den undtagelse, at 20 µg p49-γ2 blev anvendt som den kimære tunge kædevektor.

CH44-3

10 De metoder, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH44-1 blev gentaget med den undtagelse, at 20 µg p49-γ3 blev anvendt som den tunge kædevektor.

15 CH44-4

20 De metoder, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH44-1 blev gentaget med den undtagelse, at 20 µg p49-γ4 blev anvendt som den tunge kædevektor.

Dannelse af kloner, som fremstiller kimært 88-antistof

CH88-1

25 Metoderne, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH44-1 blev gentaget med de følgende undtagelser:

30 83K-26-5, 83K-34-10 og 83K-42-2-celler, som havde vist, at de fremstillede kimær let CC83-kæde, blev transformeret som beskrevet ved transformationen af CH44-1 med den undtagelse, at 20 µg p83γ1-7,8 eller p83γ1-2,3, pSV2gpt-vektoren, som indeholder det kimære tunge CC83-kædegen, blev anvendt som den
35 tunge kædevektor.

CH88-2

Metoderne, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH88-1 blev
5 gentaget med den undtagelse, at 20 µg p83-γ2 blev anvendt som den tunge kædevektor.

CH88-3

10 De metoder, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH88-1 blev gentaget med den undtagelse, at 20 µg p83-γ3 blev anvendt som den tunge kædevektor.

15 CH88-4

De metoder, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH88-1 blev
20 gentaget med den undtagelse, at 20 µg p83-γ4 blev anvendt som den tunge kædevektor.

Dannelse af kloner, som fremstiller kimært 84-antistof

På grund af den høje sekvenslighedsgrad mellem den tunge kædes
25 variable regioner hos CC49 og CC83 blev kimære antistoffer dannet, hvis lette og tunge kæder hidrørte fra forskelligt ophav ved blandede målrettede transformationer. Til dannelse af begge "blandede" kombinationer blev de kimære tunge kædevektorer med isotype γ1 af CC49 og CC83 elektroponeret ind i
30 de kimære lette kædemål, henholdsvis 83K34-10 og 49K-13-13. De opnåede cellelinier blev betegnet CH48-1 og CH84-1, hvor den første talangivelse repræsenterer henholdsvis ophavet for den tunge kæde og lette kæde. F.eks. repræsenterer CH48-1 γ1-isotypen, hvor den tunge kæde hidrører fra CC49 og den lette kæde
35 hidrører fra CC83.

CH48-1-kompositantistoffet bandt ikke til TAG72. Dette skyldes ikke manglende evne for fremstilling af virkeligt kimært anti-

stof, da de fleste lægemiddelresistente cellelinier fremstillede kimært IgG (som bestemt ved ELISA-analyse under anvendelse af gede-anti-human Ig-fælde med gede-anti-human IgG-alkalisk phosphatase som en sonde). Hvis der var nogen bindingsaffinitet til stede, var den signifikant mindre end den, som blev iagttaget for antistof B72.3 af første generation, hvilket var ca. en størrelsesorden mindre affinitet for TAG72 end både CC49 eller CC83.

10 Overraskende bandt CC84-1 til TAG72 med affinitet svarende til begge ophav. Dette nye antistof blev dannet fra grunden i vores laboratorie og er ikke endnu blevet påvist i naturen.

15 Kompetitivundersøgelser blev foretaget for at afgøre specificiteten af dette nye blandede-antistof CH84-1. Det bør bemærkes, at både CC49 og CC83 har nogen kompetitiv genkendelse for TAG72-antigenet. Det viste sig, at CH84-1 konkurrerede mere med CC49 for binding til TAG72 end det gjorde med CC83. Dette ville indikere, at specificiteten for binding til TAG72 ligger
20 i den lette kæde.

Humane $\gamma 2$ -, -3- og -4-isotyper blev også dannet med dette blandede-antistof, frembringende CH84-2-, CH84-3- og CH84-4-kloner.

25

CH84-1

30 Metoden, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH44-1 blev gentaget med den følgende undtagelse:

35 49K-13-13-celler, som udviser produktion af CH44-let kæde ved cytopletning, blev derefter transformeret som beskrevet ved den transformerede af CH44-1 med den undtagelse, at 20 μ g p83 γ 1-2,3, pSV2gpt-vektoren, som indeholder det tunge CH83-kædegen blev anvendt i stedet for p49 γ 1-2,3, pSV2gpt-vektoren, som indeholder det tunge CH44-kædegen.

CH84-2

Metoderne, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH84-1 blev gtaget med den undtagelse, at 20 µg p83-γ2 blev anvendt i stedet for p83γ1-2,3.

CH84-3

Metoderne, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH84-1 blev gtaget med den undtagelse, at 20 µg p83-γ3 blev anvendt i stedet for p83γ1-2,3.

15 CH84-4

Metoderne, som blev anvendt til sekventielt at transformere Sp2/0-plasmacytomacellerne ved konstruktionen af CH84-1 blev gtaget med den undtagelse, at 20 µg p83-γ4 blev anvendt i stedet for p83γ1-2,3.

Oprensning af rekombinerede antistoffer

Celler, som udtrykker de kimære antistoffer, blev fjernet ved centrifugering fra dyrkningsmediet, og mediet blev filtreret gennem et 0,2 µm filter. Kimære antistoffer blev oprenset i to trin fra kultursupernatanter. I det første trin ved oprensningen blev der anvendt en protein A-affinitetskassette (Nygene Corporation, Yonkers, NY) ifølge fremstillernes specifikationer. Der blev ført op til 1,0 liter kultursupernatant gennem en 1 mg kapacitetskassette ved 5 ml/minutter. Kassetten blev vasket med fosfatpufret saltopløsning (PBS) til fjernelse af spor af albumin. Det kimære antistof blev udvundet ved eluering med 0,1 M natriumnitratpuffer, pH-værdi 3,0. pH-værdien af fraktionerne indeholdende det kimære antistof blev øjeblikkelig indstillet til neutralitet med en 1 M opløsning af Trizma-base. Den endelige oprensning blev opnået ud fra denne

opløsning efter koncentration på en Amicon centricon 30-enhed ved hjælp af gelfiltrering under anvendelse af en Pharmacia Superose 12 HR 16/50-søjle, som specificeret af fremstilleren (Pharmacia, Piscataway, NJ).

5

EKSEMPEL: Dannelse af et immunoglobulin, som indeholder den murine V_HαTAG-kimlinievariable region

10

De følgende eksempler er anført for at bibringe en fagmand inden for området en reproducerbar teknik til fremstilling af et antistof med en V_H-region, som kodes af en DNA-sekvens hidrørende fra V_HαTAG.

15

Komponenter for et ekspressionsdygtigt tungt V_HαTAG-kædegen

20

Et muse/humant-kimært antistofmolekyle kan dannes, som indeholder den murine V_HαTAG-kimlinie tunge kædes variable region, en let kædes variable region, som er komplementær med V_HαTAG V_H, såsom enten den CC49- eller CC83-murine lette kædes variable region, og humane konstante regioner.

25

2,2 kb HindIII-kimlinie-DNA-fragmentet indeholdende V_HαTAG V_H-exonsekvensen anvendes som en skabelon til opnåelse af en funktionelt omløjret V_HαTAG-variabel region. Den murine genome J-Cμ-intronregion anvendes som en kilde for de murine tunge kædefremmersekvenser. Denne sidstnævnte region opnås ud fra plasmidet pNP9 (se eksempel ovenfor under "isolering af CC49-tung kædes variable region"). Fig. 38 viser den samlede reaktion ved fremstillingen af hybride gener baseret på metoden beskrevet af Horton et al., (1989), supra. Fire oligonukleotider (oligoer) udformes til anvendelse ved enzymatisk forstærkning og modifikation af mål-DNA'et. Oligo 1 sammenføjes med 5'-enden af V_HαTAG spændende EcoRI-stedet, som er 249 bp 5' for ATG-initieringscodonet. Oligo 2 sammenføjes med

30

35

sekvenser komplementære med 3'-enden af V_HαTAG-exonet og indeholder også sekvenser, som koder for et D-segment. D-segment-sekvenserne i oligo 2 sammenføjer ikke med nogen V_HαTAG-se-

kvenser. Oligo 3 indeholder sekvenser, som er komplementære med 5'-enden af den murine genome J-C μ -region og inkorporerer sekvenser, som koder for D-segmentet (samme som i oligo 2) og J-segmentet. Oligo 4 sammenføjer med 3'-enden af J-C μ -regionen og indeholder sekvenser, som er komplementære med EcoRI-stedet anbragt 1219 bp 3' fra J μ 4. Sekvensen for disse oligoer er som følger:

10 Oligo 1 5'GTCTAGAATTCATAAAAACTTTATG (25 mer)

Oligo 2 CAGTGTATTTCTGTAAAAGATCTACTATGGTTACG (35 mer)

15

Oligo 3 5'TCTACTATGGTTACGTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
GTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCT 3' (72 mer)

20

Oligo 4 5' ACTTCTAAAATGTATTTAGAATTCATTTTC 3'

25 I dette eksempel er D-sekvensen SP2,3 taget fra den publicerede sekvens af Kurosawa og Tonegawa J. Exp. Med., 155:201 (1982). D-sekvensen er vist i fede typer i oligoer 2 og 3. Et hvilket som helst andet karakteriseret murint eller humant D-segment kan anvendes ved erstatning med deres sekvens i disse stillinger i oligo 2 og 3.

30

J-segmentet i oligo 3 er understreget. Det er det murine J μ 4 taget fra den publicerede sekvens af Gough og Bernard Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78:509 (1981). Indbefatningen af ethvert andet murint eller humant J-segment kan foretages ved at anvende deres sekvens i stedet for sekvensen for J μ 4 i oligo 3.

35

I oligo 1 og 4 er EcoRI-stederne (GAATTC) vist i kursiv.

Samling af intakte V_HαTAG-gener

6 Der blev udført separate DNA-forstærkningsreaktioner under anvendelse af de ovenfor beskrevne komponenter. DNA-forstærkningsreaktion nr. 1 kopierer V_HαTAG-sekvensen og adderer et D-segment til dens 3'-ende. DNA-forstærkningsreaktion nr. 2 kopierer de murine intronsekvenser indeholdende de tunge kædefremmersekvenser og adderer D- og J-segmenterne, som der kodes for inden i oligo 3. De forstærkede produkter fra reaktion 1 og 2 geloprenses, forenes og oligo 1 og 4 tilsættes for at begynde reaktion nr. 3. I reaktion 3 sammenføjes produkterne fra reaktioner 1 og 2 over deres fælles D-sekvenser. Efterfølgende DNA-forstærkning fra oligoer 1 og 4 giver produktet vist i bunden af fig. 38. Dette fragment fordøjes med EcoRI og geloprenses. Det modificerede V_HαTAG-fragment ligeres ind i EcoRI-stedet i pSV2gpty1 (2,3) som beskrevet i det ovenfor anførte eksempel "kimære tunge kædekonstruktioner". Hele det V_HαTAG-D-J-fremmerholdige fragment sekvensbestemmes fuldstændig for at sikre, at der ikke er blevet indført nogen mutationer under DNA-forstærkningsreaktionerne. De andre tre tung kæde-γ-isotyper kan dannes ved at ligere det samme modificerede V_HαTAG-fragment ind i de andre tre γ-holdige pSV2gpt-vektorer (pSV2gpt-γ2; pSV2gpt-γ3; pSV2gpt-γ4).

Ekspression af det modificerede V_HαTAG-gen

30 De modificerede V_HαTAG-genholdige plasmider kan liniariseres med NdeI og indføres via elektroporation i de kimære lette CC49- eller CC83-kædeudtrykkende cellelinier (se eksempel ovenfor, "C. Målrettede transformationer"). De transformerede celler udvælges for vækst i nærværelse af geneticin og mycophenolsyre som beskrevet ovenfor under "C. Målrettede transformationer". Tilstedeværelsen af udtrykt antistof overvåges ved TAG72-ELISA (se afsnit under RESULTATER, enzym-koblede immunoanalyser (ELISA)). Det udtrykte antistof fra disse cel-

ler vil indeholde humant Ig $\gamma_{1,\kappa}$ konstante regioner sammen med den lette CC49- eller CC83-kædes variable region og en tung kædes variable region fra de modificerede $V_H\alpha$ TAG-kimlinie- V_H -exoner.

5

Fire eksempler på modificerede konstruktioner med $V_H\alpha$ TAG-tung kædes variable region med en forskel i D- og J-segmenter er vist nedenfor.

<u>V_H-segment</u>	<u>D-segment</u>	<u>J-segment</u>
$V_H\alpha$ TAG #i	muse-D (SP2,3)	muse-J
$V_H\alpha$ TAG #ii	human D (D1)	muse-J
$V_H\alpha$ TAG #iii	muse-D (SP2,3)	human J
$V_H\alpha$ TAG #iv	human D (D1)	human J

15

20 Sekvensen for den humane D-sekvens D1 er fra Siebenlist et al., Nature, 294:631 (1981). Sekvensen for det humane J_H1 er fra Ravetch et al., Cell 27, 583 (1981).

25

Dannelsen af $V_H\alpha$ TAG #i er beskrevet ved hjælp af de ovenfor skematisk viste oligoer 1 til 4. Til dannelse af $V_H\alpha$ TAG #ii til -iv er det nødvendigt at ændre de tilsvarende D- og J-segmenter i oligoer 2 og 3. De følgende oligoer skildrer disse ændringer. Eerstatning med disse oligoer i reaktion nr.1 og reaktion nr. 2 vil resultere i dannelsen af $V_H\alpha$ TAG #ii til -iv.

30

35

V_HαTAG #ii

5 Oligo 2 5' CAGTGTATTTCTGTAAAAGAGTACTGGTGGT (34 mer)
GTAT

Oligo 3 5' GTACTGGTGGTGTATTGGGGTCAAGGAACC (72 mer)
TCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCT
CTCCAGGTCT 3'

10 V_HαTAG #iii

Oligo 2 5' CAGTGTATTTCTGTAAAAGATCTACTATGG (35 mer)
TTACG

15 Oligo 3 5' TCTACTATGGTTACGTGGGGCCAGGGCAC (72 mer)
CCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGGTCT
3'

V_HαTAG #iv

20 Oligo 2 5' CAGTGTATTTCTGTAAAAGAGTACTGGTG (35 mer)
GTGTAT

25 Oligo 3 5' GTACTGGTGGTGTATTGGGGCCAGGGCAC (72 mer)
CCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGC
CTCTCCAGGTCT 3'

Resultater30 A. Kimært antistof-producerende cellelinier

Samtidig påvisning af tunge og lette kæder blev opnået under anvendelse af to sondeantistoffer:

- 35 1) Gede-anti-human kappa mærket med det fluorescerende farvestof FITC; og
2) Gede-anti-human IgG mærket med det fluorescerende farvestof TRITC.

Cellelinier med positive reaktioner med hensyn til både tung og let kæde blev yderligere undersøgt for dermed forbundet kimær immunoglobulinproduktion og biologisk aktivitet, dvs. binding til TAG72.

5

Enzymkoblede immunoanalyser (ELISA)

Til udvælgelse af en transformeret celle, som producerer et kimært monoklont antistof, blev der benyttet ELISA-teknik. Kloner indeholdende de tunge kæde- og lette kædelægemedel-

10 selektionskonstruktioner blev udvalgt ved deres vækst i selektiv kulturmedium. De følgende cellelinier blev undersøgt (1) CH44-1: en cellelinie med CC49 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₁; (2) CH44-2: en cellelinie med CC49 V_H, CC49 V_L, og

15 konstant region af IgG₂; (3) CH44-4: en cellelinie med CC49 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₄; (4) CH88-1: en cellelinie med V_H, CC83 V_L, og konstant region af IgG₁; (5) CH88-2: en cellelinie med CC83 V_H, CC83 V_L, og konstant region af IgG₂; (6) CH88-3: en cellelinie med CC83 V_H, CC83 V_L og

20 konstant region af IgG₃; (7) CH88-4: en cellelinie med CC83 V_H, CC83 V_L og konstant region af IgG₄; (8) CH84-1: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₁; (9) CH84-2: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₂; (10) CH84-3, en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og

25 konstant region af IgG₃; og (11) CH84-4: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₄.

Supernatenterne fra disse kulturer blev underkastet ELISA. Tilstedeværelsen af kimært anti-TAG72-antistof blev målt direkte ved omsætning af et overskud af gede-anti-humant IgG-antistof mærket med et enzym, såsom alkalisk phosphatase efter at det kimære anti-TAG72-antistof havde fået lov til at binde sig til mikrotiterbrønde overtrukket med antigen (TAG72). Anti-TAG72aktivitet blev bestemt som et kriterie for succesrig

30 rekombinering.

35

Efter vækst i 14 dage blev 50 µl supernatant fjernet fra brøndene med de underklonede celler og gen-analyseret for TAG-bin-

ding ved ELISA. Prøver af supernatanter (50 μ l) fra lægemid-
delresistente cellelinier blev ført til brønde af Nunc Immulon
96-brøndplader, som i forvejen var blevet overtrukket med TAG-
antigen (1/50 fortynding). Efter vask til fjernelse af ikke-
5 bundet materiale blev brøndene inkuberet med gede-anti-humant
IgG-antistof konjugeret med alkalisk phosphatase (GAHIgG-AP),
som en sonde til påvisning af de humane konstante regioner i
de kimære antistoffer, som havde bundet sig til TAG-antigenet
immobiliseret på pladen. En anden vask til fjernelse af ikke-
10 bundet sonde (GAHIgG-AP) efterfulgt af tilsætningen af et
chromogent alkalisk phosphatasesubstrat gjorde det muligt for
farve at udvikles i de brønde, som havde TAG-binding forbundet
med humane konstante regioner (dvs. kimære anti-TAG72-anti-
stoffer). Absorbans aflæsninger ved 405 nm viste den relative
15 mængde af kimært antistof, som var fremstillet af de lægemid-
delresistente cellelinier.

CH44-1

20 Anti-TAG72-aktivitet blev anvendt som et kriterie for suc-
cesrig rekombinering. Brønde i mikrotiterplade blev overtruk-
ket med TAG ved inkubering af 50 μ l af en 1:75 fortynding af
oprenset TAG72 [Muraro, R., et al., Cancer Research 78,
4588-4596 (1988)] i 18 timer ved stuetemperatur. Brøndene blev
25 derefter vasket 4 gange med phosphatpufret saltopløsning (PBS)
og derefter blokeret med BSA ved inkubering af 50 μ l 0,5% BSA
i PBS i 2 timer ved 37°C efterfulgt af vask fire gange med
PBS. Disse plader er stabile, hvis de holdes fugtige ved 4°C.
Prøver på 50 mikroliter tilføres derefter til hver brønd. En
30 blind indeholdende frisk medium anvendes som en kontrol. Alle
prøverne blev inkuberet enten i pladen i 90 minutter ved 37°C
eller natten over ved 4°C i en lukket beholder.

35 Pladerne blev derefter vasket 4 gange med PBS og gede-anti-
human IgG-alkalisk phosphatase (Southern Biotech Assoc.) blev
sat til hver brønd ved tilsætningen af 50 μ l af en 1:250 for-
tynding. Opløsningen blev inkuberet ved 37°C i 90 minutter.

Farveudvikling blev overvåget efter vask af pladerne 4 gange med PBS til fjernelse af sonden.

5 Substratet blev inkuberet i 200 µl opløsning af substrat-p-nitrophenylphosphat (Kirkegaard & Perry) i ethanolaminpufret saltopløsning i 6 minutter ved stuetemperatur til farveudvikling. Den optiske densitet ved 450 nm i hver brønd blev aflæst af en Dynatech-mikropladeafleser (Dynatech Inc.).

10 Sp2/0-kolonier i brønde med supernatenter med TAG72-bindende kimær antistofaktivitet blev subklonet ved begrænset fortynding. Individuelle subkloner blev udvalgt på basis af relativ høj produktion af kimært antistof.

15 CH44-2

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH44-2.

20 CH44-3

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH44-3.

25 CH44-4

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH44-4.

30 CH88-1

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH88-1.

35

CH88-2

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH88-2.

5

CH88-3

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH88-3.

10

CH88-4

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH88-4.

15

CH84-1

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH84-1.

20

CH84-2

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH84-2.

25

CH84-3

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH84-3.

30

CH84-4

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH84-4.

35

CH84-1

Den for CH44-1 anvendte TAG-ELISA-fremgangsmåde blev gentaget med den undtagelse, at antistoffet var CH84-4.

5

B. In vivo-carcinommåling

De kimære monoklone antistoffer, som blev anvendt til dyreundersøgelser vist i tabellerne 1-4 i det efterfølgende blev mærket med Na¹²⁵I under anvendelse af Iodogen (Pierce Chemical, Rockford, IL). Nærmere bestemt blev fra ca. 0,5-2 mg oprensede kimære monoklone antistoffer indstillet til ca. 0,5 ml 0,1 M natriumphosphatpuffer (pH-værdi 7,2) og derefter sat til et glasrør på 12 cm x 75 cm, som var overtrukket med 50 µg Iodogen efterfulgt af tilsætning af fra 0,1-0,5 mCi af Na¹²⁵I (New England Nuclear, Boston, MA). Efter en inkubering på 2 minutter ved stuetemperatur blev proteinet fjernet fra det uopløselige Iodogen, og det ikke-inkorporerede ¹²⁵I blev adskilt fra antistoffet ved gelfiltrering gennem en 10 ml søjle Sephadex® G-25 under anvendelse af PBS som pufferen. Ioderingsskemaet gav mærket kimært IgG-antistof med en specifik aktivitet på 0,05 til 0,2 µCi/µg.

Athymiske hunmus (nu/nu) på en CD1-baggrund blev leveret fra Charles River med en alder på ca. 4 uger. Ni dage senere blev musene podet subkutant (0,1 ml/mus) med LS174T-celler (1 x 10⁶ celler/dyr).

Athymiske mus, som har carcinomaer 70 til 400 mg i vægt, blev ca. 12 til 13 dage efter podning med cellerne indgivet injektioner intravenøst på fra 0,5 til 2,0 µCi (10-50 µg protein) i PBS af de kimære monoklone antistoffer, som var blevet joderet som ovenfor beskrevet. Grupper på fem mus blev aflivet på forskellige tidspunkter ved exsanguination, carcinomet og normale væv blev udskåret og vejede og cpm blev målt i en gammatæller. cpm/mg af hvert væv blev derefter bestemt og sammenlignet med det, der blev fundet i carcinomet.

Resultaterne for CH44-1 er vist i tabellerne 1-2 og figurerne 39A, 39B og 39C. Resultaterne for CH84-1 er vist i tabellerne 3 og 4 og figurerne 40A og 40B.

5 Procent injiceret dosis per gram ^{125}I -mærket antistof
Tabel 1

10 Væv	CH44-1			
	0,75 timer	23,5 timer	49,5 timer	122 timer
15 blod, i alt	29,70	15,84	8,09	7,31
lever	8,13	4,13	2,19	1,96
milt	6,19	3,39	2,12	1,36
20 nyre	4,35	2,80	1,52	1,33
tumor	3,31	25,95	28,83	44,16
lunge	7,34	5,39	2,90	2,36
25 tumor, vægt	0,18	0,12	0,09	0,11

30 Ca. 122 timer efter injektion var procent injiceret dosis i forhold til tumor for CH44-1 44,16% som vist i tabel 1. CH44-1 var derfor effektiv til målfinding af det humane tumor in-situ. Dette viser, at de kimære monoklone antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse var effektive til at nå frem til carcinomaet som mål in vivo og således er egnet til in vivo-behandling af cancer.
35

Procent injiceret dosis per organ af ¹²⁵I-mærket antistof

Tabel 2

5	Væv	CH44-1			
		0,75 timer	23,5 timer	49,5 timer	122 timer
10	blod, i alt	47,72	23,03	13,29	12,01
	lever	10,97	5,20	3,20	2,69
	milt	1,09	0,48	0,25	0,22
15	nyre	1,25	0,72	0,42	0,40
	tumor	0,57	3,08	2,82	4,55
20	lunge	1,20	0,87	0,57	0,37
	GI-kanal	6,64	4,78	3,96	2,83
	krop	43,17	49,68	35,35	29,95
25	samlet legeme- retention	91,30	76,34	53,28	46,20

30 Som vist i tabel 2 var procentværdien af injiceret dosis i forhold til tumor for CH44-1 4,55% 122 timer efter injektion. CH84-1 var derfor effektiv med hensyn til at nå frem til det humane tumor in-situ som mål. Dette viser, at de kimære mono-
 35 klonale antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse var effektive til at nå frem til carcinomaet som mål in vivo og således var egnede til in vivo-behandling af cancer.

Procent injiceret dosis per gram ¹²⁵I-mærket antistof

Tabel 3

5	Væv	CH84-1			
		1 time	23 timer	47 timer	118-119 timer
10	blod	30,68	15,65	6,74	6,49
	lever	12,55	4,26	2,35	1,57
	milt	10,93	3,35	2,56	1,70
15	nyre	5,59	2,51	1,53	1,55
	tumor	4,06	20,52	17,58	30,27
20	lunge	10,77	4,80	2,58	2,24
	tumor, vægt	0,15	0,22	0,20	0,24

25 Som vist i tabel 3 var procentværdien af injiceret dosis i forhold til tumor for CH84-1 30,27% ca. 118 timer efter injektion. CH84-1 var derfor effektivt med hensyn til at nå frem til den humane tumor in situ som mål. Dette viser, at de kimære monoklone antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse var effektive til at nå frem til carcinomaet som mål in vivo og således var egnede til in vivo-behandling af cancer.

Procent injiceret dosis per organ af ¹²⁵I-mærket antistof

Tabel 4

5	Væv	CH84-1			
		1 time	23 timer	47 timer	118-119 timer
10	blod, i alt	45,98	22,11	10,08	9,37
	lever	13,64	5,34	3,13	1,94
	milt	1,35	0,49	0,32	0,16
	nyre	1,39	0,62	0,38	0,38
15	tumor	0,59	4,33	3,63	7,02
	lunge	1,77	0,69	0,42	0,31
	GI-kanal	7,38	4,92	3,41	2,32
	krop	44,83	52,19	30,32	24,06
20	Samlet legeme- retention	93,58	81,00	47,14	45,48

25 Som vist i tabel 4 var procentværdien af injiceret dosis i forhold til tumor for CH84-1 7,02% ca. 118 timer efter injektion. CH84-1 var derfor effektiv med hensyn til at nå den humane tumor in situ som mål. Dette viser, at de kimære monoklone antistoffer ifølge den foreliggende opfindelse var effektive til at nå frem til carcinomaet som mål in vivo og

30 således var egnede til in vivo-behandling af cancer.

Deponering af cellelinier, som fremstiller kimære antistoffer

35 Der blev som eksempler deponeret 11 cellelinier, som udskiller kimære antistoffer, der alle har lette kappa-kæder fremstillet ved hjælp af de ovenfor beskrevne eksempler hos the American

Type Culture Collection (ATCC) den 19. oktober 1988. Specifikt er de følgende cellelinier blevet deponeret: (1) CH44-1: en cellelinie med CC49 V_H, CC49 V_L og konstant region af IgG₁ (ATCC nr. HB 9884); (2) CH 88-2: en cellelinie med CC83 V_H, CC83 V_L, og en konstant region af IgG₂ (ATCC nr. HB 9880); (3) CH44-4: en cellelinie med CC49 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₄ (ATCC nr. 9877); (4) CH88-1: en cellelinie med V_H, CC83 V_L, og konstant region af IgG₁ (ATCC nr. 9882); (5) CH44-2: en cellelinie med CC49 V_H, CC49 V_L, og en konstant region af IgG₂ (ATCC nr. 9881); (6) CH88-3: en cellelinie med CC83 V_H, CC83 V_L, og konstant region af IgG₃ (ATCC nr. 9876); (7) CH88-4: en cellelinie med CC83 V_H, CC83 V_L, og konstant region af IgG₄ (ATCC nr. 9874); (8) CH84-1: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₁ (ATCC nr. 9883); (9) CH84-2: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₂ (ATCC nr. 9879); (10) CH84-3: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L og konstant region af IgG₃ (ATCC nr. 9878); og (11) CH84-4: en cellelinie med CC83 V_H, CC49 V_L, og konstant region af IgG₄ (ATCC nr. 9875).

20

De følgende eksempler illustrerer ekspresion af variable regioner af antistofferne ifølge opfindelsen med modificerede konstante regioner. Molekylerne med disse modificerede konstante regioner udviser ændret serumhalveringstid, vævsbiofordeling, effektorfunktioner etc. i forhold til et antistof med en umodificeret konstant region.

25

Antistofferne med afkortede tunge kæder er illustreret i fig. 41 (a og b). De blev produceret genetisk ved sekventiel fjernelse af de C-terminale domæner af de humane $\gamma 1$ eller $\gamma 3$ tunge kæder. De tunge kæder blev modificeret ved successiv fjernelse af CH3- og CH2-domænerne i de humane $\gamma 1$ (Ellison et al., (1982) og Takahashi et al. (1982)) og fjernelse af CH3- og CH2- og hingedomæner i de humane $\gamma 3$ (Krawinkel et al., (1982) og Takahashi et al., (1982)) konstante regiongener, som blev anvendt ved ekspresion af kimære antistoffer.

30

35

Fjernelse af CH3-domænet i den humane $\gamma 1$ tunge kæde resulterer i et molekyle med en størrelse på 5/6 af størrelsen for det intakte antistof, der refereres til som "CH3-minus", og den konstante regionsekvens er angivet i sekvens 1. Det næste mindre molekyle, den $F(ab')_2$ -lignende konstruktion, blev dannet ved fjernelse af både CH2- og CH3-domænerne i den humane $\gamma 1$ tunge kæde, hvilket efterlader hinge- og CH1-domænerne. Det resulterende kimære, genetiske $F(ab')_2$ -molekyle er ca. 2/3 af størrelsen af det intakte antistof, og den konstante regionsekvens er vist i sekvens 2. De humane $\gamma 1$ tunge kæder er koblet ved hjælp af et par af disulfidbindinger ved Cys-239 og Cys-242 (Kabat et al., 1987) i hingedomænet. Det lette kæde C-terminus, Cys-213 (Kabat et al., (1987)) er forbundet til den $\gamma 1$ tunge kæde ved Cys-233 (Kabat et al., (1987)), ligeledes i hinge-domænet (se fig. 41). $\gamma 1$ -isotypen blev anvendt til konstruktion af CH3-minus- og $F(ab')_2$ -molekylerne, eftersom hinge-domænet blev anvendt i begge disse konstruktioner. Ved udformning af det Fab-størrelsesafpassede molekyle, som er 1/3 af størrelsen af et intakt antistof, ville fjernelse af hinge-domænet imidlertid eliminere stedet for vedhæftning af den lette kæde. Den humane $\gamma 3$ tunge kæde blev udvalgt til Fab-konstruktion, og den konstante regionsekvens er vist i sekvens 3.

25

30

35

Sekvens 1

AGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGA
GGCAGGTGGCGCCAGCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAA
CCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGSCCTCTGCGCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACC
GCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGG
AAGCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAG
CAAGGCAGGCCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGG
GAGAGGGTCTTCTGGCTTTTTCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCATAGGTGCCCTAACC
CAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGG
AGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCG
GACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAT
CTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCCCAGGCCTCGCCCT
CCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCG
GGTGTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC
AAA

Sekvens 2

AGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGA
GGCAGGTGGCGCCAGCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAA
CCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCTGGGCCAGCTCTGTCCCACACC
GCGGTACATGGCACCACCTCTCTTGAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGG
AAGCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCGGCTATGCAGCCCCAGTCCAGGGCAG
CAAGGCAGGCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGCCTCTGCCCGCCCCA²TCATGCTCAGG
GAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACC
CAGGCCCTGCACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGG
AGGACCCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCG
GACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAGAGCCCAAT
CTTGTGACAAAAC²TCACACATGCCACCGTGCCCA

Sekvens 3

AGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGAC
GCAGGTGGCGCCAGCCAGGCGCACACCCAATGCCCGTGAGCCCAGACACTGGACCCTGCC
TGGACCCTCGTGGATAGACAAGAACCAGGGGCCTCTGCGCCTGGGCCAGCTCTGTCC
CACACCGCAGTCACATGGCGCCATCTCTCTTGAGCCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT
GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGTT

Domænerne med tunge kæder blev deleteret under anvendelse af SOE-teknikken (Horton et al., 1989; Ho et al., 1989) ved fjernelse af de tilsvarende exoner. I fig. 42a er den generelle proces illustreret: to DNA-fragmenter (AB og CD) dannes separat ved traditionel PCR. Dette gennemføres ved anvendelse af kort oligonukleotidprimer, svarende til hver af 5' (a og c)- og 3' (b og d)-enderne af de pågældende fragmenter. Efter oprensning blandes de to DNA-fragmenter, denatureres og reanneles over de overlappingsregioner, der hidrører fra "wagging tail". Efter endnu en PCR under anvendelse af de yderste oligonukleotidprimere (a og d), udstrækkes og amplificeres de overlappende fragmenter som et enkelt fragment.

Gener konstante regioner med tunge kæder koder alle for lysin som den sidste aminosyre efter glycin og før termineringscodonet (Dunnick et al., 1980; Kabat et al., 1987). C-terminuset af udskilt fuldt udviklet tungt kæde-protein har imidlertid vist sig at være glycin (Kabat et al., 1987), hvilket indikerer post-translationsbearbejdning af det terminale lysin. På grund af den mulighed, at denne post-translationsbearbejdning er nødvendig for effektiv ekspression, blev hver afkortet konstruktion afsluttet ved hjælp af mindst to aminosyrer af C-terminuset af den humane $\gamma 1$ tunge kæde. Således starter 404 bp DNA-fragmentet, a-x (se fig. 42b) med Gly-Lys og termineringscodoner og indbefatter polyadenyleringssignalsekvensen. Dette fragment blev anvendt som 3'-sammenføjningsfragment for alle de konstruktioner, der er beskrevet heri. Eftersom DNA-sekvensen af 3'-størstedelen svarende til 190 bp af dette fragment ikke er kendt, blev PCR gennemført fra en 3'-primer hidrørende fra den naboliggende vektorsekvens og indbefattede fragmentets Bam HI-restriktionssted.

Som vist i fig. 42b blev de første produkter af de to første PCRer, fragmenterne y-b1 og a-x oprenset og underkastet en SOE-reaktion, som dannede y-b1-x-fragmentet for Fab-vektor-konstruktionen. De genetiske F(ab')₂- og CH3-minus-fragmenter blev konstrueret ved tilsvarende metoder under anvendelse af

3'-primerne b2 og b3 og den humane γ 1-skabelon, hvilket gav y-b2-x- og y-b3-x-fragmenterne efter SOE-reaktioner. Før den endelige oprensning af SOE-produkterne blev fragmenterne fordøjet med både EcoRI og BamHI til dannelse af 3'-overlappende ender til efterfølgende liggering ind i sådanne steder i pSV2-gpt-vektoren.

Vektorkonstruktionerne med afkortede tunge kæder er udformet til at forlignes med enhver tung kæde-variabel region på et EcoRI-fragment.

Materialer og metoder

Restriktionsenzymmer og DNA-modificerende enzymer leveredes af BRL (Gaithersburg, MD), Stratagene (LaJolla, CA) og New England Biolabs (Beverly, MA). Deoxynukleotider leveredes af Pharmacia (Piscataway, NJ).

Udformning af oligonukleotidprimere for PCR/SOE

49VDJ-exonet, CH1-exonet af γ 3 og hinge- og CH2-exonerne af γ 1 udviser alle ved deres 3'-ender det første nukleotid af den første codon af det næste exon. Dette partielle codon blev udeladt ved udformning af de tilsvarende oligonukleotidprimere (henholdsvis b0 (se fig. 42c), b1, b2 og b3). Sekvensen af primer y (5'-GGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTC-3') hidrørte fra DNA-sekvensen 5' til Eco RI-stedet i pSV2gpt (Mulligan & Berg, 1981). Sekvensen af primer x (5'-TATCTTATCATGTCTGGATCC-3') hidrørte fra DNA-sekvensen 3' til Bam HI-stedet i pSV2gpt (Mulligan & Berg, 1981). Den region, hvorfra disse sekvenser hidrørte, var oprindeligt klonet fra pBR322. Sekvensen af primer a (5'-GGTAAATGAGTGCGACGG-3') begynder med de sidste to codoner (Gly-Lys) af CH3-exonet af humant γ 1. Sekvensen af primer b0 (5'-CCGTGCGACTCATTTACCTGAGGAGACGGTGACTION-3') blev udformet således, at 5'-halvdelen ville "logre" (eng.: "wag") og være fuldstændig komplementær til de 5' 18 nukleotider af primer a. 3'-halvdelen er komplementær til de 6 komplette C-

terminale codoner af J-regionen af CC49-tung kæde VDJ exonet. Sekvensen for primer b1 (5'-CCGTCGCACTCATTTACCAACTCTCTTGTCACCTT-3') svarer til primer b0 i 5'-halvdelen, men 3'-halvdelen er komplementær til de 6 komplette C-terminale codoner af CH1-exonet af humant γ 3. Sekvensen af primer b2 (5'-CCGTCGCAC-TCATTTACCTGGGCACGGTGGGCATGT-3') svarer også i udformning til primer b0 i 5'-halvdelen, men 3'-halvdelen er komplementær til de 6 komplette C-terminale codoner af hinge-exonet af humant γ 1. Sekvensen af primer b3 (5'-CCGTCGCACTCATTTACCTTTGGCTTTGGAGATGGT-3') svarer også til primer b0 i 5'-halvdelen, men 3'-halvdelen er komplementær til de 6 C-terminale codoner af CH2-exonet af humant γ 1.

PCR- og SOE-metoder

Fragmentet a-x (svarende til 404 nt) blev dannet ved PCR (Saiki, et al., 1988) under anvendelse af den Nde I-lineariserede skabelon py1-gpt, som indeholder det humane γ 1 gen, og oligonukleotidprimerne a og x. Fragmentet y-b0 (762 nt) blev dannet ved PCR under anvendelse af primerne y og b0 på den lineariserede p49 γ 1-gpt skabelon. Fragment y-b1 (544 nt) blev produceret ved PCR under anvendelse af primerne y og b1 på py3-gpt skabelonen, som indeholder det humane γ 3 gen. Fragmenter y-b2 (977 nt) og y-b3 (1425 nt) blev produceret på py1-gpt skabelonen under anvendelse af henholdsvis primerne y og b2 og y og b3. Fragmentet y-b0-x (svarende til 1166 nt) blev dannet ved SOE-metoden (Ho, et al., 1989). Dette involverer denaturering og annealing af de gel-oprensede fragmenter y-b0 og a-x og PCR-ekstension af 5'- og 3'-primerne y og x. På tilsvarende måde blev fragmenterne y-b1-x (svarende til 948 nt), y-b2-x (svarende til 1381 nt) og y-b3-x (svarende til 1829 nt) dannet ved SOE-teknologi efter annealing af henholdsvis fragmenterne y-b1, y-b2 og y-b3 med fragment a-x efterfulgt af PCR-ekstension med primerne y og x.

Termisk cykling blev gennemført. Skabelon- og primerkoncentrationer var henholdsvis 0,1-1,0 ng/ml og 1 nmol/ml i 0,1 ml

(Saiki et al., 1988). PCR- og SOE-betingelser var: denature-ring-2 minutter ved 92-96°C; annealing-3 minutter ved 37°C til 50°C; ekstension i 10 minutter ved 71°C-74°C (30 cykler).

5 Vektorkonstruktion

Efter phenol/chloroform-ekstraktion og ethanolpræcipitering af SOE-reaktionsdeltagerne blev fragmenterne fordøjet med Eco RI og Bam HI og geloprenset (Maniatis et al., 1982). Hvert frag-
10 ment blev ligeret med Eco RI/Bam HI-fragmentet af SV2-gpt vektoren. Disse vektorer er i stand til at acceptere ethvert V_H-fragment med Eco RI-ender. 1,9kb Eco RI-fragmentet indehol-
dende CC49 V_H blev ligeret ind i Eco RI-stedet på hver af vek-
15 torerne med afkortede tunge kæder, og kloner blev analyseret ved hjælp af Nco I-digestion for korrekt orientering af V_H-
-fragmentet.

Elektroporeringsudvælgelse og ekspression

20 Hver af de kimære CC49 afkortede tunge kæde-vektorer blev li-
neariseret med Nde I og elektroporeret ind i målceller, som ud-
trykker den kimære CC49 lette kæde. TAG-72 bindingsaktivitet i
et medium af mycophenolsyre (MPA)-resistente kolonier blev på-
vist ved hjælp af ELISA med alkalisk phosphatase-konjugeret
25 gedeanti-human kappa-antistof (Southern Biotechnology Associa-
tes, Inc., Birmingham, AL). Vektoren indeholdende 49Hv-frag-
mentet alene (p49Vh-gpt) blev også elektroporeret ind i mål-
celler (SP2/0), som ikke udtrykker let kæde eller tung kæde
(Shulman et al., 1978). Den mulige TAG-72 bindingsaktivitet
30 produceret ved hjælp af disse MPA-resistente kolonier blev
målt ved competition-ELISA. Kolonier med positiv TAG-72
ELISA-aktivitet blev udstrakt til plader med 24 brønde, sub-
klonet og udvalgt.

Deponering af cellelinier

Cellelinie Ch44-Fab (ATCC HB 10228), Ch44-F(ab')₂ (ATCC HB 10429) og Ch44-CH3- (ATCC HB 10430) blev deponeret ved the
5 American Type Culture Collection (ATCC) den 18. april, 1990.

Forkortelser

10 bp = basepar
gpt = guanosinphosphoribosyltransferase
Hv = tung kæde variabel region (også Vh)
kb = kilobasepar
Mr = molekylvægt (også molec. wt.)
15 neo = neomycinphosphotransferase
nt = nukleotid
oligo = oligonukleotid
TAG-72 = tumorassocieret glycoprotein-72

20 Referencer

- 25 Dunnick, *et al.* (1980), "A mouse immunoglobulin heavy chain deletion mutant: isolation of a cDNA clone and sequence analysis of the mRNA", Nucl. Acids. Res., 8:1475-1484.
- Ellison *et al.* (1980), "The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C-gamma-1 gene", Nucl. Acid Res, 10:4071-4079.
- 30 Ho, *et al.* (1989), "Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction", Gene, 77:51-59.
- 35 Horton, *et al.* (1989), "Engineering Hybrid Genes without the use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension", Gene, 77:61-68.

Kabat, *et al.* (1987), "Sequences of Proteins of Immunological Interest (4th. edition)", U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health.

5

Krawinkel *et al.* (1982), "Comparison of the hinge-coding segments in human immunoglobulin gamma heavy genes and the linkage of the gamma 2 and gamma 4 subclass genes", EMBO J, 1:403-407

10

Maniatis *et al.* (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.

Mulligan & Berg (1981), "Selection for animal cells that express the E. coli gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyl transferase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072-2076.

15

Saiki *et al.* (1988), "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", Science, 239:487-491",

20

Shulman *et al.* (1978), "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies", Nature, 276:269-270.

25

Takahashi *et al.* (1982), "Structure of human immunoglobulin gamma genes: Implications for evolution of a gene family", Cell, 29:671-679.

3a

3a

30

Forklaring til tegningen

I fig. 41 er vist et diagram af antistoffer med afkortede tunge kæder.

35

i fig. 41a) er vist CH3-minus- og F(ab')₂-molekyler hidrørende fra humant IgG1 og Fab-molekylet hidrørende fra humant IgG3;

i fig. 41b) er vist Hv-molekylet hidrørende fra den tunge kæde-variable region vist alene eller sammen med den lette kæde i enten en hypotetisk dimer eller tetramer form. Fuldstørrelses-afpasset IgG1 er vist i tro målestoksforhold;

5

i fig. 42 a) er vist et diagram af SOE-teknikken, hvoraf fremgår logrende haler og de komplementære overlap, der er vist som en mørk kasse;

10

i fig. 42b) er vist et diagram af den humane tunge kæde-konstante region og oligonukleotidprimerne (med logrende haler), der anvendes til dannelse af DNA-fragmenterne a-x, y-b1, y-b2 og y-b3;

15

i fig. 42c) er vist et diagram af CC49 tung kæde-variable region og oligonukleotidprimerne (med logrende haler), der anvendes til dannelse af y-b0 fragmentet til Hv-genkonstruktionen.

20

Den foreliggende opfindelse skal ikke begrænses i omfang ved de deponerede cellelinier, da de deponerede udførelsesformer er ment som en enkelt illustration af et aspekt af opfindelsen og fordi alle cellelinier, som er funktionelt ækvivalente, er inden for opfindelsens omfang. Selvom opfindelsen er blevet beskrevet detaljeret og med henvisning til specifikke udførelsesformer derfor, vil det således være indlysende for en fagmand inden for området, at der kan foretages ændringer og modifikationer deraf uden at afvige fra ånden og omfanget af de ledsagende krav.

25

30

35

P A T E N T K R A V

1. Antistof frembragt af en af cellelinierne CH44-1 (ATCC HB 9884), CH44-2 (ATCC HB 9880), CH44-4 (ATCC HB 9877), CH 88-1 (ATCC HB 9882), CH 88-2 (ATCC HB 9881), CH 88-3 (ATCC HB 9876), CH 88-4 (ATCC HB 9874), CH 84-1 (ATCC HB 9883), CH 84-2 (ATCC HB 9879), CH 84-3 (ATCC HB 9878) eller CH 84-4 (ATCC HB 9875) eller et fragment deraf, der er i stand til selektivt at reagere med et særligt antigen eller en særlig antigenfamilie.
2. Antistof- eller antistoffragmentkonjugat omfattende et antistof eller et antistoffragment ifølge krav 1 konjugeret til en billeddannelsesmarkør.
3. Antistof- eller antistoffragmentkonjugat ifølge krav 2, hvor billeddannelsesmarkøren er ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{105}Rh , ^{153}Sm , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re eller $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
4. Antistof- eller antistoffragmentkonjugat omfattende antistoffet eller antistoffragmentet ifølge krav 1 konjugeret til et terapeutisk middel.
5. Antistof- eller antistoffragmentkonjugat ifølge krav 4, hvor det terapeutiske middel er et radionuklid, lægemiddel eller biologisk reaktionsmodifikationsmiddel, toksin eller et andet antistof.
6. Antistof- eller antistoffragmentkonjugat ifølge krav 5, hvor radionuklidet er ^{131}I , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{67}Sc , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{67}Ga , ^{125}I , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{153}Sm , ^{123}I eller ^{111}In .
7. Antistof- eller antistoffragmentkonjugat ifølge krav 5, hvor lægemidlet eller det biologiske reaktionsmodifikationsmiddel er methotrexat, adriamycin eller lymphokin.

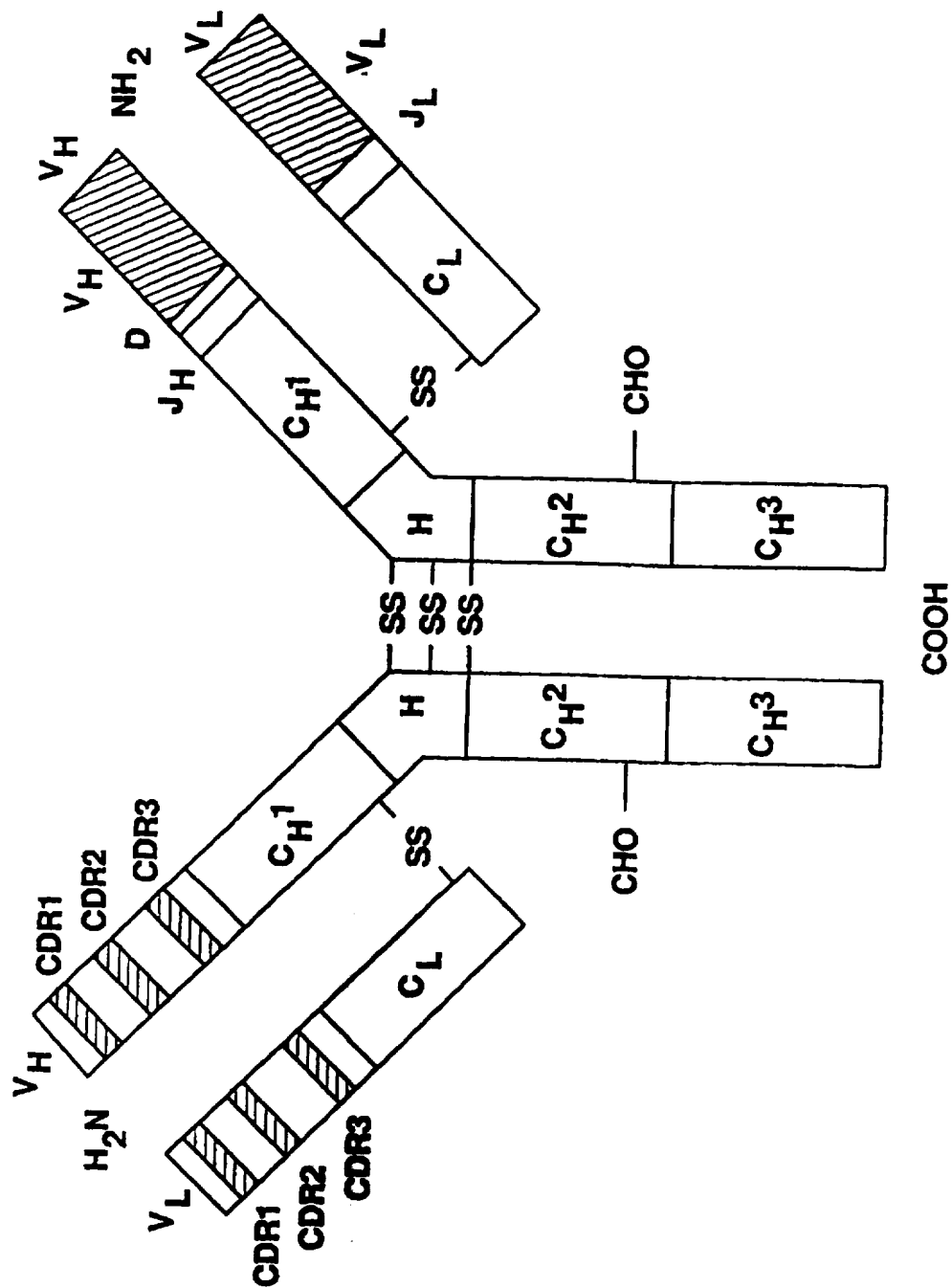
8. DNA-sekvens som i det mindste koder for en del af et antistof, der er i stand til selektivt at reagere med et særligt antigen eller en særlig antigenfamilie, og som er indeholdt i en af cellelinierne CH44-1 (ATCC HB 9884), CH44-2 (ATCC HB 9880), CH44-4 (ATCC HB 9877), CH 88-1 (ATCC HB 9882), CH 88-2 (ATCC HB 9881),
- 5 CH 88-3 (ATCC HB 9876), CH 88-4 (ATCC HB 9874), CH 84-1 (ATCC HB 9883), CH 84-2 (ATCC HB 9879), CH 84-3 (ATCC HB 9878) eller CH 84-4 (ATCC HB 9875).
9. DNA-sekvens ifølge krav 8, hvor sekvensen koder for mindst en del af et C_H -gen, der koder for IgG_{1-4} , IgM, IgA, IgD eller IgE.
- 10 10. Biologisk funktionel ekspressionsvehikel indeholdende DNA-sekvensen ifølge et hvilket som helst af kravene 8 eller 9.
11. Celle transformeret med det biologisk funktionelle ekspressionsvehikel ifølge krav 10.
12. Celle, der frembringer et antistof, som produceret af en af cellelinierne CH44-1
- 15 (ATCC HB 9884), CH44-2 (ATCC HB 9880), CH44-4 (ATCC HB 9877), CH 88-1 (ATCC HB 9882), CH 88-2 (ATCC HB 9881), CH 88-3 (ATCC HB 9876), CH 88-4 (ATCC HB 9874), CH 84-1 (ATCC HB 9883), CH 84-2 (ATCC HB 9879), CH 84-3 (ATCC HB 9878) eller CH 84-4 (ATCC HB 9875).
13. Middel omfattende antistoffet eller antistoffragmentet ifølge krav 1 i en farmaceutisk
- 20 acceptabel, ikke-toksisk, steril bærer.
14. Middel omfattende antistof- eller antistoffragmentkonjugatet ifølge et hvilket som helst af kravene 2 til 7 i en farmaceutisk acceptabel, ikke-toksisk, steril bærer.

15. Fremgangsmåde til fremstilling af et antistof- eller antistoffragmentkonjugat omfattende, at antistof eller antistoffragment ifølge krav 1 bringes i kontakt med en billeddannelsesmarkør eller et terapeutisk middel.

16. Fremgangsmåde til fremstilling af et rekombinant ekspressionsvehikel omfattende, at en DNA-sekvens ifølge et hvilket som helst af kravene 8 eller 9 indsættes i et ekspressionsvehikel.

17. Fremgangsmåde til fremstilling af en transformeret vært omfattende, at ekspressionsvehiklet ifølge krav 10 indsættes i en egnet vært.

FIG.1



```

VHQTAG          -290
CC49            CCTTCTCTTCCTCCACCACCAAATCCACCAATTTGTAAATCAAC
CC83            .....

VHQTAG          -205
CC49            ATGTTAAACATATCACAGAGTGGAGCAACAGAAATCAGGGCAAAAATATGCTGAGAGATTTATCCCTGTCGTTACAAACCAAGCATC
CC83            .....T.....

VHQTAG          -120
CC49            TGTCTAGAAATTCATAAAAACCTTTATGGGATACATTTCCCTCAGAGAGGAATAGGATTTGGACCCTGACCGATCCTGCTGCCCGAGCCCA
CC83            .....

VHQTAG          -35
CC49            TGTGATGACAGTTCCTCTCCAGTTGAACCTAGGTCCTTATCTAAGAAAATGCACCTGCTCATGAATATGCAAAATCA1CCCCGAGTCTATG
CC83            .....

VHQTAG          52
CC46            GCAGTAAATACAGAGATGTTTCATACCATAAAAACAATATATGATCAGTGTCTTCTCCGCTATCCTCTGGACACACTGACTCTAACC
CC49            .....G.....
CC83            .....
CC92            .....

VHQTAG          121
CC46            ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTT CTG TCA GTA ACT ACA G GTAAGGGGGCTCACCATTTCCTCAAA
CC49            .....
CC83            .....
CC92            .....

```

FIG.2

FIG.4A

(Nucleotidsekvens af CC - 49 VL)

1	CC	ATC	CAC	TCT	CAC	ACA	CAC	TGC	CCA	GGC	ATT	TGC	TTT	TGT	ATT	TGC	47
48	TGG	CTG	ATA	TGC	CCC	GAC	CCC	TCC	AGC	CTA	ACC	CAG	CTG	CTC	AGA	ATT	95
96	TAT	AAA	GAT	GTA	ACT	GAG	GAG	CAG	CAT	CAG	ACA	GGC	AGG	GGG	AGC	AAG	143
144	ATG	GAT	TCA	CAG	GCC	CAG	GTT	CTT	ATG	TTA	CTG	CTG	CTA	TGG	GTA	TCT	191
192	GGT	GAG	AAA	TTT	AAA	AGT	ATT	ATC	ATT	TCA	GAG	TTA	CAC	CTT	TTT	ATA	239
240	TAA	GAA	ATT	TAT	ACT	TTG	TGC	AAG	TGT	GTA	ATA	TTA	CTT	CCA	TAA	TAA	287
288	CTC	TGA	CAA	TAT	GAC	ATT	ACA	AAG	ACC	TTT	GAC	AAA	TTT	CAA	CTG	TTA	335
336	TAA	TAA	TCT	ATT	TGT	GTA	TGT	ATT	CAT	GTT	CAC	TTT	CTA	CTT	ATT	TCA	383
384	GGT	ACC	TGT	GGG	GAC	ATT	GTG	ATG	TCA	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTA	CCT	431
432	GTG	TCA	GTT	GGC	GAG	AAG	GTT	ACT	TTG	AGC	TGC	AAG	TCC	AGT	CAG	AGC	479
480	CTT	TTA	TAT	AGT	GGT	AAT	CAA	AAG	AAC	TAC	TTG	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	527
528	AAA	CCA	GGG	CAG	TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATT	TAC	TGG	GCA	TCC	GCT	AGG	575
576	GAA	TCT	GGG	GTC	CCT	GAT	CGC	TTT	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GAT	623
624	TTC	ACT	CTC	TCC	ATC	AGC	AGT	GTG	AAG	ACT	GAA	GAC	CTG	GCA	GTT	TAT	671
672	TAC	TGT	CAG	CAG	TAT	TAT	AGC	TAT	CCC	CTC	ACG	TTT	GGT	GCT	GGG	ACC	719
720	AAG	CTG	GTG	CTG	AAA	CGT	AAG	TAC	ACT	TTT	CTC	ATC	TTT	TTT	TAT	GTG	767
768	TAA	GAC	ACA	GGT	TTT	CAT	GTT	AGG	AGT	T							

De understregede segmenter viser de dele, som er bekræftet ved mRNA - sekvensbestemmelse.

FIG.4B

(Aminosyresekvens af CC - 49 V_L)

VAL	SER	GLY	ASP	SER	GLN	ALA	GLN	VAL	LEU	MET	LEU	LEU	LEU	LEU	LEU	TRP
PRO	<u>VAL</u>	<u>SER</u>	CYS	GLY	// <u>ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>VAL</u>	<u>MET</u>	<u>SER</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>
LEU	LEU	<u>TYR</u>	<u>GLY</u>	<u>GLU</u>	<u>LYS</u>	<u>VAL</u>	<u>THR</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>	<u>CYS</u>	<u>LYS</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>SER</u>
PRO	GLY	TYR	GLY	ASN	GLN	LYS	ASN	TYR	LEU	ALA	TRP	TYR	GLN	GLN	LYS	LYS
GLY	VAL	PRO	ARG	PHE	THR	LEU	ILE	TYR	TRP	ALA	SER	ALA	ARG	GLU	SER	SER
SER	ILE	SER	VAL	LYS	THR	GLU	ASP	LEU	ALA	VAL	THR	ASP	PHE	THR	LEU	LEU
TYR	TYR	SER	PRO	LEU	THR	PHE	GLY	ALA	GLY	THR	LYS	LEU	VAL	LEU	LYS	LYS

"/" angiver afslutningen af V - segmentet og begyndelsen af J5 - segmentet.

"/" angiver afslutningen af ledersekvensen og begyndelsen af det fuldtudviklede protein.

Aminosyresekvensbestemmelse for de første 24 aminosyrer af det fuldtudviklede CC49 VL er understreget.

FIG.5A

(Nucleotidsekvens af CC - 83 VL)

1	CCT	AGA	GGC	CAG	CAC	AGC	TGC	CCA	TGA	TPT	ATA	AAC	CAG	GTC	TTT	GCA	48
49	GTG	AGA	TCT	CAA	ATA	CAT	CAG	ACC	AGC	ATG	GGC	ATC	AAG	ATG	GAG	ACA	96
97	<u>CAT</u>	<u>TCT</u>	<u>CAG</u>	<u>GTC</u>	<u>TTT</u>	<u>GTA</u>	<u>TAC</u>	<u>ATG</u>	<u>TTG</u>	<u>CTG</u>	<u>TGG</u>	<u>TTG</u>	<u>TCT</u>	<u>GGT</u>	<u>GAG</u>	<u>A</u>	142
143	CAT	TTA	AAA	GTA	TTA	TAA	AAT	CIT	AAA	AGT	AAT	CTA	TTT	AAA	TAG	CTT	190
191	TTT	CCT	ATA	GGA	AGC	CAA	TAT	TAG	GCA	GAC	AAT	GCC	ATT	AGA	TAA	GAC	238
239	ATT	TTG	GAT	TCT	AAC	ATT	TGT	ATC	TTG	AAG	TCT	TTA	TAT	GTC	TGA	GTT	286
287	TAT	ACA	CAT	TAT	CTG	TTT	CTG	TTT	GCA	GGT	GTT	GAA	GGA	GAC	ATT	GTG	334
335	ATG	ACC	CAG	TCT	CAC	AAA	TTC	ATG	TCC	GCA	TCA	GTG	GGA	GAC	AGG	GTC	382
383	AAC	ATC	ACC	TGC	AAG	GCC	AGT	CAG	TAT	GTG	GCT	ACT	GCT	GTA	GCC	TGG	430
431	TTT	CAG	CAT	AAA	CCA	GGT	CAG	TCT	CCT	AAA	CTA	CTG	ATT	TAC	GGG	GCA	478
479	TCC	ACC	CGG	CAC	ACT	GGA	GTC	CCT	GAT	CGC	TTC	ACA	GGC	AGT	GGA	TCT	526
527	GGG	ACA	GAT	TTC	ACT	CTC	ATC	ATT	AGC	AAT	GTG	CAG	TCT	GAG	GAC	TTG	574
575	GCA	GAT	TAT	TTG	TGT	CAG	CAT	TAT	AGC	GGC	TAT	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	622
623	TCG	GGG	ACA	AAG	TTG	GAA	ATA	AAA	CGT	AAG	TAG	ACT	TTT	GCT	CAT	TTA	670
671	CTT	GTG	ACG	TTT	TGG												

De understregede segmenter viser de dele, som er bekræftet ved mRNA - sekvensbestemmelse.

FIG.5B

(Aminosyresekvens af CC - 83 V_L)

<u>MET</u>	<u>GLY</u>	<u>ILE</u>	<u>LYS</u>	<u>MET</u>	<u>GLU</u>	<u>THR</u>	<u>HIS</u>	<u>SER</u>	<u>GLN</u>	<u>VAL</u>	<u>PHE</u>	<u>VAL</u>	<u>TYR</u>	<u>MET</u>	<u>LEU</u>	<u>LEU</u>
<u>TRP</u>	<u>LEU</u>	<u>SER</u>	<u>GLY</u>	<u>VAL</u>	<u>GLU</u>	<u>GLY</u>	<u>// ASP</u>	<u>ILE</u>	<u>VAL</u>	<u>MET</u>	<u>THR</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>HIS</u>	<u>LYS</u>	<u>PHE</u>
<u>MET</u>	<u>SER</u>	<u>ALA</u>	<u>SER</u>	<u>VAL</u>	<u>GLY</u>	<u>ASP</u>	<u>ARG</u>	<u>VAL</u>	<u>ASN</u>	<u>ILE</u>	<u>THR</u>	<u>CYS</u>	<u>LYS</u>	<u>ALA</u>	<u>SER</u>	<u>GLN</u>
<u>TYR</u>	<u>VAL</u>	<u>ALA</u>	<u>THR</u>	<u>ALA</u>	<u>VAL</u>	<u>ALA</u>	<u>TRP</u>	<u>PHE</u>	<u>GLN</u>	<u>HIS</u>	<u>LYS</u>	<u>PRO</u>	<u>GLY</u>	<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>PRO</u>
<u>LYS</u>	<u>LEU</u>	<u>LEU</u>	<u>ILE</u>	<u>TYR</u>	<u>GLY</u>	<u>ALA</u>	<u>SER</u>	<u>THR</u>	<u>ARG</u>	<u>HIS</u>	<u>THR</u>	<u>GLY</u>	<u>VAL</u>	<u>PRO</u>	<u>ASP</u>	<u>ARG</u>
<u>PHE</u>	<u>THR</u>	<u>GLY</u>	<u>SER</u>	<u>GLY</u>	<u>SER</u>	<u>GLY</u>	<u>THR</u>	<u>ASP</u>	<u>PHE</u>	<u>THR</u>	<u>LEU</u>	<u>ILE</u>	<u>ILE</u>	<u>SER</u>	<u>ASN</u>	<u>VAL</u>
<u>GLN</u>	<u>SER</u>	<u>GLU</u>	<u>ASP</u>	<u>LEU</u>	<u>ALA</u>	<u>ASP</u>	<u>TYR</u>	<u>LEU</u>	<u>CYS</u>	<u>GLN</u>	<u>HIS</u>	<u>TYR</u>	<u>SER</u>	<u>GLY</u>	<u>TYR</u>	<u>PRO</u>
<u>PHE</u>	<u>THR</u>	<u>PHE</u>	<u>GLY</u>	<u>SER</u>	<u>GLY</u>	<u>THR</u>	<u>LYS</u>	<u>LEU</u>	<u>GLU</u>	<u>ILE</u>	<u>LYS</u>					

"/" angiver afslutningen af V - segmentet og begyndelsen af J4 - segmentet.

"/" angiver afslutningen af ledersekvensen og begyndelsen af det fuldt udviklede protein.

*ASN20 er ikke bestemt. Den forekommer i consensussekvensen ASN - X - SER / Thr, hvor N - glyco - syring er sandsynlig. Aminosyresekvensbestemmelsen for de første 51 aminosyrer af det fuldt udviklede CC83 V_L, er understreget

FIG.6A

CC-92 let kædes variable regionsekvens

GAGTCACAGATCCAGGTCCTTTGTATTTCGTTCTCTGGTTGTCTGGTGTGACGGAGA
CATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAAGCA
T
CACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTAGTGCTGTAGGGTGGTTTCAACAGAAACCA
GG
ACAAATCCTAAATTAATGATTTATTCGGCATCCFACCGGTATACTGGAGTCCCTGATCG
CTTCACTGGCAGTGGATCTCGGACGGATTCACCTTTCACCAATCACAGTGTGCAGGCTGA
AGACCTGGCAGTTTATTACTGTGAGCAACATATATAGTAGTCCGCTCACGTTCCGGTGTGG
GACCAAGCTGGAGCTGAAAC

FIG.6B

Aminosyresekvens af CC92 let kædes variable region

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

FIG.7

Muse Ig - kappa - kimlinie - J - C - region, J1 til J5

AAGCTTTCGCCTACCCACTGCTCTGTTCCCTCTTCAGTGAGGAGGGTTTTGTACAGCCAG
 ACAGTGGAGTACTACCACTGTGGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
 AC
 GTAAGTAGAATCCAAAGTCTCTTTCTTCCGTTGTCTATGTCTGTGGCTTCTATGTCTAAA
 AATGATGTATAAAATCTTACTCTGAAACCAGATTCTGGCACTCTCCAAGGCAAAGATAC
 A
 GAGTAACTCCGTAAGCAAAGCTGGGAATAGGCTAGACATGTTCTCTGGAGAATGAATG
 CC
 AGTGTAAATAATTAACACAAGTGATAGTTTCAGAAATGCTCAAAGAAGCAGGGTAGCCT
 GC
 CCTAGACAAACCTTTACTCGGTGCTCAGACCATGCTCAGTTTTTGTATGGGGGTTGAGTG
 AAGGGACACCAGTGTGTGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGT
 AAG
 TAGTCTTCTCAACTCTTGTTCACTAAGTCTAACCTTGTTAAGTTGTTCTTTGTTGTGTGT
 TTTTCTTAAGGAGATTTACAGGGATTTAGCAAATTCATTCTCAGATCAGGTGTTAAGGAG
 GGAAAACGTGCCACAAGAGGTTGGAATGATTTTCAGGCTAAATTTTAGGCTTTCTAAA
 C
 CAAAGTAACTAACTAGGGGAAGAGGGATAATTGTCTACCTAGGGAGGGTTTTGTGGA
 GG
 TAAAGTTAAAATAAATCACTGTAAATCACATTCAGTGATGGGACCAGACTGGAAATAA
 AA
 CCTAAGTACATTTTTGCTCAACTGCTTGTGAAGTTTTGGTCCCATTGTGTCCTTTGTATG
 AGTTTGTGGTGTACATTAGATAAATGAACTATTCTTGTAAACCCAAAACCTAAATAGAA
 G
 AGAACCAAAAATCTAGCTACTGTACAAGCTGAGCAAACAGACTGACCTCATGTCAGATT
 T
 GTGGGAGAAATGAGAAAGGAACAGTTTTTCTCTGAACTTAGCCTATCTAACTGGATCGC
 C
 TCAGGCAGGTTTTTGTAAAGGGGGCGCAGTGATATGAATCACTGTGATTCACGTTCCGG
 C
 TCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTAAGTAGACTTTTGCTCATTTACTTGTGACGTT
 T
 TGGTCTGTTTGGGTAACCTTGTGTGAATTTGTGACATTTTGGCTAAATGAGCCATTCCTG
 GCAACCTGTGCATCAATAGAAGATCCCCAGAAAAGAGTCAGTGTGAAAGCTGAGCGA
 AA
 AACTCGTCTTAGGCTTCTGAGACCAGTTTTGTAAGGGGAATGTAGAAGAAAGAGCTGG
 GC
 TTTTCTCTGAATTTGGCCATCTAGTTGGACTGGCTTCACAGGCAGGTTTTTGTAGAGA
 GGGGCATGTCATAGTCCCTACTGTGGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTG
 A
 AACGTAAGTACACTTTTCTCATCTTTTTTTATGTGTAAGACACAGGTTTTTCATGTTAGGA
 GTTAAAGTCAGTTCAGAAAATCTTGAGAAAATGGAGAGGGCTCATTATCAGTTGACGT
 GG
 CATAAGTGTGAGATTTTCTGTTTATCAAGCTAGTGAGATTAGGGGCAAAAAGAGGCTT
 T
 AGTTGAGAGGAAAGTAATTAATACTATGGTCACCATCCAAGAGATTGGATCGGAGAAT
 AA
 GCATGAGTAGTTATTGAGATCTGGGTCTGACTGCAG*

FIG.8

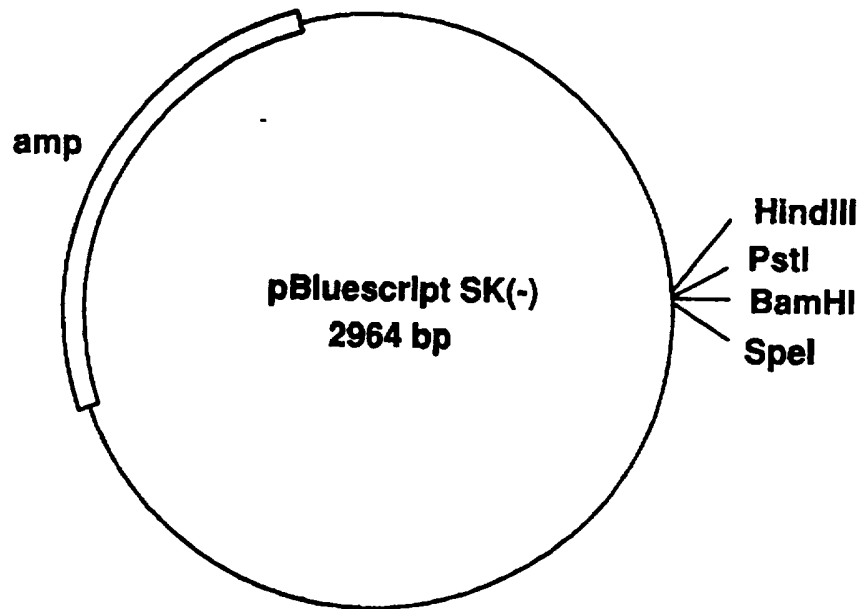


FIG.9

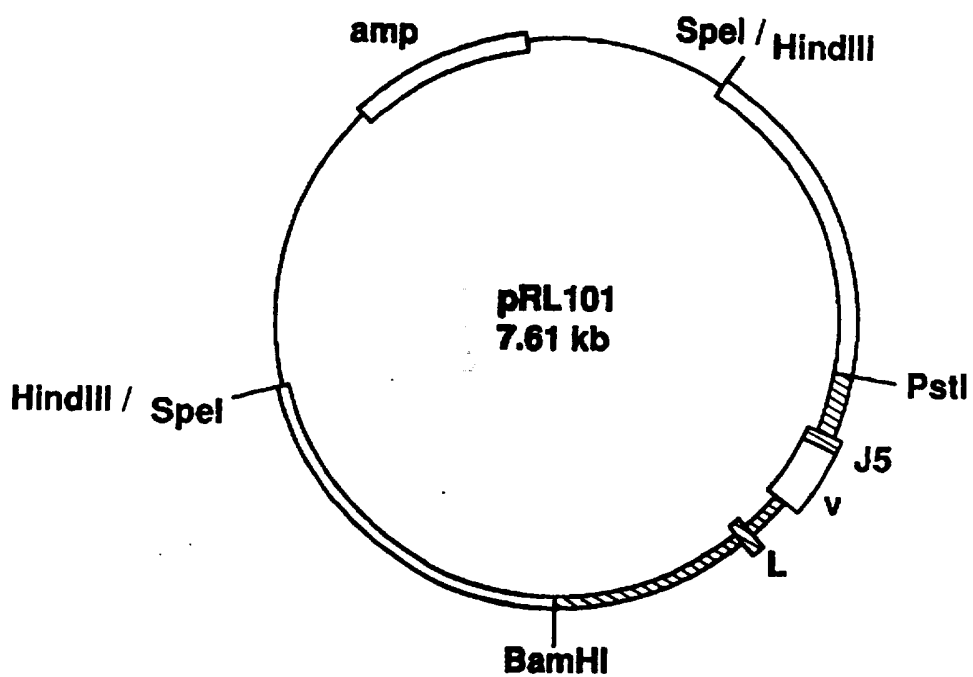
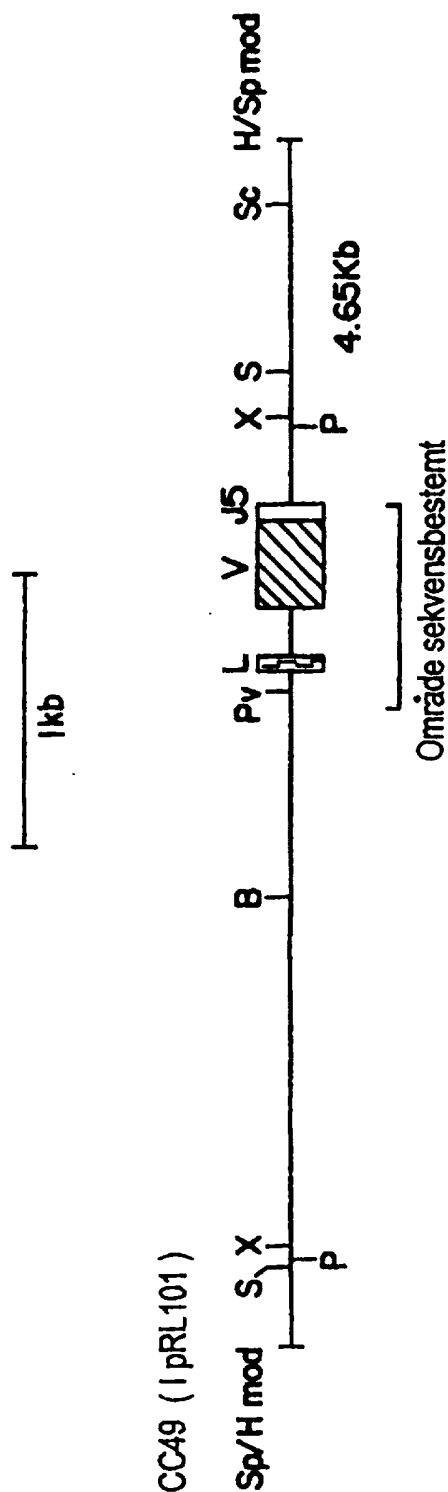


FIG.10



- Nøgle til
 restriktionsenzymmer :
- B - Bam HI
 - Bg - Bgl II
 - C - Cla I
 - E - Eco RI
 - H - Hind III
 - N - Nhe I
 - P - Pst I
 - Pv - Pvu II
 - S - Sac I
 - Sc - Sac II
 - Sp - Spe I
 - St - Stu I
 - X - Xba I
- mod = halv - fyldt ind

FIG.11

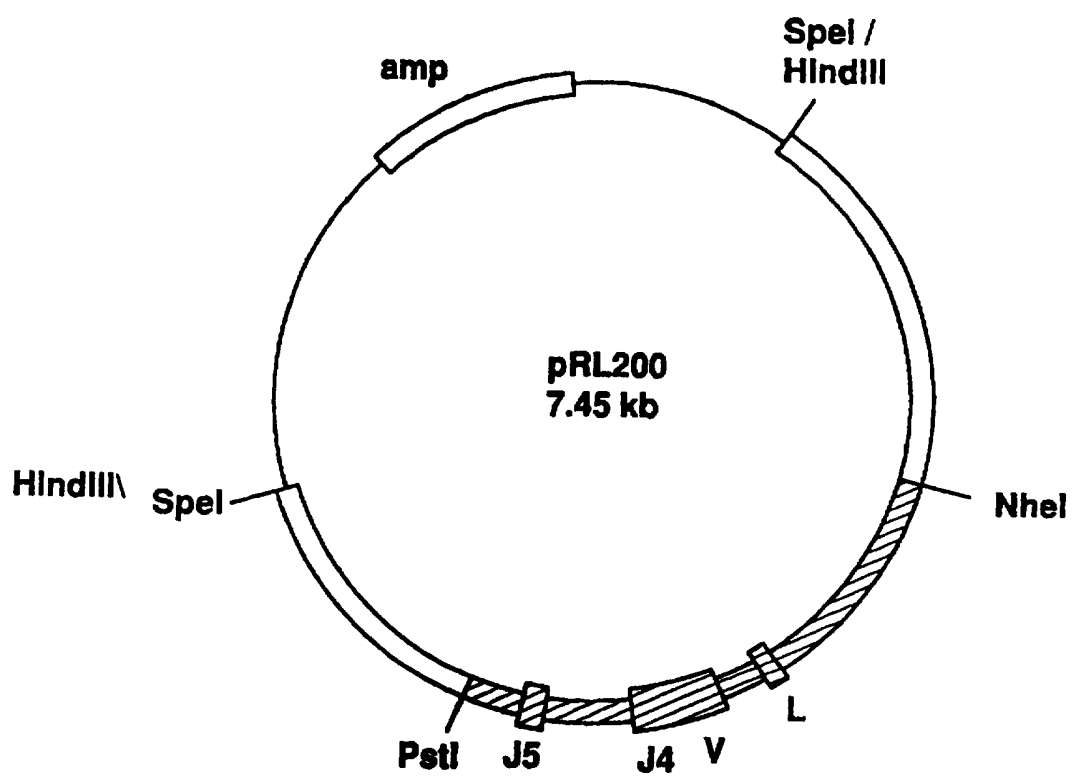
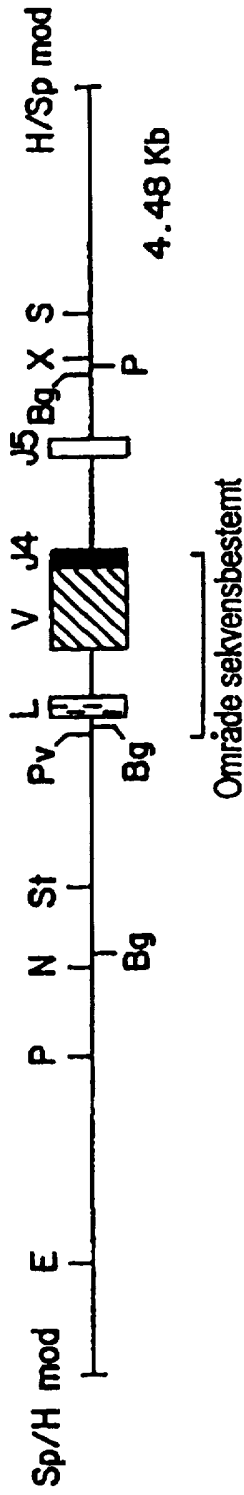


FIG.12

CC83 (1 pRL200)



Nøgle til

restriktionsenzymmer :

- B - Bam HI
- Bg - Bgl II
- C - Cla I
- E - Eco RI
- H - Hind III
- N - Nhe I
- P - Pst I
- Pv - Pvu II
- S - Sac I
- Sc - Sac II
- Sp - Spe I
- St - Stu I
- X - Xba I

mod = halv - fyldt ind

Muse Ig-kimlinie-J-H-gener fra pNP9

GGATCCTGGCCAGCATTGCCGCTAGGTCCCTCTCTTCTATGCTTCTTTGTCCCTCACTG
 GCCTCCATCTGAGATAATCCTGGAGCCCTAGCCAAGGATCATTTATTGTCAGGGGTCTAA
 TCATTGTTGTCACAATGTGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTC
 TCTGCAGGTGAGTCCTAACTTCTCCCATTTCTAAATGCATGTTGGGGGGATTCTGAGCCTT
 CAGGACCAAGATTCTCTGCAAACGGGAATCAAGATTCAACCCCTTTGTCCCAAAGTTGAG
 ACATGGGTCTGGGTGAGGGACTCTCTGCCTGCTGGTCTGTGGTGACATTAGAAGTGAAGT
 ATGATGAAGGATCTGCCAGAAGTGAAGCTTGAAGTCTGAGGCAGAATCTTGTCCAGGGTC
 TATCGGACTCTTGTGAGAATTAGGGGCTGACAGTTGATGGTGACAATTCAGGGTCAGTG
 ACTGTCAGGTTTCTCTGAGGTGAGGCTGGAATATAGGTCACCTTGAAGACTAAAGAGGGG
 TCCAGGGGCTTTTCTGCACAGGCAGGGAACAGAATGTGGAACAATGACTTGAATGGTTGA
 TTCTTGTGTGACACCAAGAATTGGCATAATGTCTGAGTTGCCCAAGGGTGATCTTAGCTA
 GACTCTGGGGTTTTTGTGGGTACAGAGGAAAAACCCACTATTGTGATTACTATGCTATG
 GACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCCAGG
 TCTTTATTTTTAACCTTTGTTATGGAGTTTTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTGGATATT
 TGCCCTGAGGGAGCCGGCTGAGAGAAGTTGGGAAATAAATCTGTCTAGGGATCTCAGAGC
 CTTTAGGACAGATTATCTCCACATCTTTGAAAACTAAGAATCTGTGTGATGGTGTGGT
 GGAGTCCCTGGATGATGGGATAGGGACTTTGGAGGCTCATTTGAGGGAGATGCTAAAACA
 ATCCTATGGCTGGAGGGATAGTTGGGGCTGTAGTTGGAGATTTTCAGTTTTTAGAATGAA
 GTATTAGCTGCAATACTTCAAGGACCACCTCTGTGACAACCATTTTATACAGTATCCAGG
 CATAGGGACAAAAAGTGGAGTGGGGCACTTTCTTTAGATTTGTGAGGAATGTTCCACACT
 AGATTGTTTTAAACTTTCATTTGTTGGAAGGAGCTGTCTTAGTGATTGAGTCAAGGGAGAA
 AGGCATCTAGCCTCGGTCTCAAAGGGTAGTTGCTGTCTAGAGAGGTCTGGTGGAGCCTG
 CAAAAGTCCAGCTTCAAAGGAACACAGAAGTATGTGTATGGAATATTAGAAGATGTTGC
 TTTTACTCTTAAGTTGGTTCCTAGGAAAAATAGTTAAATACTGTGACTTTAAAATGTGAG
 AGGGTTTTCAAGTACTCATTTTTTTAAATGTCCAAAATTTTTGTCAATCAATTTGAGGTC
 TTGTTTGTGTAGAAGTACATTACTTAAAGTTTAAACCGAGGAATGGGAGTGAGGCTCTCT
 CATAACCCTATTCAGAACTGACTTTTAAACAATAATAAATTAAGTTTAAAATATTTTTAAAT
 GAATTGAGCAATGTTGAGTTGAGTCAAGATGGCCGATCAGAACCGGAACACCTGCAGCAG
 CTGGCAGGAAGCAGGTCATGTGGCAAGGCTATTTGGGGAAGGGAAAAAAAACCCTAGG
 TAAACTTGTAGCTGTGGTTTGAAGAAGTGGTTTTGAAACACTCTGTCCAGCCCCACCAA
 CCGAAAGTCCAGGCTGAGCAAAACACCACCTGGGTAAATTTGCATTTCTAAAATAAGTTGA
 GGATTCAGCCGAAACTGGAGAGGTCTCTTTTAACTTATTGAGTTCAACCTTTTAAATTT
 AGCTTGAGTAGTTCTAGTTTCCCAAACCTTAAGTTTATCGACTTCTAAAATGTATTTAGA
 ATTC

FIG. 13

FIG.14

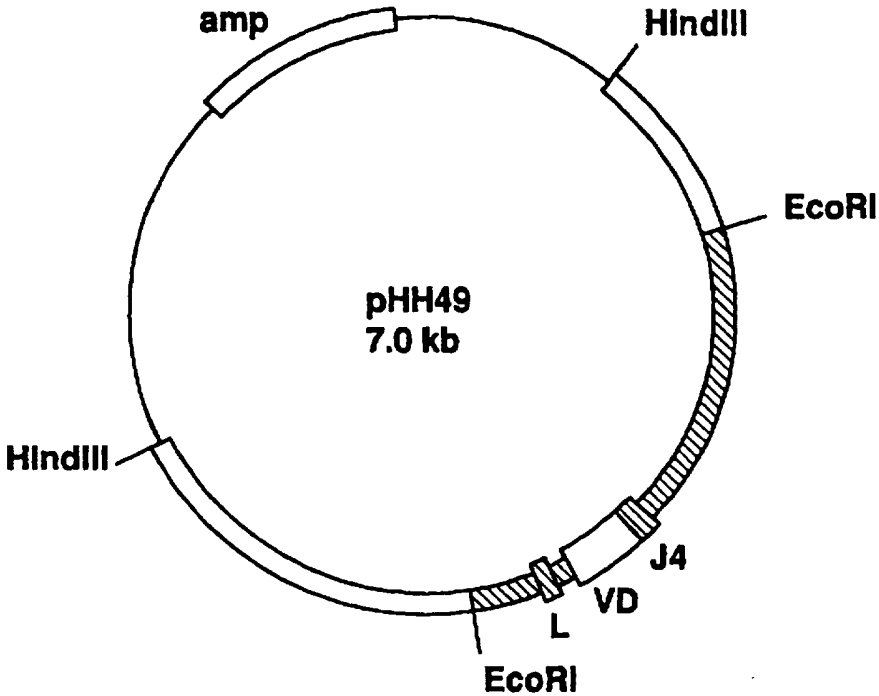


FIG.15

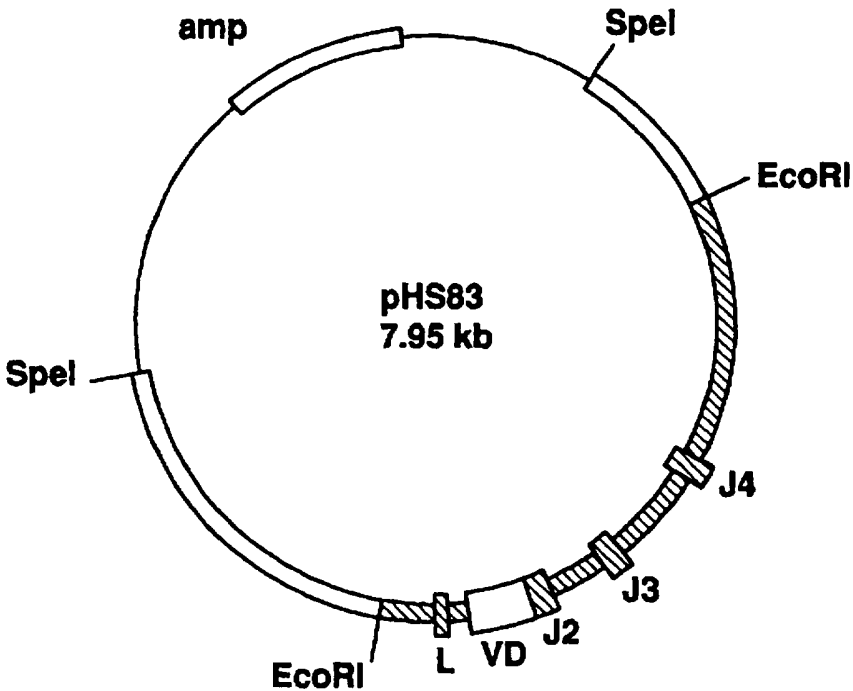


FIG.16

(Nucleotidsekvens af CC - 49 V_H)

239	<u>TTA</u>	<u>ACA</u>	<u>TAT</u>	<u>CAC</u>	<u>AGA</u>	<u>GTG</u>	<u>GAG</u>	<u>CAA</u>	<u>CAG</u>	<u>AAT</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>AAA</u>	<u>AAT</u>	<u>ATG</u>	<u>CTG</u>	<u>ATG</u>	<u>CTG</u>	<u>286</u>
287	<u>AGA</u>	<u>GAT</u>	<u>TTT</u>	<u>TCC</u>	<u>CTG</u>	<u>TCG</u>	<u>TTA</u>	<u>CAA</u>	<u>CCA</u>	<u>AAG</u>	<u>CAT</u>	<u>CTG</u>	<u>TCT</u>	<u>AGA</u>	<u>ATT</u>	<u>CAT</u>	<u>ATT</u>	<u>CAT</u>	<u>334</u>
335	<u>AAA</u>	<u>AAC</u>	<u>TTT</u>	<u>ATG</u>	<u>GGA</u>	<u>TAC</u>	<u>ATT</u>	<u>TCC</u>	<u>TCA</u>	<u>GAG</u>	<u>AGG</u>	<u>AAT</u>	<u>AGG</u>	<u>ATT</u>	<u>TGG</u>	<u>ACC</u>	<u>TGG</u>	<u>ACC</u>	<u>382</u>
383	<u>TGA</u>	<u>GCA</u>	<u>TCC</u>	<u>TGC</u>	<u>TGC</u>	<u>CCG</u>	<u>AGC</u>	<u>CAT</u>	<u>GTG</u>	<u>ATG</u>	<u>ACA</u>	<u>GTT</u>	<u>CTT</u>	<u>CTC</u>	<u>CAG</u>	<u>TTG</u>	<u>CAG</u>	<u>TTG</u>	<u>430</u>
431	<u>AAC</u>	<u>TAG</u>	<u>GTC</u>	<u>CTT</u>	<u>ATC</u>	<u>TAA</u>	<u>GAA</u>	<u>ATG</u>	<u>CAC</u>	<u>TGC</u>	<u>TCA</u>	<u>TGA</u>	<u>TAT</u>	<u>GCA</u>	<u>AAT</u>	<u>CAC</u>	<u>AAT</u>	<u>CAC</u>	<u>478</u>
479	<u>CCG</u>	<u>AGT</u>	<u>CTA</u>	<u>TGG</u>	<u>CAG</u>	<u>TAA</u>	<u>ATA</u>	<u>CAG</u>	<u>AGA</u>	<u>TGT</u>	<u>TCA</u>	<u>TAC</u>	<u>CAT</u>	<u>AAA</u>	<u>AAC</u>	<u>AAT</u>	<u>AAC</u>	<u>AAT</u>	<u>526</u>
527	<u>ATG</u>	<u>TGA</u>	<u>TCA</u>	<u>GTG</u>	<u>TCT</u>	<u>TCT</u>	<u>CCG</u>	<u>CTA</u>	<u>TCC</u>	<u>CTG</u>	<u>GAC</u>	<u>ACA</u>	<u>CTG</u>	<u>ACT</u>	<u>CTA</u>	<u>ACC</u>	<u>CTA</u>	<u>ACC</u>	<u>574</u>
575	<u>ATG</u>	<u>GAA</u>	<u>TGG</u>	<u>AGC</u>	<u>TGG</u>	<u>GTC</u>	<u>TTT</u>	<u>CTC</u>	<u>TTC</u>	<u>TTC</u>	<u>CTG</u>	<u>TCA</u>	<u>GTA</u>	<u>ACT</u>	<u>ACA</u>	<u>GGTA</u>	<u>ACA</u>	<u>GGTA</u>	<u>623</u>
624	<u>AGG</u>	<u>GGC</u>	<u>TCA</u>	<u>CCA</u>	<u>TTT</u>	<u>CCA</u>	<u>AAT</u>	<u>CTA</u>	<u>AAG</u>	<u>TGG</u>	<u>AGT</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>CTG</u>	<u>AGG</u>	<u>TGA</u>	<u>AGG</u>	<u>TGA</u>	<u>671</u>
672	<u>CAA</u>	<u>AGA</u>	<u>TGT</u>	<u>CCA</u>	<u>CTT</u>	<u>TGG</u>	<u>CTG</u>	<u>TCC</u>	<u>ACA</u>	<u>GGT</u>	<u>GTC</u>	<u>CAC</u>	<u>TCC</u>	<u>CAG</u>	<u>GTT</u>	<u>CAG</u>	<u>GTT</u>	<u>CAG</u>	<u>719</u>
720	<u>TTG</u>	<u>CAG</u>	<u>CAG</u>	<u>TCT</u>	<u>GAC</u>	<u>GCT</u>	<u>GAG</u>	<u>TTG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAA</u>	<u>CCT</u>	<u>GGG</u>	<u>GCT</u>	<u>TCA</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	<u>767</u>
768	<u>ATT</u>	<u>TCC</u>	<u>TGC</u>	<u>AAG</u>	<u>GCT</u>	<u>TCT</u>	<u>GGC</u>	<u>TAC</u>	<u>ACC</u>	<u>TTC</u>	<u>ACT</u>	<u>GAC</u>	<u>CAT</u>	<u>GCA</u>	<u>ATT</u>	<u>CAC</u>	<u>ATT</u>	<u>CAC</u>	<u>815</u>
816	<u>TGG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAA</u>	<u>CAG</u>	<u>AAC</u>	<u>CCT</u>	<u>GAA</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>CTG</u>	<u>GAA</u>	<u>TGG</u>	<u>ATT</u>	<u>GGA</u>	<u>TAT</u>	<u>TTT</u>	<u>TAT</u>	<u>TTT</u>	<u>863</u>
864	<u>TCT</u>	<u>CCC</u>	<u>GGA</u>	<u>AAT</u>	<u>GAT</u>	<u>GAT</u>	<u>TTT</u>	<u>AAA</u>	<u>TAC</u>	<u>AAT</u>	<u>GAG</u>	<u>AGG</u>	<u>TTC</u>	<u>AAG</u>	<u>GGC</u>	<u>AAG</u>	<u>GGC</u>	<u>AAG</u>	<u>911</u>
912	<u>GCC</u>	<u>ACA</u>	<u>CTG</u>	<u>ACT</u>	<u>GCA</u>	<u>GAC</u>	<u>AAA</u>	<u>TCC</u>	<u>TCC</u>	<u>AGC</u>	<u>ACT</u>	<u>GCC</u>	<u>TAC</u>	<u>GTG</u>	<u>CAG</u>	<u>CTC</u>	<u>CAG</u>	<u>CTC</u>	<u>959</u>
960	<u>AAC</u>	<u>AGC</u>	<u>CTG</u>	<u>ACA</u>	<u>TCT</u>	<u>GAG</u>	<u>GAT</u>	<u>TCT</u>	<u>GCA</u>	<u>GTG</u>	<u>TAT</u>	<u>TTC</u>	<u>TGT</u>	<u>ACA</u>	<u>AGA</u>	<u>TCC</u>	<u>AGA</u>	<u>TCC</u>	<u>1007</u>
1008	<u>CTG</u>	<u>AAT</u>	<u>ATG</u>	<u>GCC</u>	<u>TAC</u>	<u>TGG</u>	<u>GGT</u>	<u>CAA</u>	<u>GGA</u>	<u>ACC</u>	<u>TCA</u>	<u>GTC</u>	<u>ACC</u>	<u>GTC</u>	<u>TCC</u>	<u>TCAG</u>	<u>TCC</u>	<u>TCAG</u>	<u>1056</u>

De understregede segmenter viser de dele, som blev bekræftet ved mRNA - sekvensbestemmelse.

FIG.17

(Nucleotidsekvens af CC - 83 V_H)

478	<u>TTA</u>	<u>ACA</u>	<u>TAT</u>	<u>CAC</u>	<u>AGA</u>	<u>GTG</u>	<u>GAG</u>	<u>CAA</u>	<u>CAG</u>	<u>AAT</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>AAA</u>	<u>AAT</u>	<u>ATG</u>	<u>ATG</u>	<u>CTG</u>	525
526	<u>AGA</u>	<u>GAT</u>	<u>TTA</u>	<u>TCC</u>	<u>CTG</u>	<u>TCG</u>	<u>TTA</u>	<u>CAA</u>	<u>CCA</u>	<u>AAG</u>	<u>CAT</u>	<u>CTG</u>	<u>TCT</u>	<u>AGA</u>	<u>ATT</u>	<u>CAT</u>	573	
574	<u>AAA</u>	<u>AAC</u>	<u>TTT</u>	<u>ATG</u>	<u>GGA</u>	<u>TAC</u>	<u>ATT</u>	<u>TCC</u>	<u>TCA</u>	<u>GAG</u>	<u>AGG</u>	<u>AAT</u>	<u>AGG</u>	<u>ATT</u>	<u>TGG</u>	<u>ACC</u>	621	
622	<u>TGA</u>	<u>GCA</u>	<u>TCC</u>	<u>TGC</u>	<u>TGC</u>	<u>CCG</u>	<u>AGC</u>	<u>CAT</u>	<u>GTG</u>	<u>ATG</u>	<u>ACA</u>	<u>GTT</u>	<u>CTT</u>	<u>CTC</u>	<u>CAG</u>	<u>TTG</u>	669	
670	<u>AAC</u>	<u>TAG</u>	<u>GTC</u>	<u>CTT</u>	<u>ATC</u>	<u>TAA</u>	<u>GAA</u>	<u>ATG</u>	<u>CAC</u>	<u>TGC</u>	<u>TCA</u>	<u>TGA</u>	<u>TAT</u>	<u>GCA</u>	<u>AAT</u>	<u>CAC</u>	717	
718	<u>CCG</u>	<u>AGT</u>	<u>CTA</u>	<u>TGG</u>	<u>CAG</u>	<u>TAA</u>	<u>ATA</u>	<u>CAG</u>	<u>AGA</u>	<u>TGT</u>	<u>TCA</u>	<u>TAC</u>	<u>CAT</u>	<u>AAA</u>	<u>AAC</u>	<u>AAT</u>	765	
766	<u>ATA</u>	<u>TGA</u>	<u>TCA</u>	<u>GTG</u>	<u>TCT</u>	<u>TCT</u>	<u>CCG</u>	<u>CTA</u>	<u>TCC</u>	<u>CTG</u>	<u>GAC</u>	<u>ACA</u>	<u>CTG</u>	<u>ACT</u>	<u>CTA</u>	<u>ACC</u>	813-	
814	<u>ATG</u>	<u>GAA</u>	<u>TGG</u>	<u>AGC</u>	<u>TGG</u>	<u>GTC</u>	<u>TTT</u>	<u>CTC</u>	<u>TTC</u>	<u>TTC</u>	<u>CTG</u>	<u>TCA</u>	<u>GTA</u>	<u>ACT</u>	<u>ACA</u>	<u>GGTA</u>	862	
863	<u>AGG</u>	<u>GGC</u>	<u>TCA</u>	<u>CCA</u>	<u>TTT</u>	<u>CCA</u>	<u>AAT</u>	<u>CTA</u>	<u>AAG</u>	<u>TGG</u>	<u>AGT</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>CTG</u>	<u>AGG</u>	<u>TGA</u>	910	
911	<u>CAA</u>	<u>AGA</u>	<u>TAT</u>	<u>CCA</u>	<u>CTT</u>	<u>TGG</u>	<u>CTT</u>	<u>TCC</u>	<u>ACA</u>	<u>GGT</u>	<u>GTC</u>	<u>CAC</u>	<u>TCC</u>	<u>CAG</u>	<u>GTT</u>	<u>CAG</u>	958	
959	<u>TTG</u>	<u>CAG</u>	<u>CAG</u>	<u>TCT</u>	<u>GAC</u>	<u>GCT</u>	<u>GAG</u>	<u>TTG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAA</u>	<u>CCT</u>	<u>GGG</u>	<u>GCT</u>	<u>TCA</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	1006	
1007	<u>ATT</u>	<u>TCC</u>	<u>TGC</u>	<u>AAG</u>	<u>GCT</u>	<u>TCT</u>	<u>GGC</u>	<u>TAC</u>	<u>ACC</u>	<u>TTC</u>	<u>ACT</u>	<u>GAC</u>	<u>CAT</u>	<u>GCT</u>	<u>ATT</u>	<u>CAC</u>	1054	
1055	<u>TGG</u>	<u>GTG</u>	<u>AAG</u>	<u>CAG</u>	<u>AAG</u>	<u>CCT</u>	<u>GAA</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>CTG</u>	<u>GAA</u>	<u>TGG</u>	<u>ATT</u>	<u>GGA</u>	<u>TAT</u>	<u>ATT</u>	1102	
1103	<u>TCT</u>	<u>CCC</u>	<u>GGA</u>	<u>AAT</u>	<u>GAT</u>	<u>GAT</u>	<u>ATT</u>	<u>AAG</u>	<u>TAC</u>	<u>AAT</u>	<u>GAG</u>	<u>AAG</u>	<u>TTC</u>	<u>AAG</u>	<u>GGC</u>	<u>AAG</u>	1150	
1151	<u>GCC</u>	<u>ACA</u>	<u>CTG</u>	<u>ACT</u>	<u>GCA</u>	<u>GAC</u>	<u>AAA</u>	<u>TCC</u>	<u>TCC</u>	<u>AGT</u>	<u>ACT</u>	<u>GCC</u>	<u>TAC</u>	<u>ATG</u>	<u>CAA</u>	<u>CTC</u>	1198	
1199	<u>AAC</u>	<u>AGC</u>	<u>CTG</u>	<u>ACA</u>	<u>TCT</u>	<u>GAG</u>	<u>GAT</u>	<u>TCT</u>	<u>GCA</u>	<u>GTG</u>	<u>TAT</u>	<u>TTT</u>	<u>TGT</u>	<u>AGA</u>	<u>AGA</u>	<u>TCC</u>	1246	
1247	<u>TTC</u>	<u>TAC</u>	<u>GGC</u>	<u>AAC</u>	<u>TGG</u>	<u>GGC</u>	<u>CAA</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	<u>CTC</u>	<u>ACA</u>	<u>GTC</u>	<u>TCC</u>	<u>TCA</u>	<u>G</u>		

De understregede segmenter viser delene, som er bekræftet ved mRNA - sekvensbestemmelse.

FIG.18

(AMINOSYRESEKVENNS AF CC-49 V_H)

MET	GLU	TRP	SER	TRP	VAL	PHE	LEU	PHE	PHE	LEU	SER	VAL	THR	THR
GLY	VAL	HIS	SER	/GLN	VAL	GLN	LEU	GLN	GLN	SER	ASP	ALA	GLU	LEU
VAL	LYS	PRO	GLY	ALA	SER	VAL	LYS	ILE	SER	CYS	LYS	ALA	SER	GLY
TYR	THR	PHE	THR	ASP	HIS	ALA	ILE	HIS	TRP	VAL	LYS	GLN	ASN	PRO
GLU	GLN	GLY	LEU	GLU	TRP	ILE	GLY	TYR	PHE	SER	PRO	GLY	ASN	ASP
ASP	PHE	LYS	TYR	ASN	GLU	ARG	PHE	LYS	GLY	LYS	ALA	THR	LEU	THR
ALA	ASP	LYS	SER	SER	SER	THR	ALA	TYR	VAL	GLN	LEU	ASN	SER	LEU
THR	SER	GLU	ASP	SER	ALA	VAL	TYR	PHE	CYS	THR	ARG	SER	LEU	ASN
MET	<u>ALA</u>	<u>TYR</u>	TRP	<u>GLY</u>	<u>GLN</u>	<u>GLY</u>	THR	SER	VAL	THR	VAL	SER	SER	SER

"// " angiver, hvor det fuldt udviklede protein begynder.

De understregede rester blev bestemt ved proteinsekvens. TRP kan ikke fastlægges ved den anvendte metode.

FIG.19

(AMINOSYRESEKVENNS AF CC-83 V_H)

MET	GLU	TRP	SER	TRP	VAL	PHE	LEU	PHE	PHE	LEU	SER	VAL	THR	THR
GLY	VAL	HIS	SER	GLN	VAL	GLN	LEU	GLN	GLN	SER	ASP	ALA	GLU	LEU
VAL	LYS	PRO	GLY	ALA	SER	VAL	LYS	ILE	SER	CYS	LYS	ALA	SER	GLY
TYR	THR	PHE	THR	ASP	HIS	ALA	ILE	HIS	TRP	VAL	LYS	GLN	LYS	PRO
GLU	GLN	GLY	LEU	GLU	TRP	ILE	GLY	TYR	ILE	SER	PRO	GLY	ASN	ASP
ASP	ILE	LYS	TYR	ASN	GLU	LYS	PHE	LYS	GLY	LYS	ALA	THR	LEU	THR
ALA	ASP	LYS	SER	SER	SER	THR	ALA	TYR	MET	<u>GLN</u>	<u>LEU</u>	<u>ASN</u>	<u>SER</u>	<u>LEU</u>
THR	SER	GLU	ASP	SER	ALA	VAL	TYR	PHE	CYS	ARG	ARG	SER	SER	PHE
TYR	GLY	ASN	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	THR	LEU	THR	VAL	SER	SER	SER

"/" angiver, hvor det fuldt udviklede protein begynder.

De understregede rester blev bestemt ved proteinsekvens.

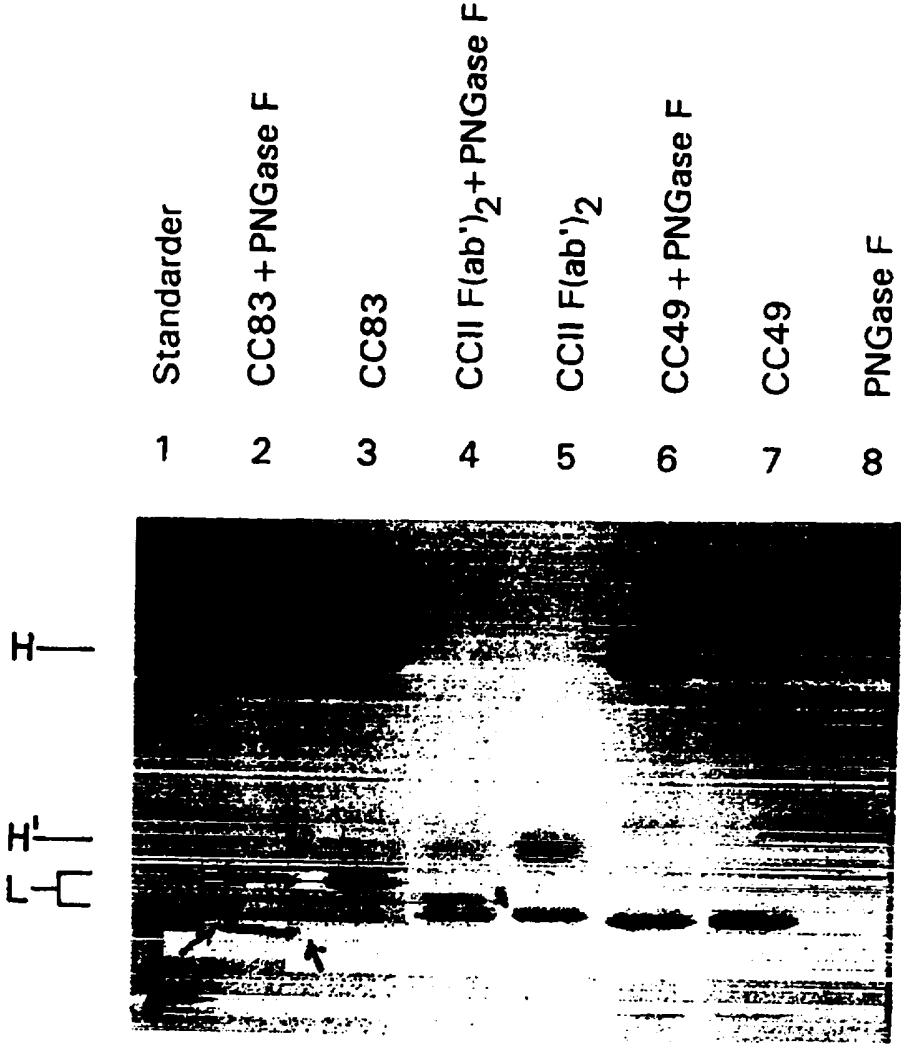


FIG. 20

FIG.21

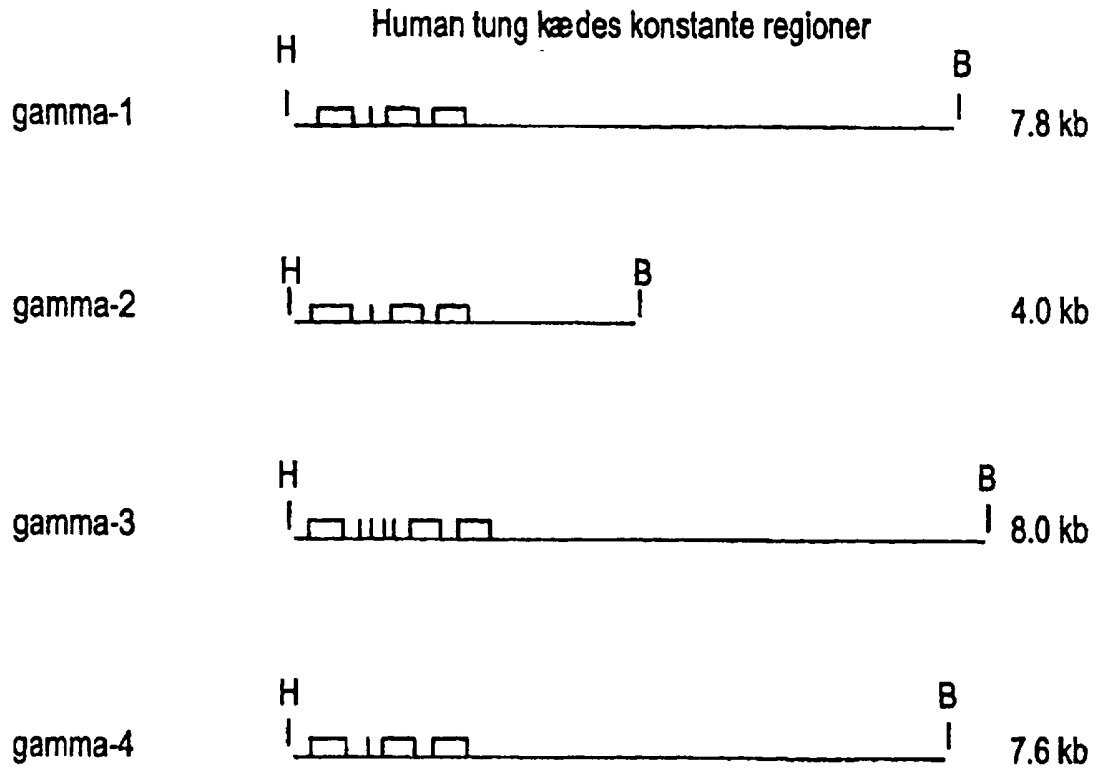


FIG.22

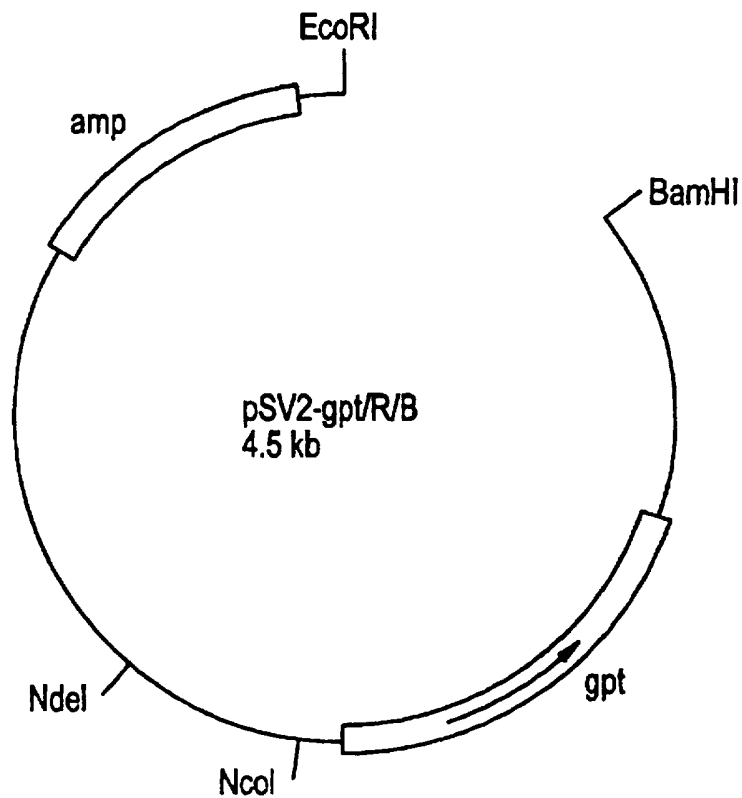


FIG.23

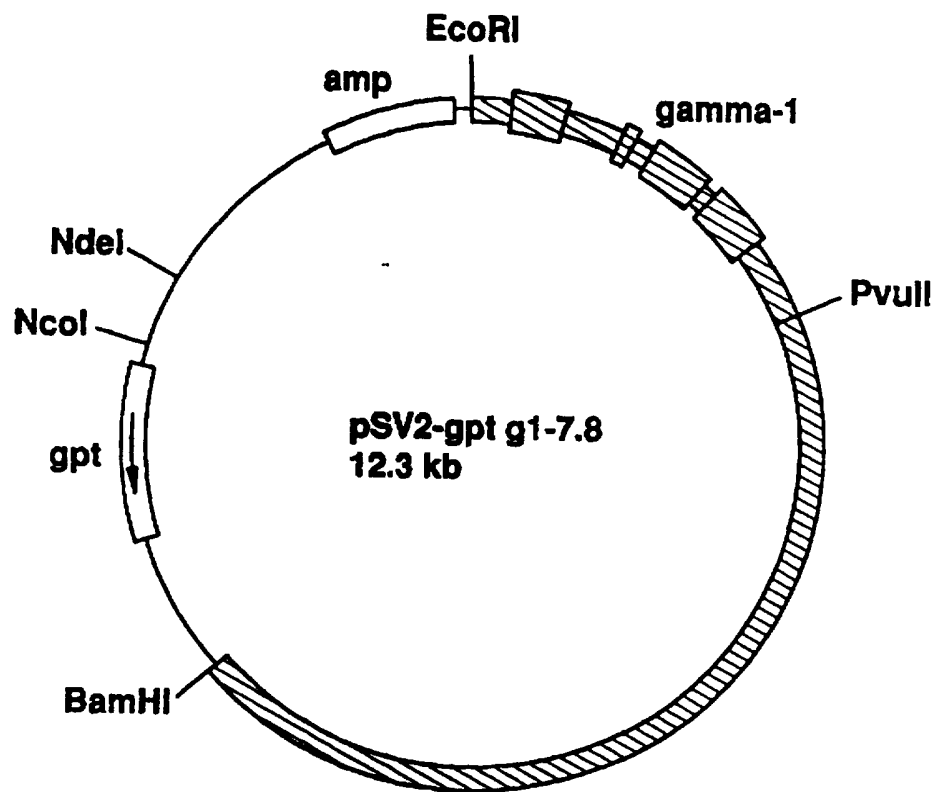


FIG.24

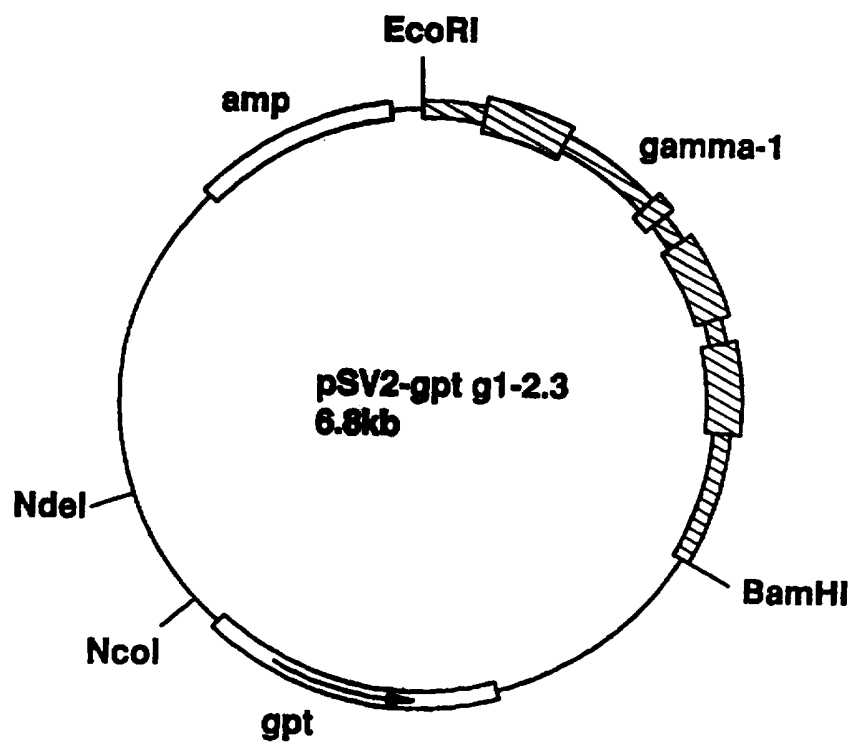


FIG.25

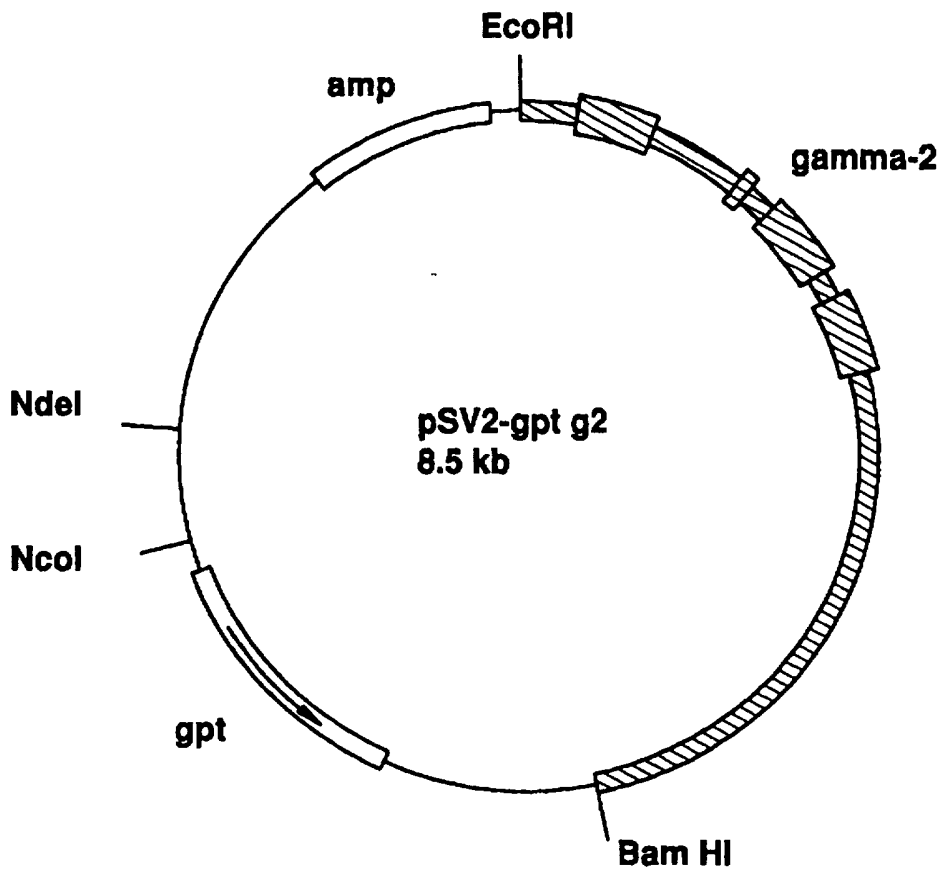


FIG.26

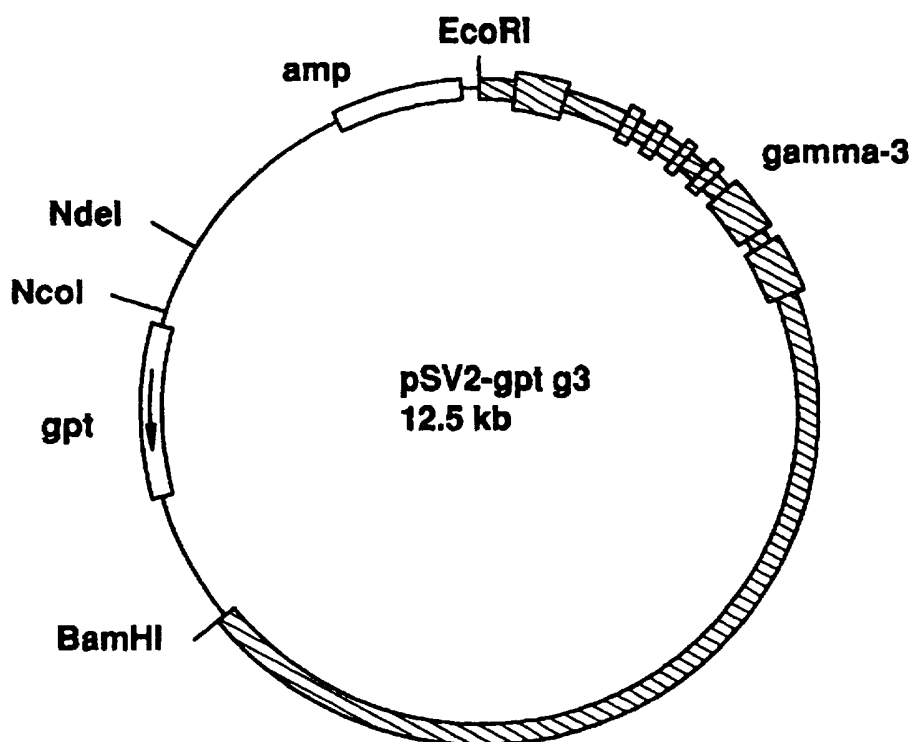


FIG.27

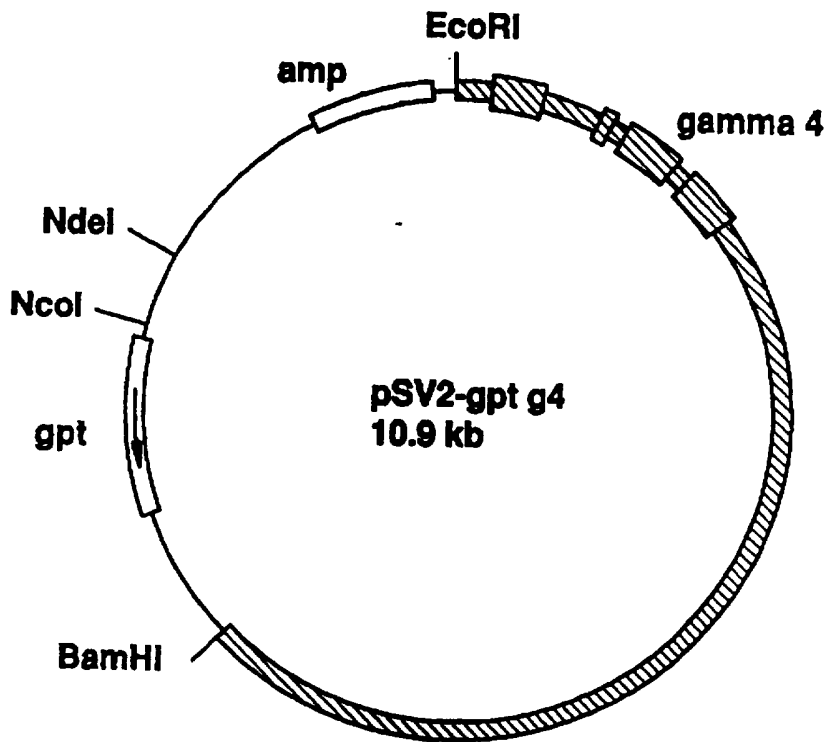


FIG.28

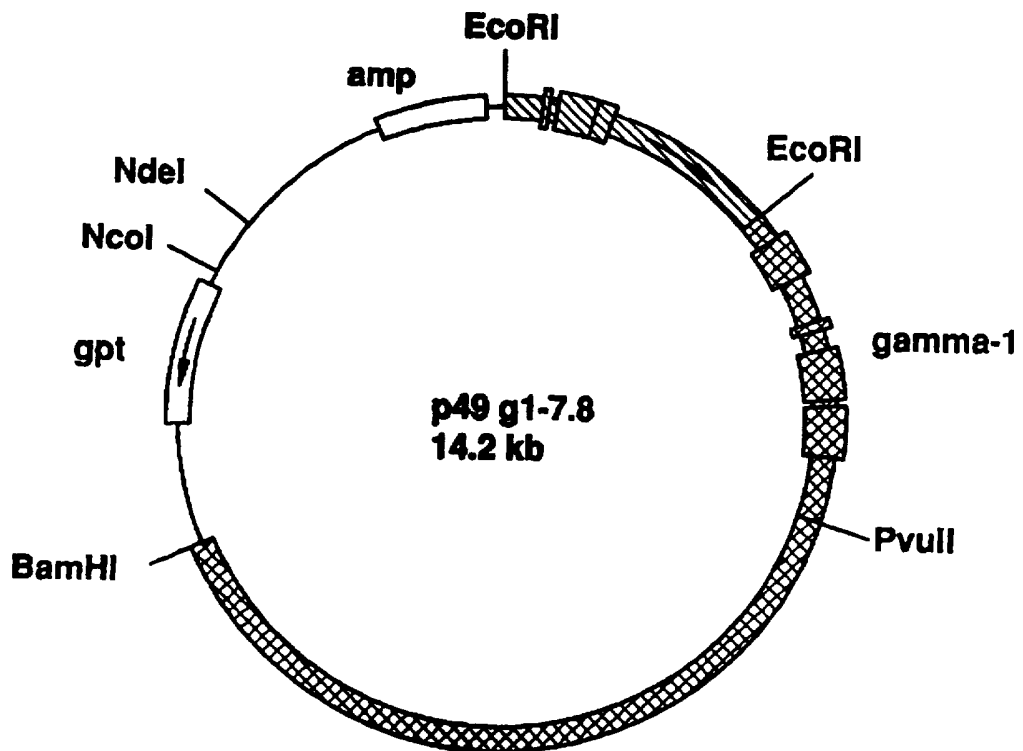


FIG.29

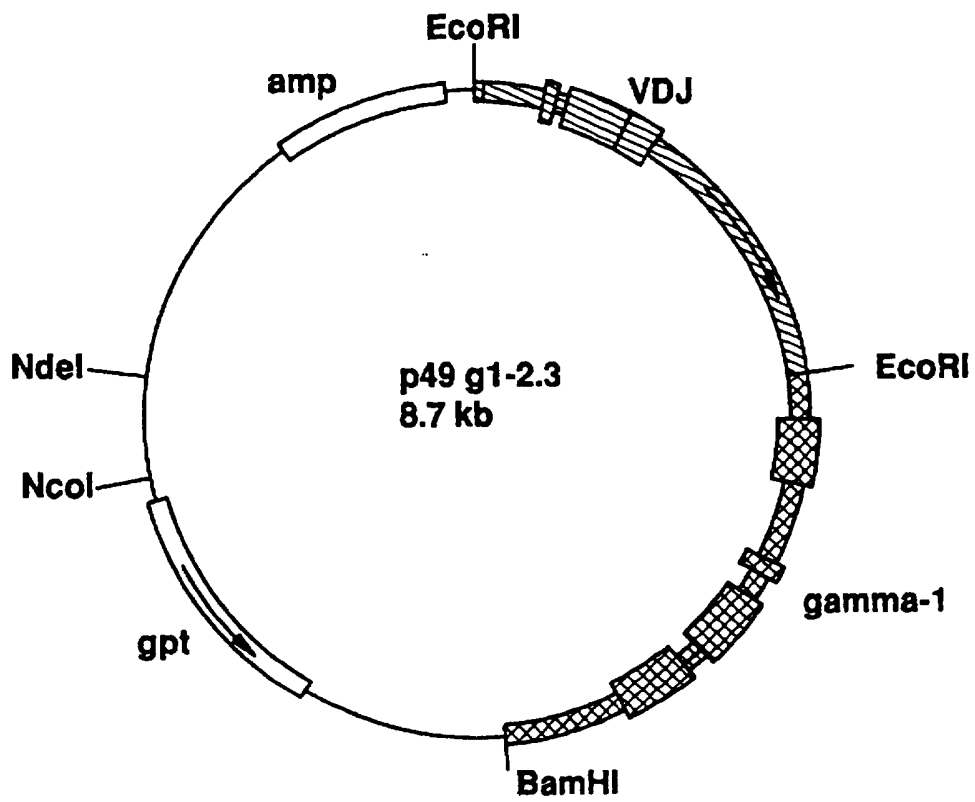


FIG.30

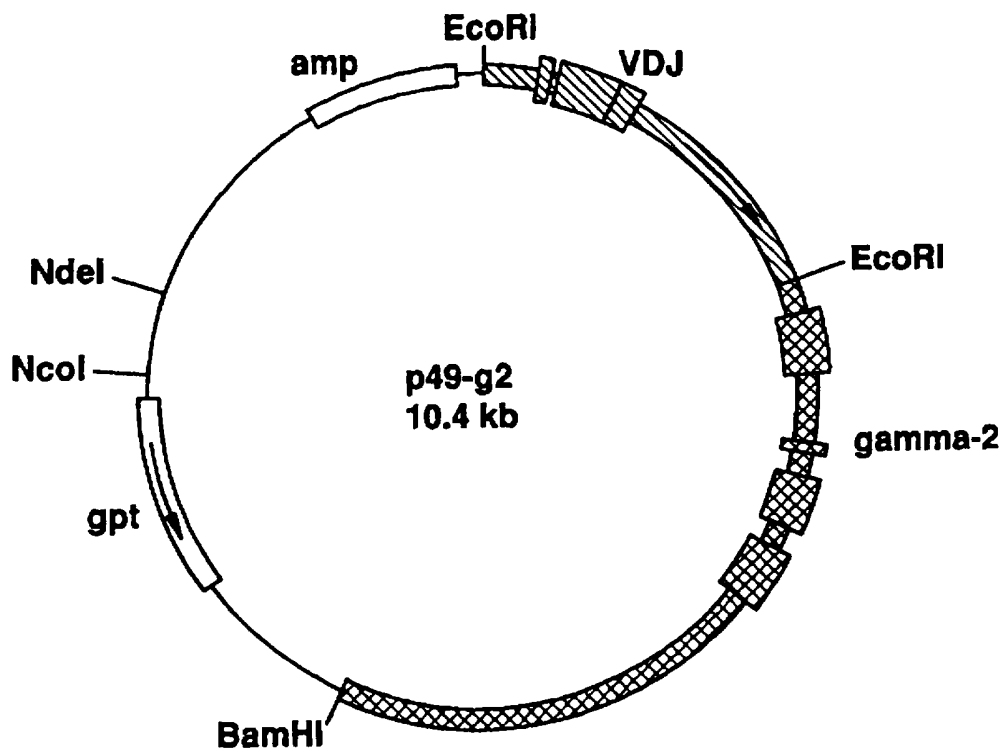


FIG.35

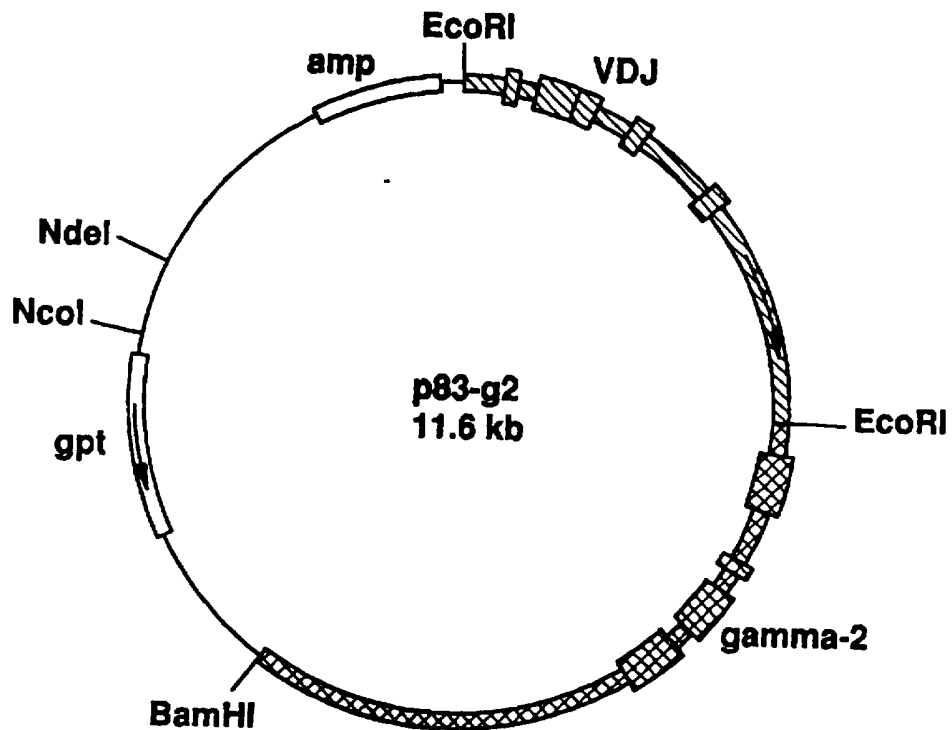


FIG.36

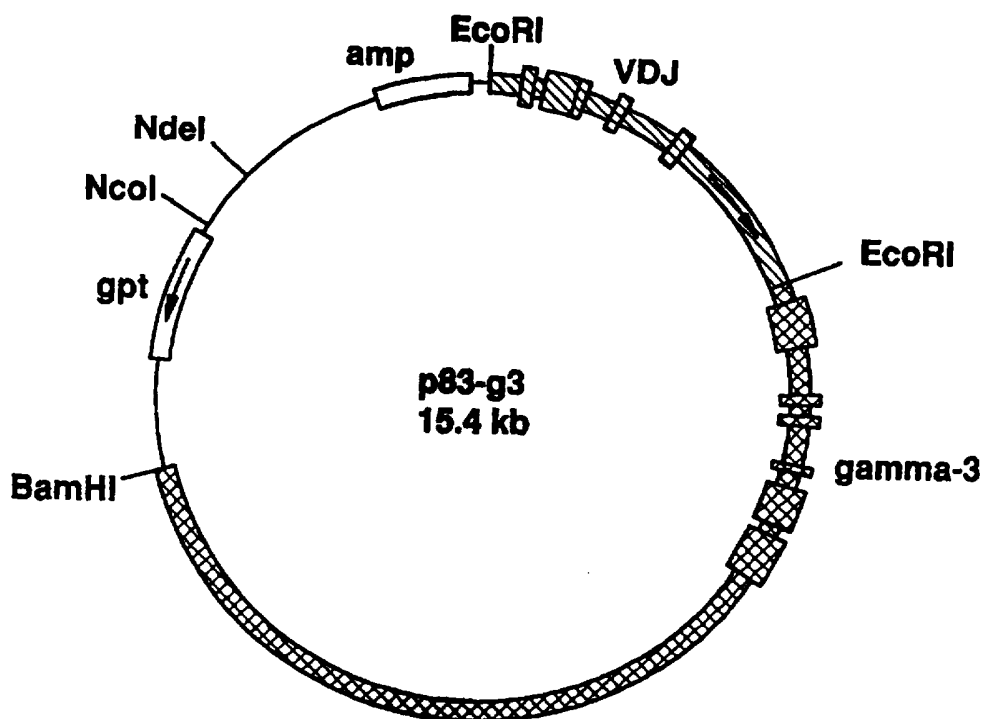


FIG.37

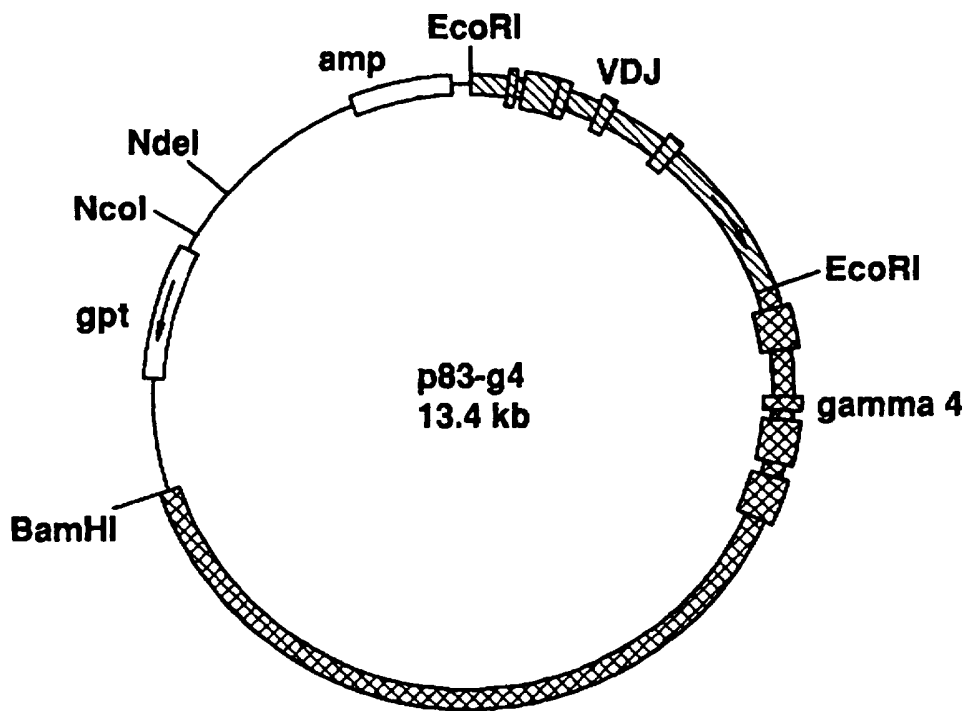


FIG.38

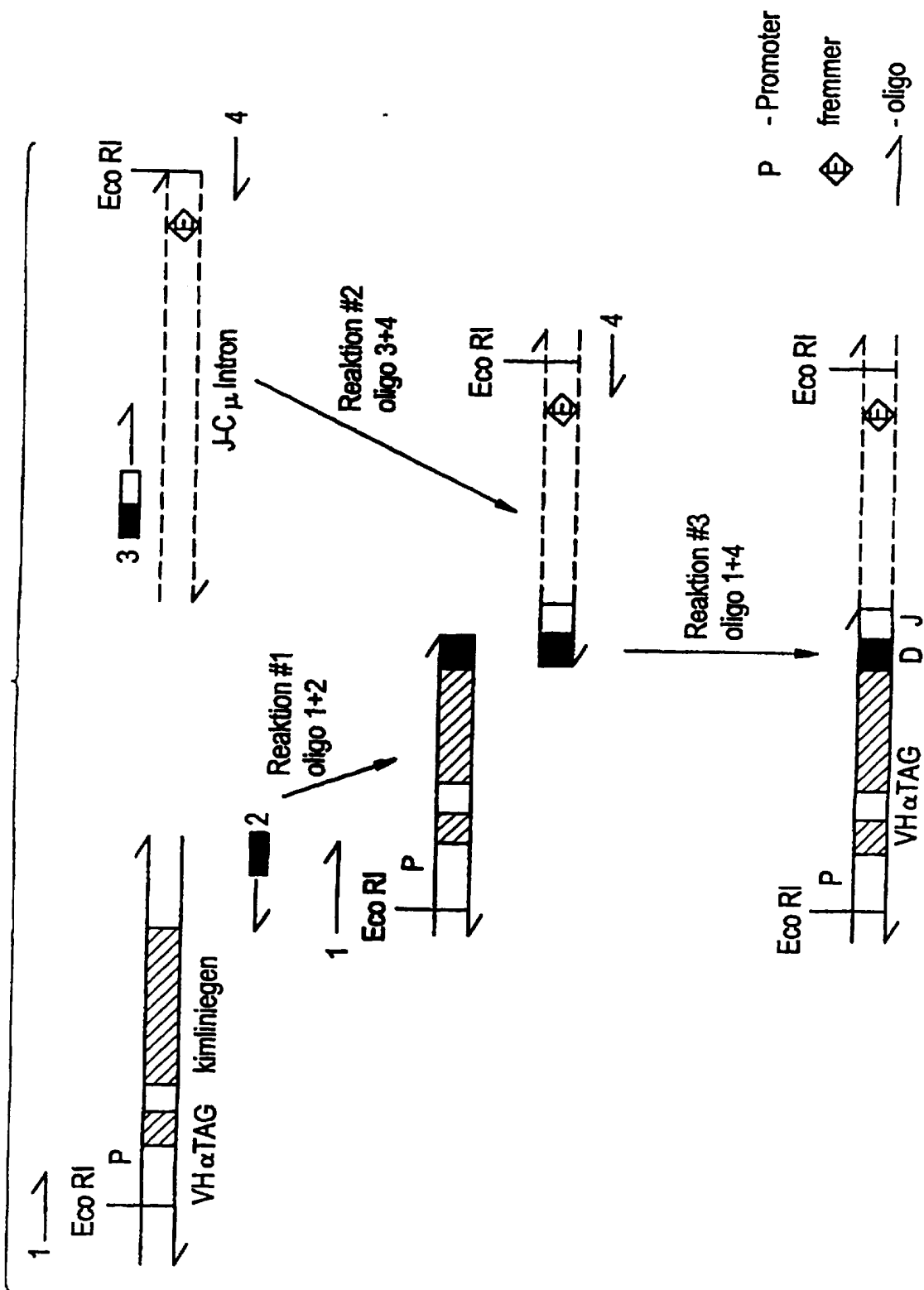


FIG.39A

BIOFORDELING AF 125 - I CH44
NORMAL VÆVSOPTAGELSE

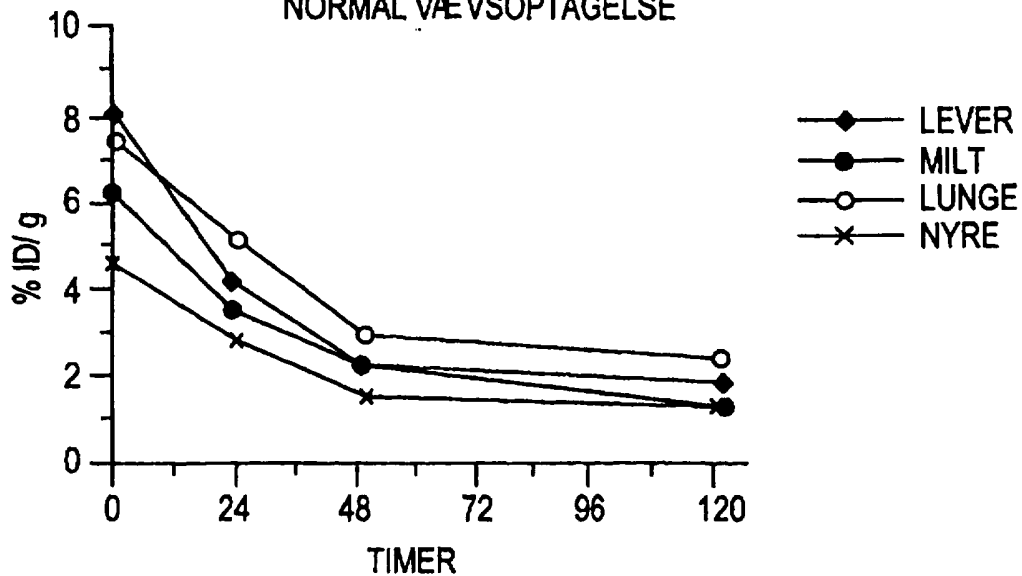


FIG.39B

FULDSTÆNDIG LEGEMSRETENTION AF 125 - I CH44

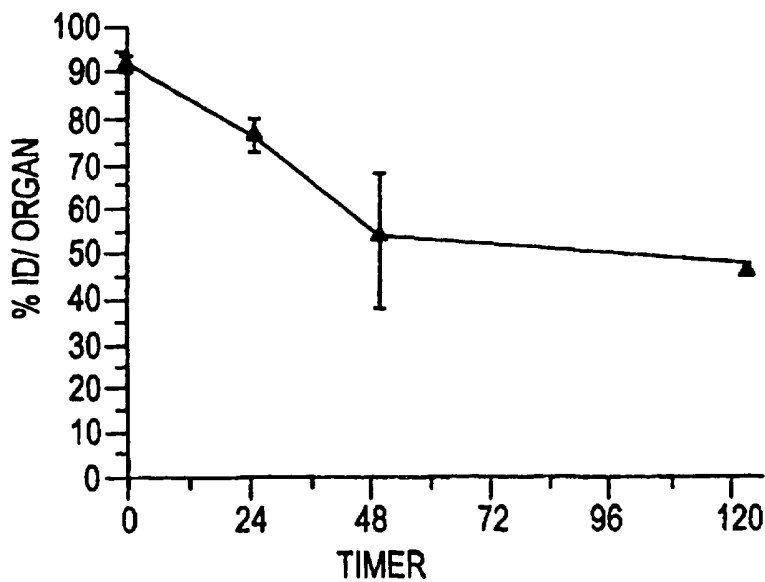


FIG.39C

BIOFORDELING AF 125-I CH44

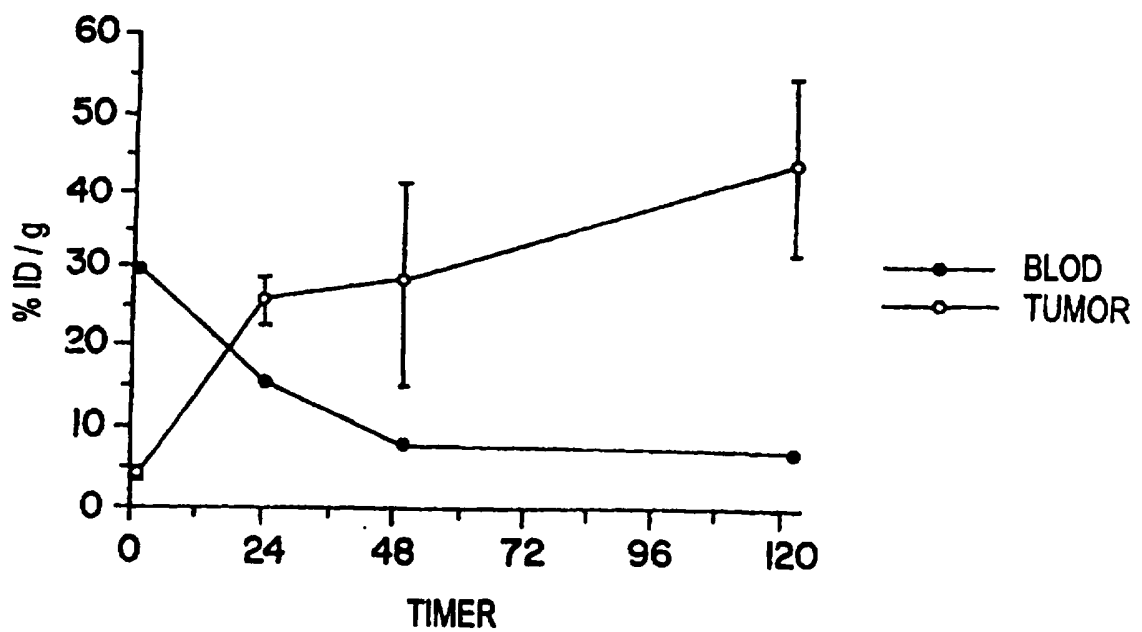


FIG.40A

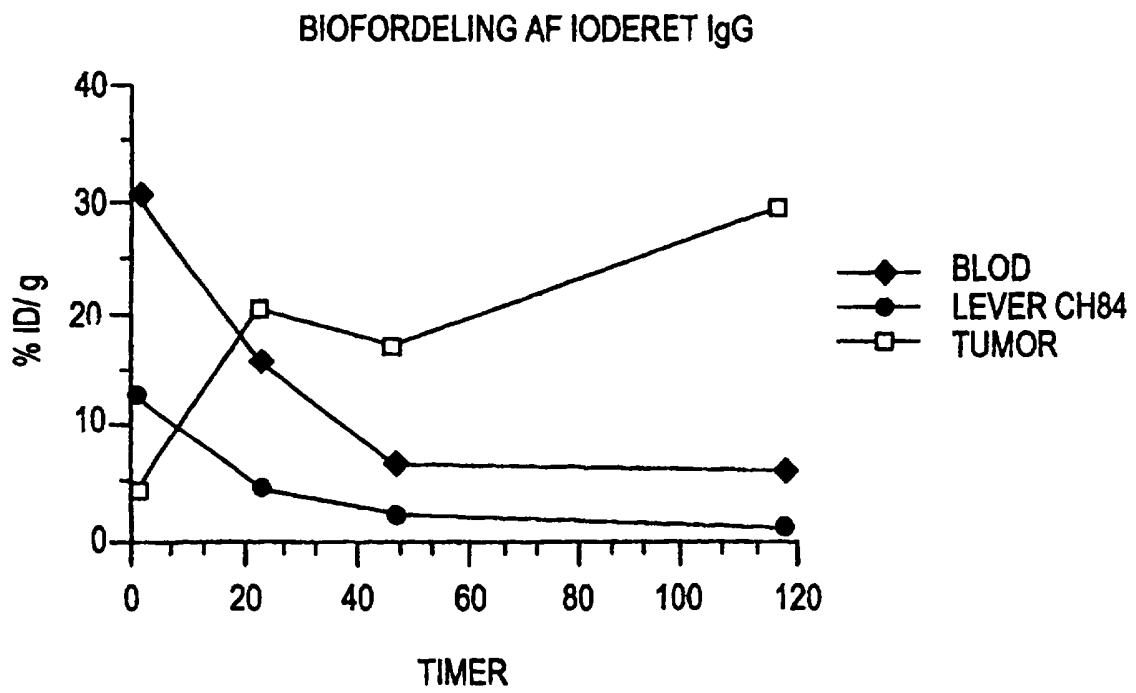
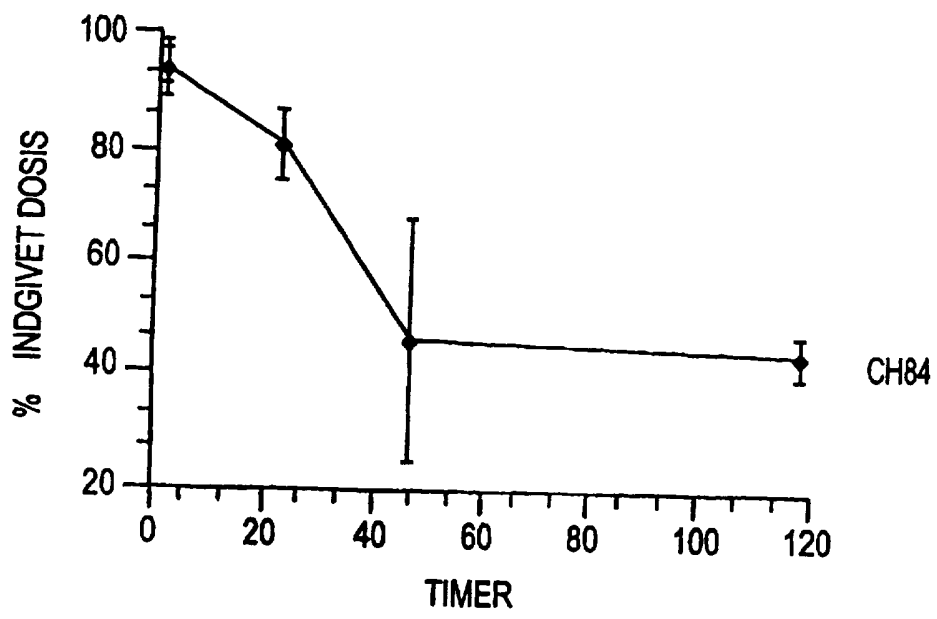
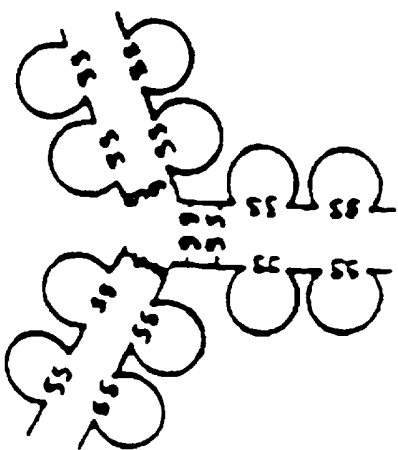


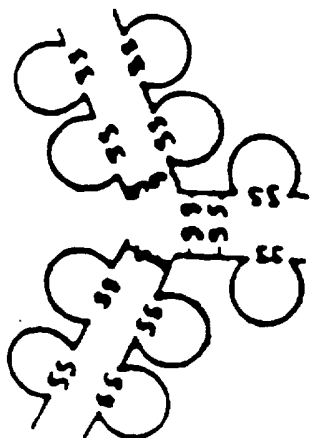
FIG.40B

FULDSTÆNDIG LEGEMES - RETENTION AF IODERET IgG

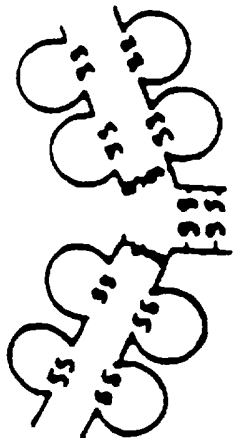




IgG1

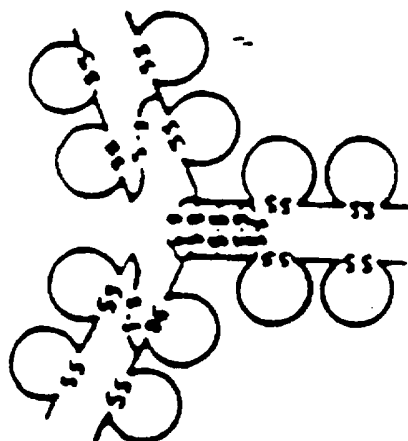


CH3-



CH2-, CH3-

F(ab')₂



IgG3



hinge-, CH2-, CH3-

Fab

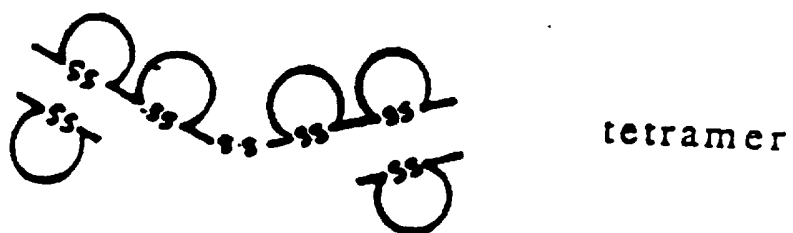
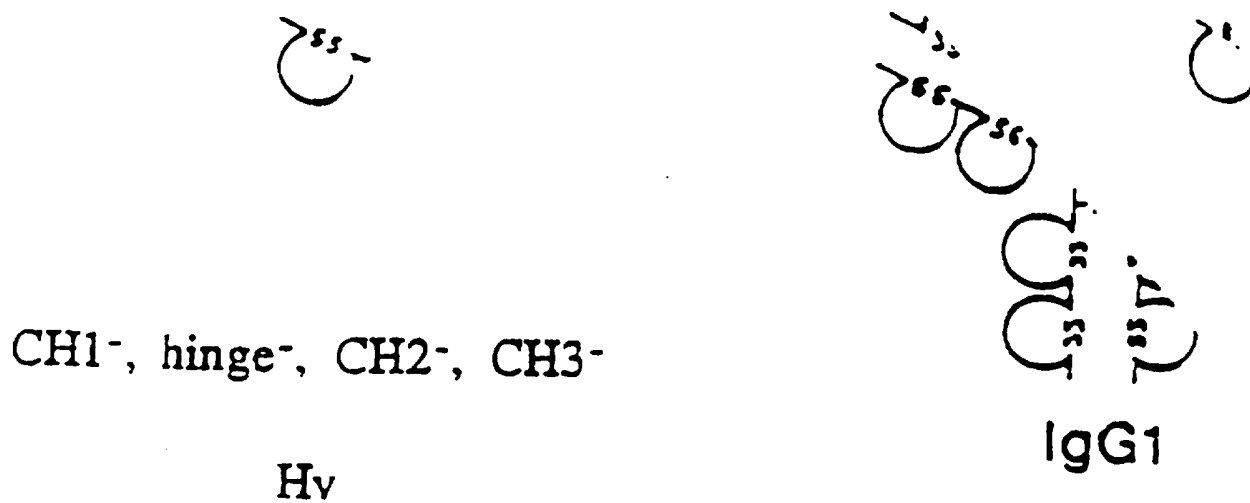


Fig. 41b

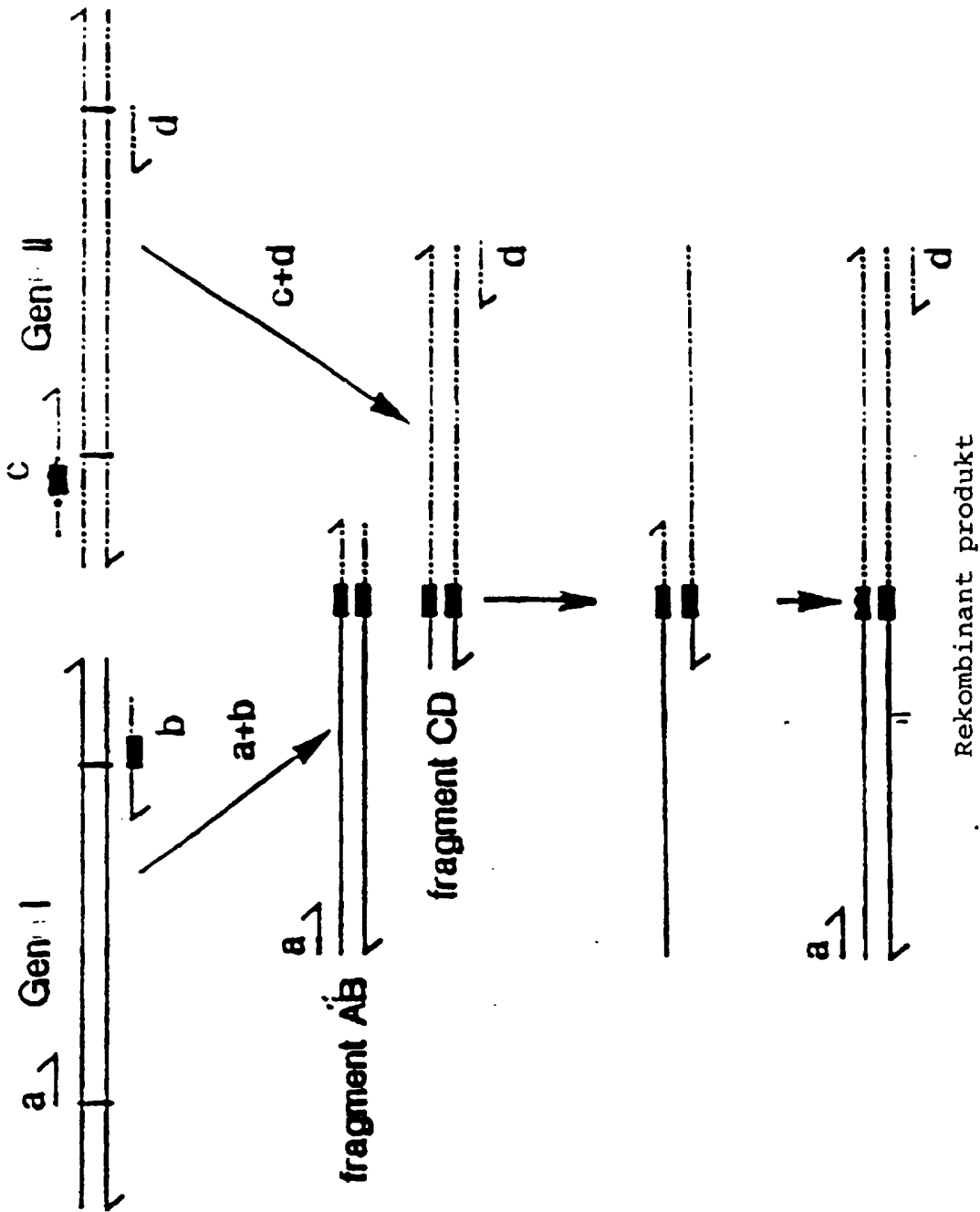


Fig. 42a

Splejsning ved overlap-ekstension (S.O.E.)

Konstruktion af korte, tunge kæder ved splejsning ved overlap-ekstension (S.O.E.)

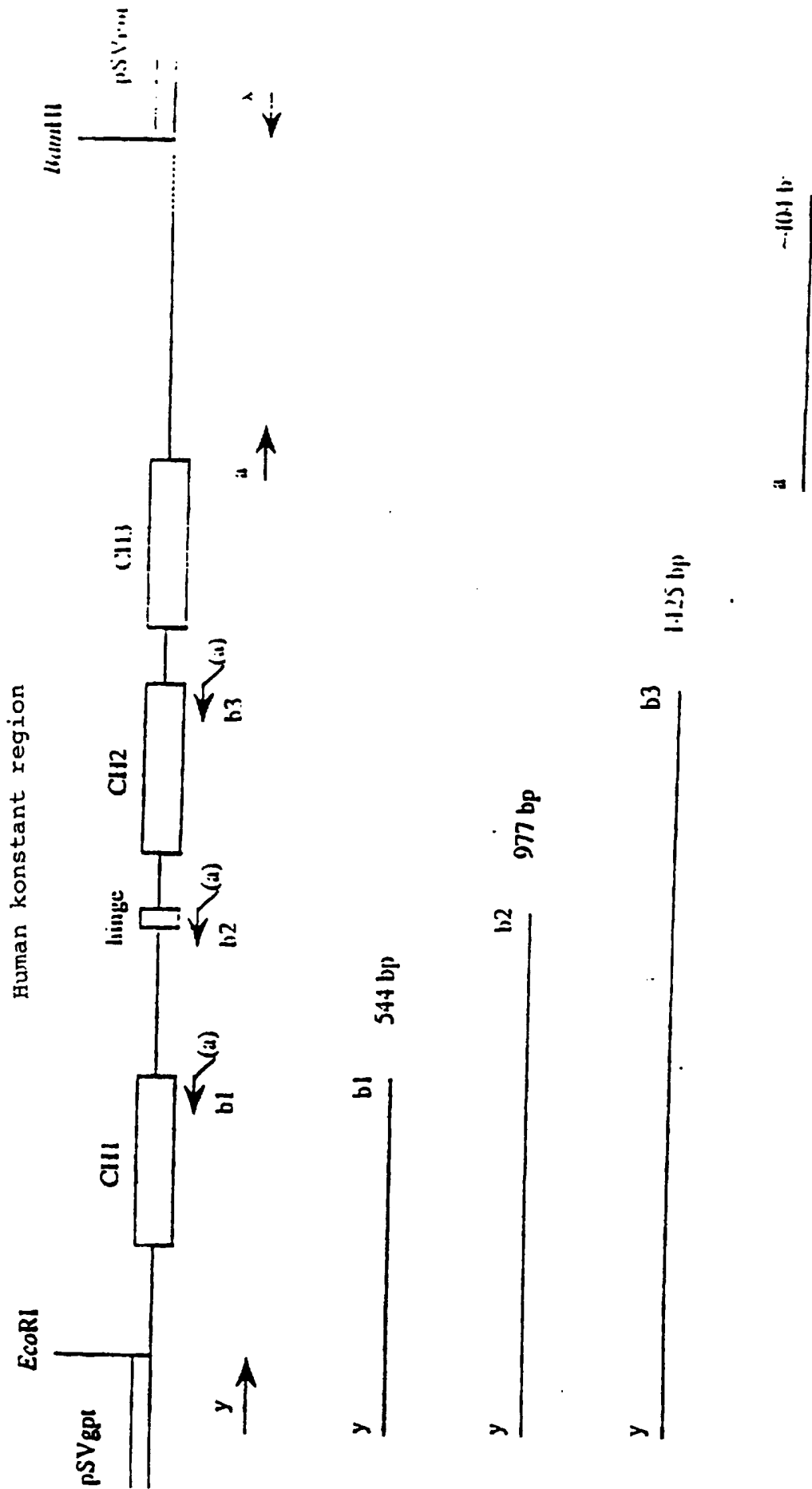


Fig. 42b

Konstruktion af 49Hv fragment

∴ CC49 Tung kæde variabel region

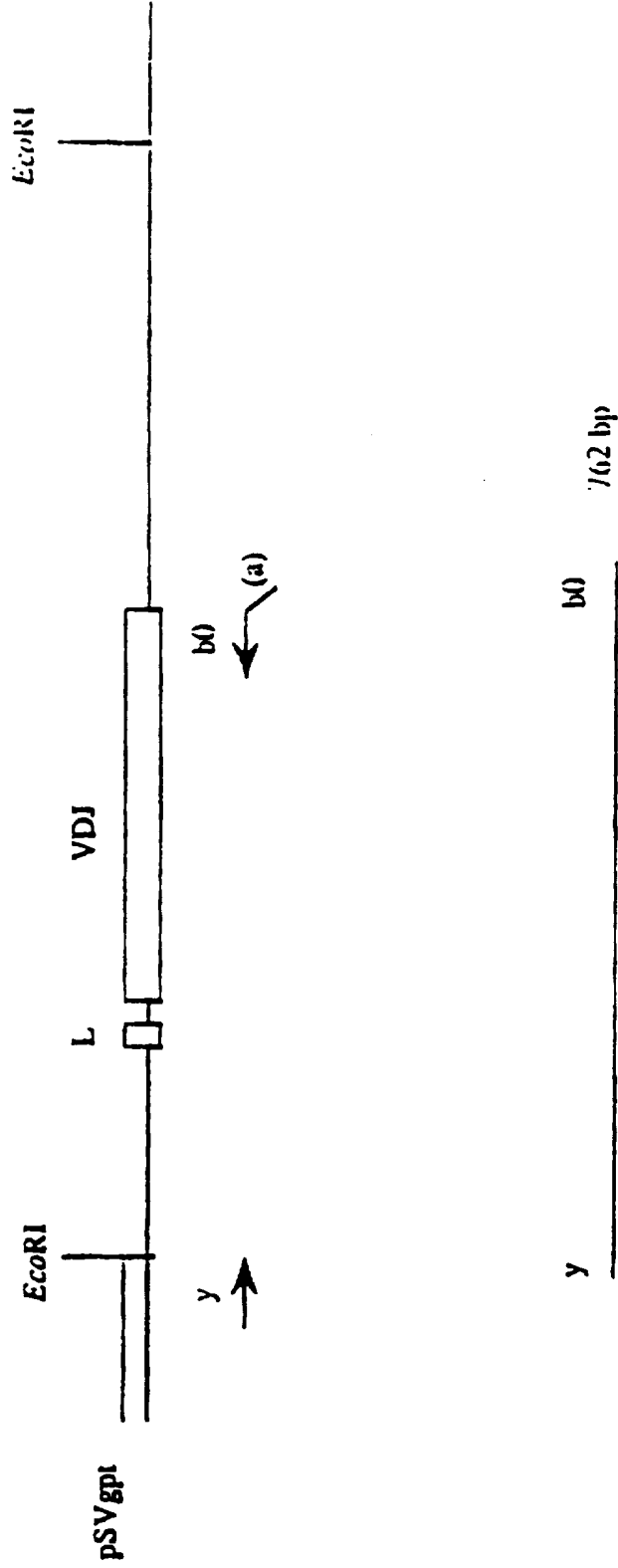


Fig. 42c