

19



Octrooiraad  
Nederland

11

Publikatienummer: **9101290**

12 A TERINZAGELEGGING

21

Aanvraagnummer: 9101290

51

Int.Cl.<sup>5</sup>:  
**C12N 15/10**

22

Indieningsdatum: 23.07.91

43

Ter inzage gelegd:  
16.02.93 I.E. 93/04

71

Aanvrager(s):  
Stichting Rega V.Z.W. te Leuven, België

72

Uitvinder(s):  
Alfons Jozef Denis Alida Biliau te Linden,  
België. Guido Frans Valentinus Froyen te  
Herent, België

74

Gemachtigde:  
Ir. R. Hoijtink c.s.  
Octroobureau Arnold & Siedsma  
Sweelinckplein 1  
2517 GK 's-Gravenhage

54

Recombinant DNA-molekuul voor de expressie van een FV-fragment van een antilichaam

57

De uitvinding betreft een recombinant DNA-molekuul voor de expressie van een functioneel Fv-fragment van een gewenst antilichaam, dat gericht is tegen interferon, omvattende een homologe promotorsequentie, een homologe terminatorsequentie en een dicistrone heterologe DNA-sequentie, waarvan de cistrons respectievelijk coderen voor het variabele deel van een zware keten ( $V_H$ ) van het gewenste anti-interferon antilichaam en het variabele deel van een lichte keten ( $V_L$ ) van het gewenste anti-interferon antilichaam. Bij voorkeur zijn de cistrons afgeleid van een sequentie welke codeert voor het monoclonale anti-humaan-interferon- $\Gamma$  antilichaam dat wordt uitgescheiden door de hybridoma-cel lijn D9D10. Het recombinante DNA-molekuul kan stroomopwaarts van elk van de cistrons een signaalpeptidesequentie bevatten en stroomafwaarts van het tweede cistron een sequentie welke codeert voor het TAG1-polypeptide. De uitvinding verschaft verder een recombinante *E. coli*-stam die het Fv-fragment tot expressie brengt, een werkwijze voor het produceren van het recombinant DNA-molekuul en een werkwijze voor het produceren van het Fv-fragment.

NL A 9101290

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

RECOMBINANT DNA-MOLECUUL VOOR DE EXPRESSIE VAN EEN FV-FRAGMENT VAN EEN ANTILICHAAM

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een  
5 recombinant DNA-molecuul voor de expressie van een functioneel Fv-fragment van een gewenst antilichaam, dat gericht is tegen interferon. De uitvinding betreft verder een recombinante E.coli-stam, welke het recombinant DNA-molecuul bevat, een werkwijze voor het produceren van het recombinant DNA-  
10 molecuul, en een werkwijze voor het produceren van een recombinant Fv-fragment van een gewenst anti-interferon-antilichaam. De uitvinding betreft in het bijzonder een recombinant DNA-molecuul voor de expressie van een functioneel Fv-fragment van een anti-humaan-interferon- $\Gamma$  (anti-  
15 HuIFN- $\Gamma$ ) antilichaam.

Immunoglobulinen (antilichamen) zijn glycoproteïnen die aanwezig zijn in het bloed en de lichaamsvochten van hogere diersoorten. Zij herkennen en binden bepaalde categorieën lichaamsvreemde stoffen (anti-genen) en induceren  
20 effector-functies die de eliminatie of neutralisatie van deze antigenen en hun dragers (virussen, bacteriën, kankercellen) bewerkstelligen. Een immunoglobuline bestaat uit twee identieke lichte en twee, eveneens identieke zware polypeptideketens, respectievelijk L- en H-ketens genoemd,  
25 welke met elkaar verbonden zijn door middel van disulfidebruggen. De sequenties van de N-terminale uiteinden van de vier ketens zijn zeer variabel en tesamen verantwoordelijk voor de binding van het antigeen. De variabele gebieden bepalen derhalve de specificiteit van het antilichaam. Het  
30 C-terminale deel van de ketens heeft daarentegen een relatief constante structuur en bepaalt de aard van de effector-functies, zoals complement-aktivatie, antilichaam afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit en anderen.

Interferon- $\Gamma$  (IFN- $\Gamma$ ) is een glycoproteïne dat  
35 geproduceerd wordt door T-cellen in antwoord op antigenen of mitogene stimuli. Naast zijn antivirale aktiviteit kan interferon- $\Gamma$  eveneens sterke immunoregulatorische effecten

9 1 0 1 2 9 0

vertonen waardoor het een belangrijke factor is in het afweermecanisme tegen bacteriën, virussen en andere antigenen, maar eveneens in auto-immuunziekten en kanker. De bijdrage van IFN- $\Gamma$  in deze pathologische reacties kan echter 5 ook schadelijk voor de gastheer zijn.

Diermodel-studies hebben duidelijk gemaakt dat monoclonale antilichamen die gericht zijn tegen interferon- $\Gamma$  een positief effect hebben op endotoxische shock, lokale ontsteking, cerebrale malaria en auto-immuun arthritis.

10 Dergelijke tegen interferon- $\Gamma$  gerichte monoclonale antilichamen zouden derhalve eveneens gebruikt kunnen worden voor de behandeling van gerelateerde humane ziekten.

Door de verdergaande ontwikkelingen van hybridoma-technieken is een groot aantal monoclonale antilichamen 15 beschikbaar gekomen welke toegepast kunnen worden voor de behandeling van ziekten. Uit tal van studies is echter gebleken dat toediening van xenogene antilichamen een anti-immunoglobuline respons opwekt in de ontvanger. Toediening van humane monoclonale antistoffen zou een dergelijke anti- 20 immunoglobuline respons kunnen verminderen of voorkomen. De produktie van dergelijke humane monoclonale antistoffen stuit echter op zowel ethische als praktische bezwaren. Om bovengenoemde problemen te vermijden is recentelijk geprobeerd door middel van in vitro manipulatie van de immunoglobuline- 25 buline-genen, zoals chimeriseren of humaniseren, de ongewenste anti-immunoglobuline respons sterk te verlagen. Hiermee zijn reeds belangrijke resultaten bereikt.

Gevonden is nu dat het Fv-fragment van een antilichaam dat gericht is tegen humaan interferon- $\Gamma$  een affiniteit heeft voor IFN- $\Gamma$  en in staat is de biologische activiteit daarvan te neutraliseren. Verwacht wordt dat met het gebruik van een dergelijk Fv-fragment eveneens de anti-immunoglobuline respons verminderd kan worden. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat de immunogene C-regio's uit het 35 antilichaam verwijderd zijn, terwijl toch de antigeenbindende eigenschappen van de V-regio's behouden blijven.

De onderhavige uitvinding verschaft een recombinant DNA-molecuul waarmee een functioneel Fv-fragment van een

gewenst antilichaam gericht tegen humaan interferon- $\Gamma$  tot expressie gebracht kan worden. Het recombinant DNA-molecuul bevat daartoe een homologe promotor sequentie, een homologe terminator sequentie, en een dicistrone heterologe DNA-  
5 sequentie, waarvan de cistrons respectievelijk coderen voor het variabele deel van een zware keten ( $V_H$ ) van het gewenst antilichaam en het variabele deel van een lichte keten ( $V_K$ ) van het gewenst antilichaam. Een dergelijk recombinant DNA-molecuul verschaft de vereiste gelijktijdige produktie van  
10 de genen van de variabele gebieden van de lichte en zware ketens.

Bij voorkeur worden de beiden variabele genen onder de controle van de lac-promotor geplaatst. Deze promotor kan al naar gelang de behoefte geïnhibeerd of geactiveerd wor-  
15 den. Daarmee kan voorkomen worden dat op een ongewenst moment het toxische Fv-fragment geproduceerd wordt. Het is natuurlijk eveneens mogelijk andere induceerbare promotoren te gebruiken.

Bij voorkeur worden de beiden variabele genen vooraf  
20 gegaan door een signaalpeptide-sequentie van pelB, waardoor beide V-gebieden in het periplasma worden uitgescheiden.

Het is eveneens mogelijk de beide variabele gebieden aan elkaar te koppelen door middel van een linker. Bij voorkeur heeft de linker de sequentie volgens formule Ic. In  
25 dit geval bevindt de signaalpeptide-sequentie zich slechts stroomopwaarts van het cistron voor de zware keten.

Bij voorkeur bevindt zich stroomafwaarts van het cistron voor de lichte keten een klein polypeptide, bijvoorbeeld het TAG1-polypeptide. Dit polypeptide wordt gebruikt  
30 voor het detecteren van het Fv-fragment door middel van een antilichaam dat gericht is tegen het TAG1-polypeptide

De onderhavige uitvinding zal verder worden verduidelijkt aan de hand van een aantal voorbeelden, welke niet beperkend bedoeld zijn voor de omvang van de uitvinding.

VOORBEELD 1

Isolatie en vermeerdering van de  $V_H$ - en  $V_K$ -fragmenten van anti-HuIFN- $\Gamma$ .

5 De nucleotidesequentie van zowel de 5'- als de 3'-uiteinden van V-gebieden van immunoglobulinen is sterk geconserveerd. Daardoor is het mogelijk oligonucleotiden te definiëren, die in staat zijn de  $V_H$  en  $V_K$ -gebieden van nage-  
noeg ieder muize-antilichaam te amplificeren (zie Orlandi et  
10 al. (1989). Proc. Natl. Acad. SCI. USA 86: 3833-3837).

De primers voor de amplificatie van de  $V_H$ -gebieden zijn:

VH1BACK: 5' AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3'

PstI

15 waarbij: S = C of G

M = A of C

R = A of G

W = A of T

VH1FOR: 5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC 3'

20 BstEII

De primers voor de amplificatie van  $V_K$  gebieden zijn:

VK2BACK: 5' GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCA 3'

25 SacI

VK2FOR: 5' GTTTGATCTCGAGCTTGGTGCC 3'

XhoI

30 Door de introductie van restrictieknipplaatsen in het geamplificeerde DNA-fragment wordt de klonering van de fragmenten belangrijk vereenvoudigd.

Voor de amplificatie van  $1\mu\text{g}$  mRNA van D9D10 werd eerst op bekende wijze het eerste-streng cDNA gesynthetiseerd. Hiervoor werd 100 pmol random hexanucleotide als  
35 primer gebruikt (Amersham, Buckinghamshire, GB) omdat daardoor, na de PCR, een specifiek DNA-fragment verkregen werd dan wanneer het PCR-oligonucleotide voor de eerste-streng

9 1 0 1 2 9 0

synthese gebruikt werd. Op het reactieproduct van de eerste-  
 streng cDNA synthese gebeurde de amplificatie van het ge-  
 wenste fragment met de twee specifieke primers in een 50  $\mu$ l  
 reactiemengsel bestaande uit 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl,  
 5 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml gelatine, 0,25mM dNTP, 25 pmol per  
 oligonucleotide primer en 2,5U Taq-polymerase (Cetus, Nor-  
 walk, Connecticut). Het reactiemengsel werd bedekt met 2  
 druppels paraffine-olie en onderworpen aan 30 à 35 cycli van  
 30 sec. 95°C (denaturatie), 35 sec. 61°C (annealing) en 25  
 10 sec. 72°C (invulreactie) met een laatste invulreactie van 5  
 min. bij 72°C. Voor het doorvoeren van de PCR werd gebruik  
 gemaakt van een programmeerbaar thermisch blok (PCH-2;  
 Techne, Cambridge, GB). Electroforese van 5  $\mu$ l van het  
 reactiemengsel op een 2% agarosegel gaf de mate van zuiver-  
 15 heid en de opbrengst van het geamplificeerde DNA-fragment  
 aan. De overige 45  $\mu$ l werd onderworpen aan een chloroform-  
 extractie (400  $\mu$ l) waarna het DNA met NaAc/ethanol werd  
 geprecipiteerd. Hierop werden vervolgens de gewenste reac-  
 ties met de restrictie-enzymen uitgevoerd.

20

#### VOORBEELD 2

Constructie van een expressievector voor Fv-fragmenten van  
 anti-HuIFN- $\Gamma$  antilichaam.

Voor de constructie van een expressie vector voor de  
 25 Fv-fragmenten van anti-HuIFN- $\Gamma$  wordt uitgegaan van de vector  
 pSW1-VHD1.3-VKD1.3-TAG1, zoals beschreven door Ward et al.  
 (1989) Nature 341: 544-546. Het V<sub>H</sub>-domein van het antili-  
 chaam D1.3 werd uit deze vector verwijderd door digestie met  
 PstI en BstEIII en vervangen door het V<sub>H</sub>-fragment van een  
 30 anti-humaan-interferon- $\Gamma$  van de myelomacellijn D9D10, vol-  
 gens formule Ia. Het fragment werd in voldoende hoeveelheden  
 verkregen op de manier zoals beschreven in voorbeeld 1. Het  
 V<sub>K</sub>-domein van het antilichaam D1.3 werd vervolgens vervangen  
 door een SacI-XhoI-fragment volgens figuur Ib dat het V<sub>K</sub>-  
 35 gebied van anti-HuIFN- $\Gamma$  bevat. De resterende expressievector  
 werd pSW1-Fv-anti-HuIFN- $\Gamma$  genoemd.

De nucleotidesequenties van respectievelijk de V<sub>H</sub>-  
 en V<sub>K</sub>-gebieden (resp. formule Ia en Ib) van het D9D10-anti-

9 1 0 1 2 9 0

lichaam worden weergegeven in figuur 1. De vetgedrukte delen geven de plaats van de bij de PCR gebruikte primers weer. De onderstreepte delen geven de restrictieknipplaatsen aan.

De constructiestrategie wordt schematisch weergegeven in figuur 1.

### VOORBEELD 3

#### Transformatie van E.coli (DH5 $\alpha$ )

Plasmide-DNA werd in E.coli-cellen gebracht volgens de CaCl<sub>2</sub>-methode van Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53: 159-162 met dit verschil dat er slechts 1 hitte-shock werd toegediend (i.p.v. 5) nl. 20 sec. bij 37°C voor een 50  $\mu$ l-reactie, 45 sec. bij 37°C voor een 100  $\mu$ l reactie.

E.coli DH5 $\alpha$ -cellen (supE44, hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, del(argF-lacZya)U169,  $\phi$ 80dlacZdelM15) werden na transformatie uitgeplateerd in LB-medium (1% Bacto-trypton; 0,5% gistextract en 0,8% softagar) op een vaste LB-bodem (1,5% agar) waaraan 100  $\mu$ g/ml ampicilline, 0,02% X-gal en 0,25 mM IPTG was toegevoegd. Er werd overnacht geïncubeerd bij 37°C. Op deze wijze werd kloon P330 verkregen.

### VOORBEELD 4

#### Expressie van het Fv-fragment van anti-HuIFN- $\Gamma$

De bacteriekloon, die de expressievector voor de productie van het Fv van het anti-HuIFN- $\Gamma$  antilichaam bevatte werd gedurende 16 uur opgegroeid bij 37°C in LB-medium in aanwezigheid van 100 $\mu$ M ampicilline en 1% glucose. Glucose onderdrukt de lac-promotor waardoor geen antistof-fragment geproduceerd kan worden. De cellen werden vervolgens tweemaal gewassen in 50mM NaCl en geresuspendeerd in LB-medium met 100  $\mu$ M ampicilline en 1mM IPTG voor inductie van de promotor. Deze suspensie werd gedurende 20 uur in een schudincubator bij 37°C geïncubeerd. De cellen werden vervolgens geïsoleerd door centrifugatie (7.000 rpm, 4°C) en de cultuurvloeistof getest in een ELISA (zie voorbeeld 5) of bewaard bij 4°C.

9 1 0 1 2 9 0

Het periplasma werd geïsoleerd zoals beschreven door Skerra et al. (1988) Science 240: 1038-1041. De cellen werden na inductie met IPTG geprecipiteerd door centrifugatie, geresuspendeerd in TES-buffer (0,2M Tris-HCl pH 8,0; 5 0,5mM EDTA; 0,5M sucrose; 10 ml/l cultuur) en onderworpen aan een lichte osmotische schok door toevoeging van een 1/4 verdunning van TES-buffer in water (15 ml/l cultuur). Na 30 minuten op ijs werd de suspensie gecentrifugeerd bij 8.000 rpm gedurende 10 minuten bij 4°C. Het supernatant werd 10 opnieuw gecentrifugeerd bij 20.000 rpm gedurende 30 minuten om het resterende celdebris te verwijderen. De bovenstaande vloeistof werd direkt getest, bewaard bij 4°C of ingevroren bij -20°C.

#### 15 VOORBEELD 5

Detectie van het Fv-fragment van anti-HuIFN- $\Gamma$

De binding van het Fv-fragment aan het humane IFN- $\Gamma$  molecuul werd getest in een ELISA. De cupjes van een 96-well "MaxiSorp Nunc-Immuno Plate" werden overnacht bij 4°C ge- 20 incubeerd met 2  $\mu$ g/ml recombinant HuIFN- $\Gamma$  (Bioferon, Laupheim, Duitsland) in 100  $\mu$ l van een 50mM Tris-HCl pH 8,5 en 10mM NaCl buffer. De stockoplossing van recombinant HuIFN- $\Gamma$  was opgelost in 50mM natriumfosfaat en 100mM ammoniumacetaat buffer met 12,5 mg/ml sucrose, tot een concentratie van 0,7 25 mg/ml zuiver eiwit.

De cultuurplaat werd afgegoten en in elk cupje werd 250  $\mu$ l blokker (PBS met 0,5% caseïne en 0,01% merthiolaat pH 7,5) toegevoegd. Na incubatie gedurende 1 uur bij 37°C werden de cellen gewassen met 0,05% Tween-20 in PBS met 30 0,01% merthiolaat (wasbuffer), waarna de Fv-fragmentmonsters werden opgebracht (eventuele verdunningen in blokker). Na 2 uur schudden bij 37°C werd het niet-gebonden materiaal weggewassen en 100  $\mu$ l van een 1  $\mu$ g/ml anti-TAG1 antistof in blokker aan elk cupje toegediend. Vervolgens werd opnieuw 35 gedurende 2 uur geschud en 3 maal gewassen. Daarna werd gebiotinyleerde schaap anti-muis-Ig antistof toegevoegd (Amersham, Buckinghamshire, GB, 100  $\mu$ l van een 1/1000 verdunning). Na 1 uur schudden bij 37°C en 3 maal wassen, werd

9 1 0 1 2 9 0



afgewerkt met het gebiotinyleerde peroxidase-streptavidine complex, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ABTS.

Omdat geen anti-idiotypen antistof voorhanden was gebeurde de detectie d.m.v. het TAG1-polypeptide dat aan het 5 V<sub>K</sub>-gebied is gekoppeld.

De hoogste expressie van Fv in de bovenstaande vloeistof van een 18 uur geïnduceerde celcultuur bedroeg 30 bindende eenheden. Dit betekent dat een 1/30 verdunning van de vloeistof nog juist positief was (groene kleur) in de 10 ELISA voor HuIFN- $\gamma$ -binding. Voor eenzelfde inductie werd bijna geen Fv aangetoond in het periplasma. Dit wordt veroorzaakt door het feit dat de Fv-concentratie in het periplasma zijn maximale waarde na een inductie van 2 uur bereikt waarna het langzaam in de cultuurvloeistof lekt en na 15 18 uur in hoofdzaak daarin aanwezig is. Deze "lek" uit de cellen zou te wijten kunnen zijn aan een stresssituatie in de bacteriën veroorzaakt door een hoge productie van een vreemd eiwit. In de vloeistof van niet-geïnduceerde cellen (afwezigheid van IPTG) was steeds een basale hoeveelheid Fv 20 aanwezig terwijl de vloeistof van cellen, waarvan de promotor onderdrukt was door de aanwezigheid van glucose, geen detecteerbaar Fv-materiaal bevatte.

De periplasmabereidingsmethode zorgde reeds voor een aanzienlijke aanrijking van het geproduceerde Fv omdat het 25 volume veel kleiner was in vergelijking met dit van de bovenstaande vloeistof. De periplasmatische fractie van een 1 liter cultuur bedroeg 12 ml (83 maal geconcentreerder) en van een 1 tot 3 ml cultuur bedroeg dit 75  $\mu$ l (13 tot 40 maal geconcentreerder). Na een inductie van 2 uur met 0.1mM IPTG, 30 de combinatie die de hoogste inductie gaf in het periplasma, werden zowel de vloeistof als de periplasmatische fractie getest in de ELISA. Het periplasma had een titer van 200 bindende eenheden; in de bovenstaande vloeistof werd geen Fv gedetecteerd.

35 Uit deze proeven blijkt dat E. coli, waarin het Fv-geen geïntroduceerd werd, inderdaad Fv produceren en dat het Fv in staat is HuIFN- $\gamma$  te binden. Dit betekent dat noch de aminozuurwijzigingen in de 5'- en 3'-uiteinden van de V-

9 1 0 1 2 9 0

gebieden, noch de koppeling van TAG1 aan  $V_k$ , een belangrijke negatieve invloed hebben op de binding van het Fv van D9D10 aan het HuIFN- $\Gamma$ -molecule.

##### 5 VOORBEELD 6

Inhibitie van de antivirale activiteit van HuIFN- $\Gamma$

Om na te gaan of het door E.coli geproduceerde Fv-fragment de activiteit van HuIFN- $\Gamma$  kan inhiberen of neutraliseren, werden in vitro neutralisatietesten uitgevoerd.

10 Hiervoor werden A549-cellen gebruikt, een humane carcinoma cellijn. Deze cellijn werd gekweekt in MEM met 10% "Newborn Calf Serum" (NCS) en is gevoelig voor de antivirale werking van HuIFN- $\Gamma$ .

Een humaan-IFN- $\Gamma$  concentratie, welke nog net antivi-  
15 raal actief was (167ng HuIFN- $\Gamma$  met een specifieke activiteit van  $2,8 \times 10^4$  U/ $\mu$ g op Wishcellen; Biogen, Gent) werd gemengd met seriële 1/2 logaritmische verdunningen van de te testen monsters. Deze werden gedurende 4 uur bij 37°C geïncubeerd waarna de mengsels 6 min. onder UV werden gedesinfecteerd.

20 Aan alle cupjes werden dan 50.000 A549-cellen toegevoegd en het geheel werd gedurende 20 uur geïncubeerd in een CO<sub>2</sub>-incubator totdat de cellen een monolaag hadden gevormd. De infectie gebeurde met een 1/300 verdunning van het Encefalo-Myocarditis Virus (EMCV). Na 48 uur, toen de viruscontrole  
25 volledig was aangetast, werden de levende cellen gekleurd met 100 $\mu$ l van een neutraalroodoplossing (1/30 verdunning neutraalrood in PBS met Ca<sup>2+</sup> en Mg<sup>2+</sup>) en 2 à 4 uur in het donker bewaard. Vervolgens werd gewassen met PBS (met Ca<sup>2+</sup> en Mg<sup>2+</sup>) en 100 $\mu$ l zure alcohol aan ieder cultuurputje toege-  
30 voegd. Na 20 minuten werden de platen afgelezen in een Multiscan Titertek bij 542nm.

Als controles werden steeds de monsters, in afwezigheid van HuIFN- $\Gamma$ , en IFN- $\Gamma$ , in afwezigheid van het monster meegenomen. Cel- en viruscontroles werden eveneens meegenomen.  
35 men.

Een 1/3 verdunning van deze fractie bleek in staat om antivirale activiteit volledig te blokkeren. Wanneer een combinatie van de 1/3 verdunning samen met een lage IFN- $\Gamma$

9 1 0 1 2 9 0

dosis op de cellen werd gebracht, kon het EMC virus de cellen infecteren en doden, dit in tegenstelling tot een monster met de lage IFN- $\Gamma$  concentratie alleen, waarbij bescherming optrad. Dit remmend effect was niet te wijten aan  
 5 een mogelijke toxiciteit van een component uit het periplasma omdat in afwezigheid van virus de cellen niet geaffecteerd werden, noch aan een stimulatie van de virusgroei, omdat het virus de cellen niet sneller aantastte in aanwezigheid van de periplasmatische fractie dan in de afwezig-  
 10 heid daarvan. In een 1/6 verdunning van de periplasmatische fractie werd net geen inhibitie van de antivirale werking meer waargenomen. Het op een affiniteitskolom gezuiverde Fv-fragment vertoonde dezelfde neutraliserende effecten. Dit wijst erop dat het geen andere component uit het periplasma  
 15 is dat de antivirale activiteit van HuIFN- $\Gamma$  blokkeert.

Daarenboven was periplasma van niet-geïnduceerde cellen niet in staat om te neutraliseren. Dit betekent dat het Fv van de anti-HuIFN- $\Gamma$  antistof van D9D10 ook in staat is om de antivirale activiteit van HuIFN- $\Gamma$  te neutraliseren,  
 20 ondanks lichte wijzigingen aan de 5'- en 3'-uiteinden van de V-gebieden, en de koppeling van TAG1 aan  $V_K$ .

Uit de bovenstaande voorbeelden blijkt dat de introductie van de  $V_H$ - en  $V_L$ -PCR-fragmenten achter de lacZ-  
 25 promotor ervoor zorgt dat er een dicistronisch mRNA gevormd wordt dat de  $V_H$ - en  $V_L$ -eiwitten afzonderlijk, maar waarschijnlijk in gelijke hoeveelheden produceert. Voor elk V-gen is een ribosoom-bindingsplaats aanwezig. Daar het pelB-signaalpeptide instaat voor het transport van het pectaat  
 30 lyase enzym van het cytoplasma naar het periplasma, zullen beide V-proteïnen ook naar het periplasma worden getransporteerd. Dit betekent dat het Fv-fragment gemakkelijk geïsoleerd en in een geconcentreerde vorm verkregen kan worden. Ook wordt het dan niet blootgesteld aan de afbraak door  
 35 cytoplasmatische proteasen.

Zoals bleek uit ELISA- en neutralisatietests werd het functionele HuIFN- $\Gamma$ -bindend Fv-fragment in het periplasma gesecreteerd. Het Fv-fragment, dat het HuIFN- $\Gamma$ -molekuul

9 1 0 1 2 9 0

bindt en zijn antivirale activiteit neutraliseert, en enkel bestaat uit beide variabele regio's en een klein polypeptide (TAG1), zal waarschijnlijk een verminderde HAMA-respons hebben in vergelijking met de parentale antistof. De afwe-  
5 zigheid van de C-gebieden heeft geen verdere invloed op een goede immuunrespons omdat er geen effectorfunctie voor deze antistof noodzakelijk is.

De stabiliteit van het Fv-fragment kan verhoogd worden door chemische cross-linking van de V-gebieden, door  
10 introductie van een intermoleculaire disulfidebrug of door koppeling van de V-gebieden met een proteïne-linker. Koppeling van een toxine, cytotoxische stof of radioisotoop aan het Fv-fragment kan uitgevoerd worden wanneer men het als "magic bullet" wil gebruiken. Door deze koppeling stijgt de  
15 halfwaardetijd in het serum ook.

**CONCLUSIES**

1. Recombinant DNA-molekuul voor de expressie van een functioneel Fv-fragment van een gewenst antilichaam, dat 5 gericht is tegen interferon, omvattende een homologe promotorsequentie, een homologe terminatorsequentie en een dicistrone heterologe DNA-sequentie, waarvan de cistrons respectievelijk coderen voor het variabele deel van een zware keten ( $V_H$ ) van het gewenste anti-interferon antilichaam en 10 het variabele deel van een lichte keten ( $V_L$ ) van het gewenste anti-interferon antilichaam.

2. Recombinant DNA-molekuul volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de cistrons van de heterologe DNA-sequentie coderen voor de variabele delen van de zware keten, respectievelijk lichte keten van een antilichaam gericht tegen 15 humaan interferon- $\Gamma$ .

3. Recombinant DNA-molekuul volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat de cistrons afgeleid zijn van een sequentie welke codeert voor het monoclonale anti-humaan-interferon- $\Gamma$  20 antilichaam dat wordt uitgescheiden door de hybridoma-cel lijn D9D10.

4. Recombinant DNA-molekuul volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat het cistron dat codeert voor het variabele deel van de lichte keten wordt weergegeven door de formule 25 Ia en het cistron dat codeert voor de zware keten wordt weergegeven door formule Ib, of door zodanig gemuteerde versies daarvan dat de functionaliteit van het Fv-fragment daardoor niet negatief beïnvloed wordt.

5. Recombinant DNA-molekuul volgens één der conclusies 1-4, met het kenmerk, dat de homologe promotorsequentie 30 de lac-promotor is.

6. Recombinant DNA-molekuul volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het recombinante DNA-molekuul stroomopwaarts van elk van de cistrons een 35 signaalpeptidesequentie bevat en stroomafwaarts van het tweede cistron een sequentie welke codeert voor het TAG1-polypeptide.

9 1 0 1 2 9 0

7. Recombinant DNA-molekuul volgens één der conclusies 1 tot 5, met het kenmerk, dat de cistrons voor de zware, resp. lichte keten met elkaar verbonden zijn door middel van een linker-sequentie volgens formule Ic, dat 5 stroomopwaarts van het ciston dat codeert voor de zware keten een signaalpeptide-sequentie is opgenomen en dat stroomafwaarts van het ciston dat codeert voor de lichte keten een sequentie welke codeert voor het TAG1-polypeptide is opgenomen.

10 8. Recombinant DNA-molekuul volgens conclusie 6 of 7, met het kenmerk, dat de signaalpeptide-sequentie afkomstig is van pelB.

9. E. coli-stam omvattende een recombinant DNA-molekuul volgens één der voorgaande conclusies.

15 10. E.coli-stam volgens conclusie 9, met het kenmerk, dat de stam het Fv-fragment van een antilichaam gericht tegen humaan interferon- $\Gamma$  tot expressie brengt.

11. E.coli-stam volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat de stam het Fv-fragment van het monoclonaal anti-  
20 humaan-interferon- $\Gamma$  antilichaam dat gesecreteerd wordt door de hybridoma-cel lijn D9D10, of gemuteerde versies daarvan, tot expressie brengt.

12. Werkwijze voor het produceren van een recombinant DNA-molekuul volgens één der voorgaande conclusies  
25 omvattende de stappen :

a) het lineariseren van een DNA-molekuul dat de homologe promotor- en terminatorgebieden bevat teneinde een lineair DNA-molekuul te verkrijgen;

b) het isoleren en verveelvoudigen van een variabel  
30 deel van de zware keten ( $V_H$ -fragment) van een gewenst antilichaam,

c) het ligeren van het lineaire DNA-molekuul en het  $V_H$ -fragment teneinde een eerste recombinant DNA-molekuul te verkrijgen;

35 d) het lineariseren van het eerste recombinante DNA-molekuul teneinde een eerste lineair DNA-molekuul te verkrijgen;

9 1 0 1 2 9 0

e) het isoleren en vermeerderen van een variabel deel van een lichte keten ( $V_K$ -fragment) van een gewenst antilichaam; en

f) het ligeren van het gelineariseerde eerste DNA-  
5 molekuul en het  $V_K$ -fragment voor het verkrijgen van een tweede recombinante DNA-molekuul.

13. Werkwijze volgens conclusie 12, met het kenmerk, dat de gewenste DNA-fragmenten worden vermeerderd door middel van Polymerase Chain Reactie.

10 14. Werkwijze volgens conclusie 12 of 13, met het kenmerk, dat het  $V_K$ -fragment een DNA-sequentie heeft volgens de formule Ia.

15 15. Werkwijze volgens één der conclusies 12-14, met het kenmerk, dat het  $V_H$ -fragment een DNA-sequentie heeft volgens formule Ib.

16. Werkwijze volgens één der conclusies 12-15, met het kenmerk, dat tussen de sequenties voor de zware, resp. lichte keten een linker-sequentie volgens formule Ic gekloond wordt.

20 17. Werkwijze voor het produceren van een recombinant Fv-fragment van een gewenst antilichaam, omvattende :

a) het produceren van een recombinant DNA-molekuul volgens één der conclusies 1-8;

25 b) het transformeren van een gastheercel cultuur met het recombinante DNA-molekuul teneinde een recombinante gastheercel te verkrijgen;

30 c) het kweken van de gastheercel cultuur onder zodanige condities dat de DNA-sequentie welke codeert voor het recombinante Fv-fragment tot expressie gebracht wordt; en

d) het isoleren van het recombinante Fv-fragment.

18. Werkwijze volgens conclusie 17, met het kenmerk, dat het recombinante Fv-fragment het Fv-fragment is van een anti-humaan-interferon- $\Gamma$  antilichaam dat gesecreteerd wordt  
35 door de hybridoma cellijn D9D10, of gemuteerde versies daarvan.

19. Werkwijze volgens één der conclusies 17 of 18, met het kenmerk, dat de gastheercel E.coli (DH5 $\alpha$ ) is.

9 1 0 1 2 9 0

20. Recombinant Fv-fragment van een antilichaam gericht tegen humaan interferon- $\Gamma$ , geproduceerd volgens de werkwijze volgens één der conclusies 17-19.

9 1 0 1 2 9 0



Formule Ia :

PstI

**CAG GTC CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCG GAG CTG AAG AAG CCT GGA**  
**GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAC ACC TTC ACA**  
**GAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA CAG GGT TTA**  
**AAG TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TAC ACT GGA GAG TCA ACA TAT**  
**GTT GAT GAC TTC AAG GGA CGC TTT GTC TTC TCT TTG GAA ACC TCT**  
**GCC AGT GCT GCC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AAT GAG GAC**  
**ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA AGG GGT TTT TAT GCT ATG GAC**  
**TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA**

BstEII

Formule Ib :

SacI

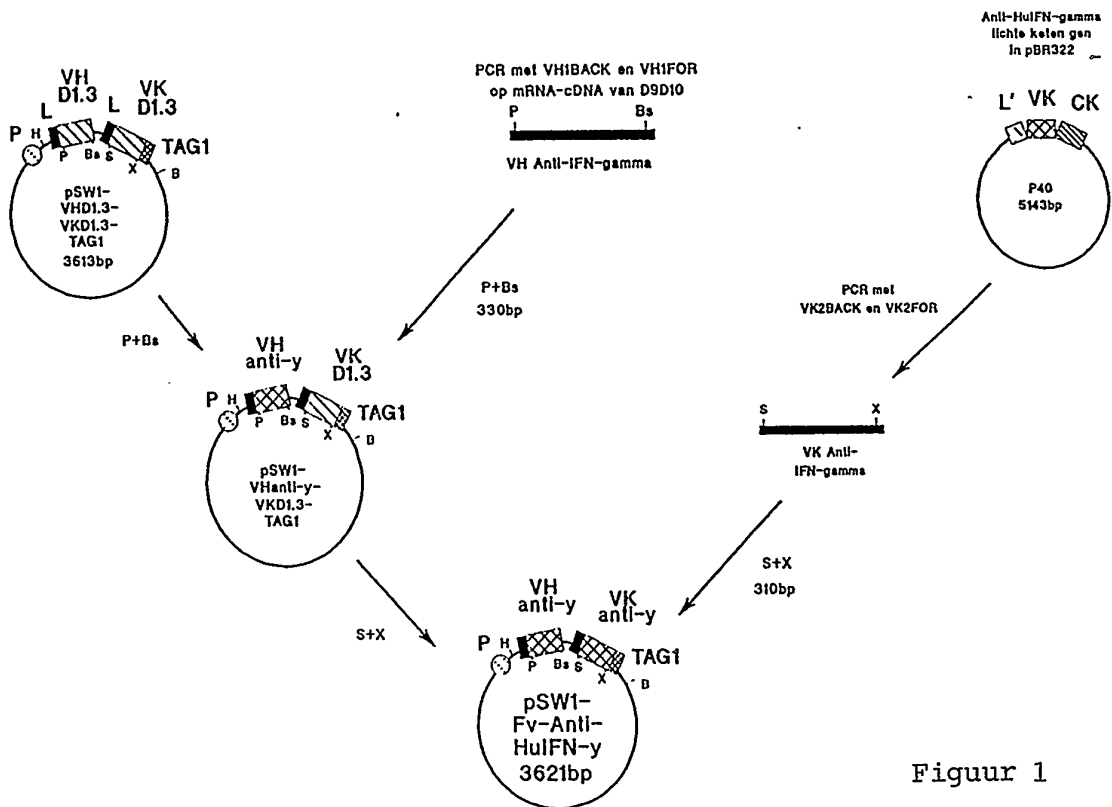
**GAC ATC GAG CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA**  
**GGG GAG AAG GTC ACC TTG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA AGT**  
**TAC ATG TTC TGG TAT CAC CAG AGG CCA GGA TCC TCC CCC AGA CTC**  
**CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC**  
**TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC**  
**CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TTC TGC CAT CAG TCG**  
**AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACC AAG CTC GAG ATC**  
**AAA**

XhoI

Formule Ic :

**GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG**

9101290



Figuur 1

9 1 0 1 2 9 0