



FI 000106128B



SUOMI - FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 106128 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

30.11.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/12, C12P 21/08, A61K 38/17
G01N 33/532

(21) Patentihakemus - Patentansökning

925043

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

06.11.1992

(24) Alkupaiva - Löpdag

30.03.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

06.11.1992

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/EP91/00614

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

07.05.1990 DE 4014510 P

(73) Haltija - Innehavare

- 1 •Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1, SAKSA, (DE)
- 2 •Universität Karlsruhe, Kaiserstrasse 12, 7500 Karlsruhe 1, SAKSA, (DE)
- 3 •Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 280, 6900 Heidelberg 1, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

- 1 •Herrlich, Peter, Vogelsang 8, 7500 Karlsruhe 41, SAKSA, (DE)
- 2 •Ponta, Helmut, Blankenlocherstrasse 12, 7515 Linkenheim, SAKSA, (DE)
- 3 •Günther, Ursula, Grenzacherstrasse 32, 4058 Basel, SVEITSI, (CH)
- 4 •Matzku, Siegfried, Schillerstrasse 9, 6901 Wiesenbach, SAKSA, (DE)
- 5 •Wenzel, Achim, Handschuhsheimer Landstrasse 86, 6900 Heidelberg, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Borenus & Co Oy Ab
Kansakoulukuja 3, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Muuntuneet CD44-pintaproteiinit, niitä koodaavat DNA-sekvenssit, näitä proteiineja tunnistavat ja niiden kanssa reagoivat vasta-aineet sekä niiden käyttö diagnostiikassa
Varianta CD44-ytproteiner, DNA-sekvenser som kodar för dem, antikroppar, vilka identifierar och reagerar med dessa proteiner samt deras användning i diagnostik

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Cancer Research 49 (1989) p. 1294-1299

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena ovat muuntuneet CD44-pintaproteiinit, näiden proteiinien muuntunutta determinanttia vastaan vaikuttavat vasta-aineet sekä menetelmät niiden valmistamiseksi. Keksinnön kohteena ovat lisäksi cDNA-sekvenssit, jotka koodaavat näitä muuntuneita proteiinikappaleita sekä näiden proteiinien tai niiden osien ja niitä vastaan vaikuttavien vasta-aineiden käyttö kasvaimien etäispesäkkeiden diagnostoiseksi ja hoitamiseksi.

Uppfinningen avser varianta CD44-ytproteiner, antikroppar mot dessa proteiners varianta determinanter och ett förfarande för framställning av dem. Uppfinningen avser även cDNA-sekvenser som kodar för dessa varianta proteinstycken samt användningen av dessa proteiner eller delar därav och antikroppar mot dem för diagnos och behandling av tumörmetastaser.

Muuntuneet CD44-pintaproteiinit, niitä koodaavat DNA-sekvenssit, näitä proteiineja tunnistavat ja niiden kanssa reagoivat vasta-aineet sekä niiden käyttö diagnostiikassa

Varianta CD44-ytproteiner, DNA-sekvenser som kodar för dem, antikroppar, vilka identifierar och reagerar med dessa proteiner samt deras användning i diagnostik

Keksinnön kohteena ovat muuntuneet CD44-pintaproteiinit, näiden proteiinien muuntuneita determinantteja tunnistavat ja niiden kanssa reagoivat vasta-aineet sekä menetelmät niiden valmistamiseksi, edelleen näitä muuntuneita proteiinikappaleita koodaavat DNA-sekvenssit sekä näiden proteiinien tai niiden osien tai niitä vastaan vaikuttavien vasta-aineiden käyttö kasvaimien etäispesäkkeiden diagnostiikassa.

Pahanlaatuisten kasvainsolujen varsinainen hengenvaarallisuus johtuu niiden kyvystä muodostaa etäispesäkkeitä. Alkuperäiset primäärikasvainsolut saavat tämän ominaisuuden luultavasti lukuisten, kasvaimen kehittymisen aikana tapahtuvien muutosten seurauksena. Näiden tapahtumien tuloksena alkuperäisestä kasvainmassasta irtoaa jatkuvasti syöpäsolumuunnoksia, jotka tunkeutuvat solun ulkopuolisen matriisin läpi ja kulkeutuvat imujärjestelmään tai verenkiertoon. Nämä etäispesäkkeitä muodostavat, usein toisiinsa liimautuneet syöpäsolut siirtyvät verenkierto- tai imujärjestelmässä ja poistuvat suonijärjestelmästä muissa paikoissa, joissa ne tunkeutuvat toisiin kudoksiin tytärkasvaimia muodostaen (yleiskatsauksia julkaisuissa Hart et al., 1989; Nicolson, 1987). Etäispesäkkeiden muodostuminen edellyttää lukuisia vuorovaikutuksia kasvainsolujen ja solujen välisen matriisin tai muiden solujen välillä. Lähes kaikissa näissä vuorovaikutuksissa tarvitaan solun pintakomponentteja kuten esimerkiksi reseptoreita matriisia ja laminaa varten, pintaan sitoutuneita proteolyttisiä entsyymejä sekä solun tarttumismolekyyliä, mukaan lukien ne molekyylit, jotka aiheuttavat elinspesifistä tarttumista ja jotka johtavat näin ollen siihen, että etäispesäkkeitä muodostuu herkemmin tiettyihin elimiin, tämän lisäksi kasvutekijöitä sekä kasvutekijöiden reseptoreita.

Tunnettua on se, että rotassa esiintyvistä BSp73-kasvaimesta peräisin olevien, etäispesäkkeitä muodostavien ja niitä muodostamattomien kasvainsolujen kalvoproteiinit eroavat toisistaan, mikä on osoitettu vasta-ainereaktiolla (Matzku et al., 1983 ja 1989).

Tämän jälkeen on todettu, että etäispesäkkeitä muodostavat BSp73ASML-kasvainsolut sisältävät sellaista pintaproteiinia, joka vastaa osittain tunnettua, lymfosyyttien tarttumiseen sekä solu-solu- ja solu-matriisi-vuorovaikutukseen osallistuvaa glykoproteiinia (ihmisen normaaleista glykoproteiineista käytetään merkitä CD44, Hermes-1, hiiren vastaavista: Ppg-1 ja rotan vastaavista HEBFlu). Tämä uusi poikkeava eli muuntunut CD44-pintaproteiini eroaa kuitenkin näistä tunnetuista sekvensseistä 154 aminohappoa käsittävän, solun ulkopuolisen alueen (SUA) suhteen, joka alue on sijoittunut ihmisen CD44-sekvenssissä 220. ja 237. aminohapon väliin (vastaavasti hiiren sekvenssissä 224. ja 239. aminohapon väliin). Tämä uusi glykoproteiini näyttää olevan hyvin merkittävä solu-matriisitali solu-solu-sitoutumisen kannalta etäispesäkkeiden muodostuessa. Näin ollen tämän proteiini-alueen (SUA) valmistus ja sen tunnusomaisten piirteiden selvittäminen ovat oheisen keksinnön eräs tehtävä. Pernasoluja, jotka muodostavat muuntuneen CD44-pintaproteiinin SUA:ta vastaan vaikuttavia vasta-aineita, tuotettiin immunoimalla hiiriä BSp73ASML:sta saaduilla kalvoproteiineilla. Ne fuusioitiin myeloomasoluihin Köhler:in menetelmällä (1981) polyetyleeniglykolia käyttäen pysyvien viljelmien aikaansaamiseksi. Tätä uutta proteiini-osa- SUA spesifisetti vastaan vaikuttavia vasta-aineita saadaan kloonaamalla ja valikoimalla ne viljelmät, joiden tuottamat vasta-aineet reagoivat BSp73ASML:n kanssa, mutta eivät kuitenkaan reagoi etäispesäkkeitä muodostamattoman perusmuodon BSp73AS:n kanssa eikä myöskään muiden, kasvaimia aiheuttamattomien rottasolujen kanssa. Muita tutkimuksia varten valittiin monoklonaalinen vasta-aine, joka värjää BSp73ASML-soluja erityisen voimakkaasti immunofluoresenssikokeessa, ja josta käytetään merkintää mAb1.1ASML (mAb = monoklonaalinen vasta-aine).

Westernblot-kokeessa BSp73ASML-solujen proteiinihydrolysaatista voidaan määrittää mAb1.1ASML:llä 4 proteiinivyöhykettä, joiden molekyylipainot ovat 120 000, 150 000, 180 000 ja 200 000, kun taas rotan fibroblastisolujen ja rotasta peräisin olevien, etäispesäkkeitä muodostamattomien kasvainsolujen uutteen eivät tuottaneet merkittävää reaktiota. Vielä ei olla kyetty määrittämään sitä, johtuvatko nämä kokoerot erilaisista alkuperäisistä aminohapposekvensseistä vai proteiineissa jälkikäteen tapahtuneista, voimakkuudeltaan erilaisista muokkauksista. Joka tapauksessa vasta-aineen tunnistama epitooppi on läsnä näissä kaikissa 4 proteiinilajissa, sen puuttuessa vertailuna käytetyistä proteiineista, jotka oli saatu etäispesäkkeitä muodostamattomista BSp73AS-soluista tai normaaleista rottasoluista.

Pintaproteiinin SUA:ta koodaavien cDNA-sekvenssien eristäminen

Monoklonaalista vasta-ainetta mAb1.1ASML käytettiin SUA:ta koodaavien cDNA-sekvenssien löytämiseksi bakteeriperäisestä ilmentämiskirjastosta. Tämä kirjasto muodostettiin BSp73ASML-soluista peräisin olevan polyA⁺ RNA:n ja pEX-vektorijärjestelmän avulla (Stanley & Luzio, 1984). Näiden cDNA-sekvenssien koodaamat tuotteet ilmaistaan β -galaktosidaasi-fuusioproteiineina vasta-aineiden avulla. Tällä tavalla eristetty, monoklonaalisen vasta-aineen 1.1ASML suhteen positiivinen cDNA-kloonin, josta käytetään nimitystä pEX34, käsittää 167 nukleotidin pituisen cDNA-sekvenssikappaleen. Sitten tätä cDNA-kappaletta käytettiin hyväksi vektorissa pSP65, joka sekin oli saatu BSp73ASML-RNA:sta, läsnäolevan suuremman cDNA-kirjaston tutkimiseksi. Erästä näistä tällä tavalla eristetyistä klooneista, pM66, käytettiin sitten, niinkutsuttua "aluke"-pidennystä (lähtöoligonukleotidi) ja polymeraasi-ketjureaktiota (PCR) apunakäyttäen, täysipituisen cDNA-kloonin pMeta-1 eristämiseen. Osoitus täydestä pituudesta saatiin alukepidennyksen (3207 nukleotidiä) avulla. Kolineaarisuus BSp73ASML-kasvaimesta peräisin olevan RNA:n kanssa todettiin RNAasi- ja S1-suoja-analyysillä.

cDNA-sekvenssien eristäminen bakteereissa toteutetulla ilmentämisellä ja vasta-aineen avulla tunnistamalla osoittaa, että vasta-aine tunnistaa primäärin aminohapposekvenssin pintaproteiinin SUA:han kuuluvan primäärin aminohapposekvenssin.

SUA:ta koodaava lähetti-RNA ilmentyy BSp73ASML-soluissa, mutta ei BSp73AS-soluissa

cDNA-klooneista muodostettiin kolme erilaista sekvenssikoetinta spesifisten lähetti-RNA-molekyylien osoittamiseksi hybridisaatiolla. Koetin A peittää sen cDNA-alueen, johon SUA on koodautunut (asemat 941-1108). Koetin B edustaa asemien 1403-1572 välisiä sekvenssejä ja koetin C käsittää pMeta-1:n alusta asemaan 794 ulottuvia sekvenssejä (kuvio 1). BSp73-kasvainsolulinjojen poly A+ RNA erotettiin elektroforeettisesti ja analysoitiin RNA-siirtohybridisaation avulla. Neljä niistä solulinjoista, jotka eivät muodosta etäispesäkkeitä, ei sisällä sellaista RNA:ta, joka on homologinen koettimen A suhteen, kun taas etäispesäkkeitä muodostavista kasvainsoluista BSp73ASML peräisin olevat RNA-molekyylit reagoivat voimakkaasti. Koetin A tunnistaa tästä RNA-preparaatista alueella 2,2-3,3 kb olevien erikokoisten RNA-molekyylien heterogeenisen seoksen sekä yhden suuremman, 4,9 kb:n suuruisen RNA-lajin. Monoklonaalisen vasta-aineen 1.1ASML tunnistamien spesifisten kalvoproteiinien ilmentyminen yksinomaan etäispesäkkeitä muodostavissa kasvainsolumuunnoksissa johtuu ilmeisesti vastaavien SUA:ta koodaavien lähetti-RNA-molekyylien erityisestä ilmentymisestä. Ilmeisesti täydellinen cDNA-kloonin pMeta-1, jonka suuruus on 3,2 kb, ei kykene edustamaan tämän RNA-lajin kaikkia sekvenssejä. Se voi esittää vain yhtä lajia erikokoisten RNA-molekyylien heterogeenisesta seoksesta. Koettimilla B ja C saadaan sama hybridisaatiokuva kuin koettimella A BSp73ASML RNA:n erotuksessa, ainakin siinä määrin kuin mitä tämän heterogeenisyyden puitteissa voidaan todeta, toisin sanoen nämä RNA-lajit käsittävät sekvenssejä, jotka täydentävät kaikkia kolmea koetinta A, B ja C. Toisin kuin koetin A koetin B ja C tunnistavat myös lähetti-RNA-lajeja etäispesäke-

keitä muodostamattomissa solulinjoissa. Nämä RNA-koot eroavat kuitenkin selvästi BSp73ASML-soluissa esiintyvistä pituuksista, sillä neljä selvästi erottuvaa lähetti-RNA-lajia voidaan osoittaa, joiden lähetti-RNA-molekyylien pituus on 1,5, 2,0, 2,9 ja 4,3 kb. Vaikka näitä RNA-lajeja voikin olla piilossa BSp73ASML-soluista peräisin olevien RNA-molekyylien heterogeenisessä seoksessa, niin kuitenkin on varmaa, ettei niitä esiinny samanlaisena määränä BSp73ASML-soluissa. Ratkaisevaa on se, että koetinta A täydentävät RNA-sekvenssit puuttuvat ilmeisesti täydellisesti soluista, jotka eivät muodosta etäispesäkkeitä. Tämän perusteella voidaan siis vetää se varovainen johtopäätös, että koettimien A, B ja C sekvenssit ovat läsnä samoissa RNA-molekyyliissä etäispesäkkeitä muodostavan kasvaimen tapauksessa siten, että ikäänkuin koettimen A sekvenssit olisivat jatkostuneet B-C-positiivisiin RNA-molekyyliihin ja ikäänkuin tätä vaihtoehtoista jatkostumistapahtumaa esiintyisi vain etäispesäkkeitä muodostavassa solulinjassa.

Sl-nukleaasi- ja RNAasi-suoja-analyyseja tehtiin RNA:n ja cDNA:n välisen kolineaarisuuden osoittamiseksi ja BSp73AS- ja BSp73ASML-soluista peräisin olevien RNA-molekyylien välisen erilaisuuden analysoimiseksi. Suojatut DNA- tai RNA-kappaleet voivat olla vain kokopituutta lyhyempiä, koska 5'-päättävät vektorisekvenssejä, jotka eivät kykene hybridisoitumaan kasvainsoluista peräisin olevien RNA-molekyylien kanssa. Ensin tarkastellaan 3'-puolen siirtymäkohtia: siirtymä sekvensseistä, joilla on homologiaa koettimen A kanssa, sekvensseihin, joilla on homologiaa koettimen B kanssa. Kummallakin tekniikalla BSp73AS-soluista todetaan yksi ainoa RNA-laji, joka on koettimien kanssa kolineaarinen laajalla alueella. Siitä 5'-suuntaan cDNA- tai RNA-koetin, joka vastaa BSp73ASML-soluista saatuja RNA-sekvenssejä, eroaa BSp73AS-soluista peräisin olevasta RNA:sta. BSp73ASML-soluista peräisin olevat RNA-molekyylit sisältävät ennen kaikkea sekvenssejä, jotka suojaavat koettimien suurempia kappaleita. Suurimmat kappaleet vastaavat suoja-analyysiin tarjottujen DNA- tai RNA-kappaleiden täyttä pituutta. Myös pienempiä kappaleita voidaan osoittaa. Koska RNA-siirtohybridisaatiot ovat paljastaneet erikokoisten RNA-mole-

kyyliin heterogeenisen seoksen, niin mahdollista on se, että nämä pienemmät suojatut kappaleet osoittavat RNA-lajeja, jotka poikkeavat cDNA:sta jostain muusta kohdasta, eli kohdista, jotka sijaitsevat aikaisemmin osoitetun poikkeamispisteen ja tarjottujen koettimien 5'-pään välissä. Myöskään näitä RNA-lajeja ei kyetä osoittamaan BSp73AS-soluista.

Seuraavaksi tarkastellaan 5'-puolella olevaa poikkeamispistettä eli siirtymää koettimen C kanssa hybridisoituvista sekvensseistä sekvensseihin, jotka hybridisoituvat koettimen A eli SUA:ta koodaavan sekvenssin kanssa. Analyysi tuottaa vastaavia tuloksia 5'-murtopisteelle. BSp73AS-soluista peräisin olevat RNA:t voivat suojata tarjottuja koettimia vain pienellä alueella. BSp73ASML-soluista peräisin olevat lähetti RNA:t suojavat pitempiä kappaleita. Ne ovat nimittäin kolineaarisia tarjottujen koettimien koko pituuden suhteen. Niinpä voidaan päätellä, että cDNA-klooni pMeta-1 edustaa sekvenssejä, jotka korostuvat etäispeäkkeitä muodostavissa kasvainsoluissa BSp73ASML. 3'- ja 5'-alueita todetaan myös BSp73AS-soluista peräisin olevista RNA-molekyyleistä. SUA:ta koodaavat sekvenssit, joiden käsittämät siirtymäkohdat voidaan kartoittaa näillä edellä kuvatuilla tekniikoilla, osoittavat, että vaihtoehdoisen jatkostusmekanismin on esiinnyttävä RNA-muodostuksessa. SUA-sekvensseihin johtavien siirtymäkohtien 5'- ja 3'-murtopisteet on esitetty kuviossa 1 nuolilla.

Monoklonaalinen vasta-aine 1.1ASML tunnistaa glykoproteiinin CD44 erään muuntuneen muodon

Rakennetietojen saamiseksi pintaproteiinista kaikkien kloonattujen cDNA-molekyylien sekvenssi on määritetty. Täysipituinen kloonin pMeta-1 nukleotidisekvenssi ja siitä päätelty aminohapposekvenssit on esitetty kuviossa 2. Täysipituinen cDNA-klooni käsittää 3207 nukleotidia. 3'-päänteessä on polyA-pää, kaksi ylimääräistä polyadenylointisignaalia sijaitsee asemilla 2288 ja 1743. Ensimmäinen ATG-kodoni sijaitsee konsenssi-aloitussekvenssin jälkeen ja avaa 1509 nukleotidia käsittävän, 503 aminohappoa vastaavan lukukehyksen. Kuten kalvoproteiinin

tapauksessa onkin odotettavaa, ensimmäiset 21 aminohappoa ovat hydrofobisia ja esittävät signaaliptidiä. Tähän saakka mitään osaa näistä sekvensseistä ei löydy tietokannoista. Keksinnön puitteissa todettiin kuitenkin sekvenssihomologiaa verrattuna vähän aikaa sitten julkaistuihin tietoihin lymfossyyttien Homing-reseptorista CD44 (tai vastaavasti Pgp-1) (Idzerda et al., 1989; Goldstein et al., 1989; Stamenkovic et al., 1989; Nottenburg et al., 1989; Zhou et al., 1989). Nämä homologiat rajoittuvat tiukasti cDNA:n 5' - ja 3' -osiin, luke-matta jääneet alueet mukaan lukien, ja ne päättyvät jo edellä mainittuihin, BSp73AS ja BSp73ASML RNA-sekvenssien välisiin poikkeamispisteisiin. Koko poikkeamispisteiden välinen pätkä (esitetty kuviossa 2 värimerkinnällä), eli etäispesäkkeille spesifistä SUA:ta koodaavan sekvenssin koko pätkä, ei ole läsnä Pgp1- eikä CD44-sekvensseissä. Etäispesäkkeille spesifi-nen glykoproteiini on ilmeisesti CD44-glykoproteiinin muunnos. Se käsittää nimittäin 156 aminohaposta koostuvan, ylimääräi-sen, solun ulkopuolisen domeenin ja näin ollen 410 aminohappoa käsittävän laajentuneen, solun ulkopuolisen alueen (vähennetty-nä 21 aminohaposta koostuvalla signaaliptidillä) verrattuna 270 aminohaposta (myös vähennettynä signaaliptidillä) muodos-tuvaan muuttumattomaan CD44-glykoproteiiniin. Etäispesäkkeitä muodostamattomista BSp73AS-soluista löytyy kuitenkin tämän CD44-perheen muuntumattomia muotoja. Näiden BSp73AS-RNA-mole-kyyliin cDNA-sekvenssit on myös kloonattu, ja samanlaisuus etäispesäkkeille spesifisten kloonien kanssa ylimääräisen domeenin ulkopuolella on osoitettu.

CD44-muunnoksen ilmentyminen ja etäispesäkkeiden muodostamis-kyky korreloivat keskenään

Keksinnön puitteissa tutkittiin rotan isogeenisten kasvainsolulinjojen toista sarjaa, nimittäin maitorauhaskarsinoomajär-jestelmän 13762 NF kasvainsolulinjoja (Neri et al., 1982), millä pyrittiin selvittämään, ilmentyvätkö muuntuneet CD44-gly-koproteiinit poikkeuksetta BSp73ASML-soluissa ja liittyvätkö ne näiden solujen kykyyn muodostaa etäispesäkkeitä vai yleises-ti etäispesäkkeiden muodostumiseen. Tässä tutkimuksessa emokas-

vaimesta johdettuja solulinjoja, eli MTPa-, MTC-, MTF7- ja MTA-soluja (ryhmä 1) verrattiin imusolmukkeista tai keuhkoissa esiintyvistä etäispesäkkeistä saatuihin solulinjoihin eli MTLy-, MTLn2-, MTLn3-soluihin (ryhmä 2). Ryhmän 1 solut ilmentävät olennaisesti normaalia CD44-kuviota, joka on BSp73AS-soluista peräisin olevien RNA-molekyylien kaltainen, koettimella B hybridisoitaessa. Sitä vastoin koettimella A saadaan osoitukseksi pieni määrä sekavaa RNA-massaa, jonka koko on noin 2,5 kb. Toisaalta ryhmään 2 kuuluvilla soluilla on täysin erilainen RNA-kuvio. Molemmat koettimet A ja B hybridisoituvat suurempiin RNA-lajeihin. Nämä koot ovat samankaltaisia kuin BSp73ASML-soluista osoitetut koot. Tämä samankaltaisuus varmistetaan myös RNAasi- ja S1-suoja-analyysin. Näiden tulosten perusteella päätellään, että RNA:n jatkostumiskuvion muuttuminen ja CD44-muunnoksen ilmentyminen liittyvät jollakin tavalla etäispesäkkeiden muodostumiseen, ja että tämä syntynyt kuvio näissä etäispesäkkeitä muodostavissa maitorauhaskarsinooman soluissa vastaa läheisesti edellä etäispesäkkeitä muodostavan BSp73ASML-solulinjan yhteydessä kuvattua kuviota. Suurimolekyylliset, vasta-aineen avulla tunnistetut proteiinit vastaavat kumpaakin suurimolekyyllistä proteiinilajia, jotka on osoitettu BSp73ASML-uutteista. Tästä maitorauhaskasvainsarjassa todetaan siis samoin RNA-lajien ja suurimolekyyllisten proteiinien etäispesäkkeille spesifistä ilmentymistä. Sen, että ryhmästä 1 eli niinkutsutuista emäsolulinjoista löydetään ylipäättään sellaista RNA:ta, joka hybridisoituu koettimen A eli SUA:ta koodaavan sekvenssin kanssa, ja että erään proteiinin, jonka molekyypaino on 100 000 Daltonia, heikko värjäytyminen voidaan todeta vasta-aineen avulla, katsotaan johtuvan siitä, että ryhmään 1 kuuluvilla soluilla on myös vähäistä kykyä muodostaa etäispesäkkeitä toisin kuin alkuperäisellä kasvainsolulinjalla BSp73AS, jolla ei ollut lainkaan etäispesäkkeiden muodostumiseen johtavaa käyttäytymistä.

Monoklonaalinen vasta-aine 1.1ASML tunnistaa etäispesäkkeiden muodostumisen rotassa

Eräässä koesarjassa etäispesäkkeiden muodostamiseksi kasvainso-

lulinjan BSp73ASML soluilla isogeenisissä rotissa rottiin injektoitiin ihon alaisesti näitä soluja ja eri ajanhetkillä monoklonaalista vasta-ainetta 1.1ASML vatsaontelon sisäisesti kahden...kolmen vuorokauden välein ennen kasvainsolujen antamista ja sen jälkeen. Tämän immunologisen kokeen puitteissa määritettiin myös se, millä tavalla rotan immuunivaste injektoidulle vasta-aineelle kehittyi. Eläimissä kehittyi nimittäin antihiiri-imunoglobuliinivasta-aineita sekä anti-idiotyyppi-vasta-aineita. Tästä koesarjasta saatiin tulokseksi se, että 1.1ASML-injektiot hidastivat huomattavasti kasvaimen kiinnikavamista ja etäispesäkkeiden muodostumista. Tämän viivästymisen kinetiikasta voidaan vetää se johtopäätös, että vasta-aine häiritsee jotakin etäispesäkkeiden muodostumiseen liittyvää primääriä prosessia. Tämä koe osoittaa, että vasta-aineen tunnistamalla proteiinirakenteella, joka sijaitsee etäispesäkkeitä muodostavien solujen pinnalla, on jokin merkitys etäispesäkkeiden muodostumisessa ja diagnoositavoitteet ovat realistisia.

Rotan cDNA:n SUA:ta koodaavan sekvenssiosan suhteen homologisen ihmisekvenssin eristäminen

Viljelmänä olevien, ihmisestä saatujen kasvainsolujen tapauksessa ei luonnollisestikaan ole ilman muuta mahdollista selvittää, rottajärjestelmässä toteutetulla tavalla, onko soluilla vielä etäispesäkkeiden muodostumista aiheuttavia ominaisuuksia. Immuunivajailta hiirillä toteutettujen kokeiden perusteella voidaan vetää vain hyvin rajoitetusti päätelmiä kyvystä muodostaa etäispesäkkeitä ihmisessä. Tästä syystä suhteellisen monista kasvainsolulinjoista, joista on tehty viljelmiä jo kauan aikaa sitten jossain päin maailmaan, oli selvitettävä, ilmentyikö niissä sekvenssejä, joita voitiin osoittaa oheisen keksinnön puitteissa rotan etäispesäkkeistä. Keksinnön puitteissa onnistuttiin löytämään yksi tällainen kasvainsolulinja. Se on peräisin ihmisen suurisoluisesta keuhkosyövästä, ja sille on annettu numeroksi LCLC97. Tästä kasvainsolulinjasta voidaan osoittaa kolme määrättyä RNA-lajia (koot: 5,5, 3,4 ja 2,8 kb), jotka käyttäytyivät täysin niiden RNA-molekyylien

tavoin, joita RNA-molekyylejä on voitu osoittaa rotasta peräisin olevista, etäispesäkkeitä muodostavista kasvainsolulinjoista. Ne hybridisoituvat nimittäin sekä koettimeen A että myöskin koettimiin B ja C, mikä tarkoittaa sitä, että myös nämä ihmisestä saadut RNA-lajit ovat laajoilta alueilta samantlaisia kuin cDNA pMeta-1-klooni (85-prosenttisesti).

Monoklonaalinen vasta-aine 1.1ASML ei reagoanut kuitenkaan tämän kasvainsolun kanssa, toisin sanoen vasta-aineen tunnistaman proteiiniosan on erottava antigeenideterminanttien alueen suhteen niistä proteiineista, joita esiintyy ihmisestä peräisin olevan kasvainsolun pinnalla. Reagoimattomuuteen riittävät jo pienimmätkin poikkeamat vasta-aineiden suuresta spesifisyydestä johtuen. Tätä ihmisen kasvainsolua LCLC97 käytettiin nyt pelkästään cDNA-kirjaston muodostamiseen. Rotta- ja ihmissekvenssien välisen suuren yhtäpitävyyden perusteella voitiin eristää yksi cDNA-klooni, jolla oli homologiaa koettimeen A. Ihmisen cDNA:n sekvenssi määritettiin. Kuviossa 3 (a,b) on esitetty primääriketju ja siitä päätelty aminohapposekvenssi. Voidaan todeta, että rotta- ja ihmissekvenssit ovat keskenään samantlaisia laajoilla alueilla. Tämä ihmissekvenssi sekä siitä päätelty aminohapposekvenssi ovat samoin oheisen patenttijulkaisun kohteina.

Suoritus-esimerkit

Solut ja vasta-aineet

Tutkimuksissa käytettiin seuraavia kloonattuja Bsp-solulinjoja: BSp73 14ASML-1 ja 10AS-7, joita pidettiin viljelmissä julkaisussa Matzku et al., (1983) kuvatulla tavalla; lisäksi julkaisussa Neri et al., (1982) kuvatut maitorauhassyövän solulinjat.

BSp73 ASML-kalvoproteiineja tunnistavia monoklonaalisia vasta-aineita valmistettiin immunoimalla Balb/c-hiiriä. Sen jälkeen, kun immunoidun hiiren pernasolut oli eristetty, ne fuusioitiin Ag8-myeloomasoluihin niiden saamiseksi kuolemat-

tomaan muotoon, käyttäen Köhler:in (1981) menetelmää monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamiseksi. Tällä tavalla saadut hybridomasolut seulottiin sellaisten solujen löytämiseksi, joiden solujen tuottama vasta-aine vaikutti spesifisesti BSp73ASML-soluja vastaan, ei kuitenkaan BSp73AS-soluja eikä rotan normaaleja fibroblastisoluja vastaan. Täsmällinen menetelytapa on kuvattu julkaisussa Matzku et al. (1989).

Toivotulla tavalla spesifistä monoklonaalista vasta-ainetta (mAk) tuottavien hybridomasolujen annettiin lisääntyä kudostiljelmässä ja viljelyalustaan erittynyt mAk väkevöitiin voimakkaasti ammoniumsulfaatilla saostamalla ja pylväskromatografiaa apunakäyttäen (proteiini A-Sepharose ja MonoQ) ja sitä käytettiin tässä muodossa oheisissa tutkimuksissa. Eräs näistä vasta-aineista on mAk1.1ASML.

Immuunifluoresenssi

Muuntuneen CD44-molekyylin osoittamiseksi erilaisten kasvainsolujen pinnalta nämä solut siirrettiin viljelmään, ne pestiin fosfaatilla puskuroidulla keittosuolaliuoksella (PBS) ja niitä inkuboitiin 1.1ASML:n kanssa 30 minuuttia 40 °C:n lämpötilassa. Sekundäärisenä vasta-aineena sitoutumisen osoittamiseksi käytettiin rodamiiniin kytkettyä kaniinin anti-hiiri IgG:tä ja havainnot tehtiin fluoresenssimikroskoopilla.

cDNA-ilmentämiskirjastojen muodostaminen ja immuuniseulonta

BSp73ASML-soluista peräisin olevan polyA⁺ RNA:n alukkeena käytettiin oligo (dT):tä ja koostumukseltaan erilaisia heksanukleotidejä, ja cDNA:n ensimmäinen juoste syntetisoitiin AMV:stä saadun käänteiskopioijaentsyymin avulla. cDNA:n toinen juoste valmistettiin E. coli DNA-polymeraasi I:n RNAasi H:n ja E. coli-ligaasin avulla, minkä jälkeen kaksijuosteisen cDNA:n päät korjattiin T4 DNA-polymeraasin avulla. Vektorit pEX1, 2 ja 3 (Stanley ja Luzio, 1984), jotka tekevät mahdolliseksi cDNA:n fuusioimisen kolmeen erilaiseen lukukehykseen, avattiin SmaI-restriktioendonukleasilla ja ligatoitiin cDNA:n kanssa

(T4 DNA-ligaasi). Kyvykkäät E. coli DH5-bakteerit (pCI857), jotka tuottavat lämpötilaherkkää repressoria, transfektoidaan pEX-cDNA-muodosteella ja niitä viljellään nailonsuodattimilla. Lämpötilaherkän repressorin RCI857 geeni sijaitsee plasmidissa pCI857, joka sopii yhteen pEX-plasmidien kanssa. λ P_R-promoottori, joka ohjaa fuusioproteiinien synteesiä, ei toimi 28 °C:n lämpötilassa. Kun lämpötila nostetaan arvoon 42 °C CI-repressori inaktivoituu ja β -galaktosidaasi/ASML-fuusioproteiinien synteesi käynnistyy erittäin voimakkaana. Sitten suodattimien päällä olevat, lämmön avulla indusoidut bakteripesäkkeet denaturoidaan kloroformihöyryllä, sitten niitä inkuboidaan PBS-liuoksessa, joka sisältää 3 % kuivamaitojauhetta, lysotsyymiä ja DNAasia. Näille nailonsuodattimille kiinnitettyjä bakteri-peräisiä fuusioproteiineja inkuboidaan nyt mAk1.1ASML:n kanssa, epäspesifisesti sitoutunut mAk pestään pois, minkä jälkeen sitoutuminen osoitetaan käyttämällä sekundaarisena vasta-aineena ¹²⁵I-merkittyä kaniinin anti-hiiri-IgG:tä. Autoradiografian jälkeen alkuperäiseltä bakterisuodattimelta eristettiin positiivisia klooneja, jotka analysoitiin pääpiirteissään. Eräs kloonin, jonka syntetisoima fuusioproteiini reagoi spesifisesti 1.1ASML:n kanssa, oli pEX34. Bakterikloonin sisältämä pEX-plasmidi käsittää 167 nukleotidin pituisen cDNA:n, johon on koodautunut mm. epitooppi (tai antigeenideterminantti), jolla mAk1.1ASML on spesifinen.

Täysipituisen cDNA mMeta-1:n eristäminen tapahtui sitten standardimenetelmien mukaisesti.

Rottien immunointi mAk1.1ASML:llä

BDX-rottiin, jotka ovat syngeneisiä BSp73-kasvainsolujen suhteen, injektoidiin ihonalaisesti tai vatsaontelon sisäisesti mAk1.1ASML:ää (liitettynä keyhole limpet-nilviäisen hemosyaniiniin) yhdessä Freund'in täydellisen apuaineen kanssa. Ensimmäinen injektio annettiin (kypälän rasvakerrokseen) 10, 7 ja 3 vuorokautta ennen BSpASML-solujen injektointia, seuraavat injektiot annettiin sitten 3, 7, 11, 14 ja 21 vuorokautta tämän jälkeen. Rotat tapetaan 28 vuorokauden kuluttua, eri

imusolmukkeet erotetaan, punnitaan ja keuhkoissa esiintyvät, makroskooppisesti näkyvät etäispesäkkeet lasketaan.

Muuntuneiden CD44-pintaproteiinien ilmentymisen ja etäispesäkkeiden muodostamiskyvyn välinen riippuvuus

Toista rotan kasvainsolulinjojen joukkoa, joka oli saatu 13762NF-maitorauhaskarsinoomasta (Neri et al., 1982), tutkimala pyrittiin selvittämään se, onko muuntuneiden CD44-glukoproteiinien ilmentyminen pelkästään tutkitun BSp73ASML-solulinjan ominaisuus, vai voidaanko tämän ilmentymisen katsoa liittyvän kykyyn muodostaa etäispesäkkeitä. Lisäksi primäärikasvaimista saatuja solulinjoja [MTPa, MTC, MTF7 ja MTA (ryhmä 1)] verrattiin solulinjoihin, jotka olivat peräisin imusolmukkeissa ja keuhkoissa esiintyvistä etäispesäkkeistä [MTLy, MTLn2, MTLn3 (ryhmä 2)]. CD44:stä saadun RNA:n kuvio on esitetty kuviossa 4, koettimien A, B ja D vastatessa tämän hakemuksen sivulla 4 sekä kuviossa 1 kuvattuja koettimia. Kaikilla ryhmään 1 kuuluvilla soluilla saadaan koetinta B käyttäen normaali CD44-kuvio. Sitävastoin ryhmään 2 kuuluvilla soluilla saadaan tästä poikkeava kuvio. RNA on suurempi kuin ryhmän 1 RNA, ja se vastaa BSp73ASML:n RNA:ta. Pienemmät RNA:t menetetään koettiin D hybridisoitaessa. Kuvion loppuosasta nähdään rotan kummankin kasvainjärjestelmän välinen samankaltaisuus.

Myös koetinta A käyttäen saatu ryhmän 2 RNA-kuvio vastaa BSp73ASML:n kuviota. Koetin A ei hybridisoidu BSp73ASML:stä peräisin olevaan RNA:han, kun taas ryhmään 1 kuuluvilla soluilla saadaan pieni sekava, 2,5 kb:n RNA-vyöhyke. Myös RNaa-silla ja S1-nukleasilla toteutetut suoja-analyysit osoittavat rakenteellisen samankaltaisuuden. Näiden tulosten perusteella pilkkomiskuviossa ja muuntuneiden CD44 RNA-molekyylien ilmentymisessä tapahtuu muutos etäispesäkkeiden muodostuessa.

Etäispesäkkeiden muodostamiskyvyn siirtäminen etäispesäkkeitä muodostamattomiin BSp73AS-soluihin pMeta-1:tä yli-ilmentämällä

Muuntuneiden CD44-lajien ilmentymisen ja etäispesäkkeiden muodostumiskyvyn välinen riippuvuus kahdessa rotan kasvainsarjassa viittaa siihen, että näillä glykoproteiineilla on syy-yhteyttä etäispesäkkeiden muodostumisessa. Tämän tutkimiseksi pMeta-1 siirrettiin BSp73AS-soluihin, minkä jälkeen selvitettiin, muuttaako tämä näiden solujen käyttäytymistä. pMeta-1:n (kuvio 2) täydellinen koodaava alue sijoitettiin SV40-promootorin alapuolelle, ja tämä muodoste (kaavio kuviossa 5) istutettiin yhdessä PSV2neo:n kanssa BSp73AS-soluihin. Tällä tavalla saatiin yksittäisiä G418:lle vastustuskykyisiä ja pMeta-1:tä ilmentäviä pesäkkeitä. Kuviossa 5 on esitetty kahdesta pesäkkeestä saatu RNA-kuvio. Muuntuneelle CD44:lle spesifisen koettimen A hybridisaatio osoittaa noin 2,2 kb:n suuruisen hallitsevan kopion, joka vastaa kokonsa puolesta pienintä yleisintä, BSp73ASML-soluissa kopioituvaa RNA:ta (kuvio 5). Transformoidut solut sisältävät kuitenkin tätä RNA:ta noin 10-kertaa enemmän kuin BSp73ASML.

Toisenlaisia suuruusluokkia todetaan eräässä transfektoidussa solussa (BSp73ASML-pSVMeta1-14), mikä saattaa riippua plasmidin yhdentymiskohdasta. pSV2neo-simulointisiirtokloonin (ei esitetty) ja vastaanottavat BSp73AS-solut eivät sisällä sellaista RNA:ta, joka olisi koetinta A täydentävä vastine. Endogeenisten normaalien CD44-kopioiden (ilman pSVMeta-1:n ylimääräistä domeenia) havaitsemiseksi transfektanteista suodatin paljastettiin ja siihen hybridisoitiin koetin D. Lukematta jääneen 3'-sekvenssin tämä osa ei ole läsnä ilmentymiskloonissa (vrt. kuvio 5). Koetin D osoittaa kaksi pääasiallista, 2,9 ja 4,9 kb:n suuruisia kopiota kummankin transfektantin RNA:ssa (kuvio 5 oikea sarake), sekä vertailussa BSp73AS että myöskin BSp73AS-pSVneo:ssa, jota ei olla esitetty.

Erilaisten yhtäpitävien hybridisointien likimääräinen kvantitointi osoittaa, että nämä transfektantit ilmentävät noin 5 kertaa enemmän muuntuneen CD44:n RNA:ta, joka on kopioitunut ilmentymisplasmidin avulla, kuin endogeeniset geenikopiot.

Yli-ilmentynyt cDNA luetaan proteiiniksi. Kumpikin kuviossa 5 esitetty transfektantti syntetisoi mAb1.1ASML:n avulla immuunivärjäytyviä proteiineja, jotka ovat näennäisesti samankokoisia, nimittäin 150 kDa:n kokoista pääasiallista tuotetta ja 100 kDa:n kokoista, heikompaa vyöhykettä. Koska tämä cDNA-sekvenssi koodaa vain 503 aminohappoa käsittävää primääriä proteiinituotetta (vastaten noin 60 000 Daltonia), niin kaikkien näkyvien vyöhykkeiden on esitettävä muokkautuneita muotoja. 150 kDa:n vyöhyke yhtyy muuntuneen CD44:n erääseen muokkautuneeseen muotoon, jota ilmentyy etäispesäkkeitä muodostavassa solussa BSp73ASML. BSp73AS tai simulointisiirretyt BSp73ASpSVneo-solut eivät käsitä tätä proteiinia. Samoin kuin BSp73ASML-soluissakin, transfektanttien ilmentämien solujen epitooppi on paljaana solun pinnalla.

Jotta saataisiin osoitetuksi se, että muuntuneen CD44:n ilmentyminen riittää saamaan aikaan BSp73AS-soluissa etäispesäkkeiden muodostumiskykyä, transfektantteja injektointiin syngeniisiin BDX-rottiin (spontaanin etäispesäkkeen menetelmä). Aikaisemmissa kokeissa etäispesäkkeitä muodostavat kasvainsolut BSp73ASML levisivät nopeasti injektiokohdasta, ja ne olivat hajaantuneet täydellisesti noin 10 vuorokautta injektion jälkeen (Matzku, 1984). Kaikki paikalliset kasvaimet poistettiin tästä syystä leikkaamalla ne irti 10. vuorokautena. Kaikkien BSp73ASML-solujen kantajien ja kaikkien niiden eläinten, joihin oli injektoitu yli-ilmentäviä transfektantteja, keuhkoihin kehittyi etäispesäkkeitä (taulukko 1). Etäispesäkkeiden muodostuminen tapahtui verrattain nopeasti, 5-8 viikossa injektion jälkeen. Eläimet, jotka olivat saaneet BSp73AS-soluja tai simulointitransfektantteja, olivat tämän ajan jälkeen täysin terveitä (leikkauksia lukuunottamatta), eikä etäispesäkkeitä voitu todeta edes vielä 5: käänn kuukauden jälkeen.

Voimakkaassa etäispesäkkeiden muodostumisessa todettavasta yllättävästä samankaltaisuudesta huolimatta havaitaan myös eräitä mielenkiintoisia eroja. BSp73ASML-solut saavuttavat kaikissa eläimissä imusolmukkeet ja aiheuttavat eri solmukkeiden huomattavaa suurenemista nivusalueessa ja aortan vieressä

(taulukko 1). Transfektantti (BSp73AS-pSVMetal-14) aiheuttaa imusolmukkeiden suurenemista 3 eläimessä kahdeksasta, vaikka kaikkien eläinten keuhkoissa kehittyikin lukuisia etäispesäkkeitä (taulukko 1). Toisella transfektantilla (BSp73AS-pSV-metal-15) ei voida todeta imusolmukkeiden suurenemista. Näin ollen nämä transfektantit näyttävät kykenevän muodostamaan pesäkkeitä keuhkoihin ilman pakollista kasvuvaihetta imusolmukkeissa.

Taulukon 1 mukainen koe viittaa lisäksi toiseen, BSp73AS-transfektanttien ja BSp73ASML-solujen väliseen eroon. Keuhkojen yksittäiset etäispesäkkeet ovat makroskooppisesti näkyviä, kun taas BSp73ASML:n aiheuttamat etäispesäkkeet ovat pieniä ja niitä on paljon, kuitenkin BSp73ASML-soluilla toteutetussa suuremmassa koesarjassa (Reber et al., 1990) 11 eläimessä 20:sta kehittyi 5-20 suurempaa pesäkettä keuhkoa kohden transfektantteihin verrattuna.

Jotta voitaisiin varmistua siitä, että muodostuneet etäispesäkkeet johtuvat injektoiduista transfektanteista, spontaanin mutaation, joka saa aikaan etäispesäkkeiden muodostamiskykyä, epätodellinen mahdollisuus täten poissulkien, epitooppipositiiviset proteiinit määritettiin koko keuhkoista tehdyistä uutteista sekä uudestaan viljellyistä, etäispesäkkeitä tuottavista soluista saaduista uutteista. 150 kDa:n glykoproteiini voidaan osoittaa koko keuhkoista saadusta uutteesta sekä eläimen, joka oli saanut BSpAS-pSVMetal-15-transfektantteja, spesifisestä keuhkopesäkkeestä saaduista uutteista. G418:lle vastustuskykyinen kanta ilmentää in vitro-kasvun aikana proteiinia, jolla on näennäisesti tämä sama molekyyllipaino.

Diagnostiikka

1. Ihmisen kasvainmateriaali analysoidaan in situ-hybridisoinneilla jo olemassaoleviin, ihmisen pMeta-1-sekvensseihin. Nämä kokeet on tarkoitettu esikokeiksi, ennenkuin saadaan aikaan vasta-aine, joka tunnistaa ihmisen SUA:n.

2. Ihmisen SUA:ta tunnistavien ja sen kanssa reagoivien vasta-aineiden valmistus. Ihmisen pMeta-1-sekvenssit kloonataan bakteeriperäisiin ilmentämisvektoreihin siten, että syntyy fuusioita β -galaktosidaasi- tai tryptofaani E-tuotteeseen. Kaniinit immunoidaan näillä fuusioproteiineilla tai SUA:sta peräisin olevilla syntetisoiduilla peptideillä (kantajamolekyyleihin kytkettyinä). Moniarvoiset tai monospesifiset vasta-aineet eristetään.

Käyttömahdollisuudet:

- kliinisen kasvainmateriaalin immunohistologiset tutkimukset (diagnostiikka);
 - liukoisen SUA:n osoittaminen potilaan seerumista ELISA-määrittäyksillä (diagnostiikka);
3. hMeta-1-proteiinin valmistus transfektoimalla ihmisen tai rotan soluja sellaisella ilmentämisvektorilla, joka käsittelee täydellisen hMeta-1 cDNA-sekvenssin; tai puhdistus LCLC97-soluista.

Käyttömahdollisuudet:

- Proteiinin tai sen osan injektointi kasvainsolujen sitoutumiskohtien tunnistamiseksi ja karakterisoinniksi

Kirjallisuusluettelo:

Goldstein, L. A., Zhou, D. F. H., Picker, L. J., Minty, C. N., Bargatze, R. F., Ding, J. F. and Butcher, E. C. (1989) A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell* 56: 1063-1072.

Hart, I. R., Goode, N. T. and Wilson, R. E. (1989) Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 989: 65-84.

Idzerda, R. L., Carter, W. G., Nottenburg, C., Wayner, E. A., Gallatin, W. M. and St. John, T. (1989) Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4659-4663.

Köhler, G. (1981) In: I. Lefkovits and B. Pernis (eds). *Immunological Methods*. Vol. 2 p. 285. N.Y. Academic Press.

Matzku, S., Komitowski, Mildemberger and Zöllner, M. (1983) Characterization of Bsp 73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Inv. Met.* 3: 109-123.

Matzku, S., Wenzel, A., Liu, S. and Zöllner, M. (1989). Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 49: 1294-1299.

Neri, A., Welch, D., Kawaguchi, T. and Nicolson, G. L. (1982) Development and biologic properties of malignant cell sublines and clones of spontaneously metastasizing rat mammary adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 68: 507-517.

Nicolson, G. L. (1987) Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. Cancer Res. 47: 1473-1487.

Nottenburg, C., Rees, G. and St. John, T. (1989) Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 8521-8525.

Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J. M. and Seed, B. (1989) A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. Cell 56: 1057-1062.

Stanley K.K. and Luzio, J.P. (1984), Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins. EMBO J. 3: 1429-1434.

Wenzel, A. (1986) Charakterisierung von Differenzierungsantigenen auf dem Rattentumor Bsp 73 mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Diplomityö, Karlsruhe yliopisto.

Zhou, D. F. H., Ding, J. F., Picker, L.F., Bargatze, R. F., Butcher, E. C. and Goeddel, D. V. (1989) Molecular cloning and expression of Pgp-1 - The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. J. Immunol. 143: 3390-3395.

Taulukko 1

Muuntunutta CD44 cDNA pMeta-1:tä ilmentävien BSp73AS-solujen etäispesäkkeitä aiheuttava leviäminen***

Kasvain- klooni	Paikallinen esiinty- tyminen	Hajaantuminen pesäkkeitä LN* ing	etsittäessä ruumiinavauksella LN* par	etäis- Keuhkot
BSp73ASML	0/8	8/8 ø 1,5-2,5**	8/8 ø 2,2-5,0	8/8 jyvämainen
BSp73AS- pSVMeta1-14	0/8	3/8 ø 0,3-1,2	3/8 ø 1,0-4,5	8/8 moninkert. ø 0,3-5,0
BSp73AS- pSVMeta1-15	0/8	0/8	0/8	8/8, 5-20 ø 0,3-10,0
BSp73AS	1/8	0/8	0/8	0/8
BSp73AS- pSVneo	0/8	0/8	0/8	0/8

* LN = imusolmukkeet

** Keskimääräinen halkaisija millimetreinä

*** Taulukossa on esitetty tila 60 vuorokautta mainittujen solujen injektion jälkeen.

Patenttivaatimukset

1. DNA-kappale, joka koodaa osaa etäispesäkkeitä muodostavien kasvainsolujen eräästä pintaproteiinista, t u n n e t t u siitä, että tämä DNA-kappale on valittu

a) nukleotidisekvenssien

...rMeta-1...

ATT GCA ACT ACT CCA TGG GTT TCT GCC CAC ACA AAA CAG AAC
 CAG GAA CGG ACC CAG TGG AAC CCG ATC CAT TCA AAC CCA GAA
 GTA CTA CTT CAG ACA ACC ACC AGG ATG ACT GAT ATA GAC AGA
 AAC AGC ACC AGT GCT CAT GGA GAA AAC TGG ACC CAG GAA CCA
 CAG CCT CCT TTC AAT AAC CAT GAG TAT CAG GAT GAA GAG GAG
 ACC CCA CAT GCT ACA AGC ACA ACC TGG GCA GAT CCT AAT AGC
 ACA ACA GAA GAA GCA GCT ACC CAG AAG GAG AAG TGG TTT GAG
 AAT GAA TGG CAG GGG AAG AAC CCA CCC ACC CCA AGT GAA GAC
 TCC CAT GTG ACA GAA GGG ACA ACT - GCC TCA GCC CAC AAC
 AAC CAT CCA AGT CAA AGA AGT ACA ACA CAG AGT CAA GAG GAT
 GTT TCA TGG ACC GAT TTC TTC GAC CCA ATC TCA CAT CCA ATG
 GGA CAA

ja

hMeta-1...

AAC CCA AGC CAT TCA AAT CCG GAA GTG CTA CTT CAG ACA ACC
 ACA AGG ATG CAT GAT GTA GAC AGA AAT GGC ACC ACT GCT TAT
 GAA GGA AAC TGG AAC CCA GAA GCA CAC CCT CCC CTC ATT CAC
 CAT GAG CAT CAT GAG GAA GAA GAG ACC CCA CAT TCT ACA AGC
 ACA ATC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT
 ACC CAG AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA
 TAT CGC CAA ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG
 ACA GCT GCA GCC TCA GCT CAT ACC AGC CAT CCA ATG CA

b) nukleotidisekvenssien, jotka ovat degeneroituneet kohdassa
 a) mainittuihin DNA-sekvensseihin verrattuna ja/tai ovat niiden alleelisiä muunnoksia,
 joukosta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset DNA-kappaleet, t u n n e t t u siitä, että ne sisältävät nukleotidisekvenssejä, jotka hybridisoituvat jonkin patenttivaatimuksessa 1a) mainitun nukleotidisekvenssin kanssa ja koodaavat etäispesäkkeitä muodostavien kasvainsolujen täydellistä pinnan glykoproteiinia.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-kappale, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu jonkin sellaisen, patenttivaatimuksessa 1 mainitun nukleotidisekvenssin kanssa, joka sekvenssi on vähintään 85-prosenttisesti homologinen reaktiokumppaniin nähden.

4. Yhdistelmä-DNA-molekyyli, t u n n e t t u siitä, että se koostuu vektoriperäisestä nukleotidisekvenssistä ja patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaisesta DNA-kappaleesta.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen yhdistelmä-DNA-molekyyli, t u n n e t t u siitä, että se on ilmentämisvektori.

6. Transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaisen DNA-kappaleen tai patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukaisen yhdistelmä-DNA-molekyylin.

7. Diagnostisena aineena käytettävä polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että sitä koodaa patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-kappale.

8. Diagnostisena aineena käytettävä polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se voidaan valmistaa patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-kappaleen käsittävän, patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukaisen yhdistelmä-DNA-molekyylin avulla.

9. Patenttivaatimusten 7 ja 8 mukainen diagnostisena aineena käytettävä polypeptidi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää aminohapposekvenssit

r-proteiini

I A T T P W V S A H T K Q N Q E R T Q W N P I H S N P E V L
 L Q T T T R M T D I D R N S T S A H G E N W T Q E P Q P P F
 N N H E Y Q D E E E T P H A T S T T W A D P N S T T E E A A
 T Q K E K W F E N E W Q G K N P P T P S E D S H V T E G T T
 A S A H N N H P S Q R M T T Q S Q E D V S W T D F F D P I S
 H P M G Q G H Q T E S K

ja h-proteiini

I S S T I S T T P R A F D H T K Q N Q D W T Q W N P S H S N
 P E V L L Q T T T R M T D V D R N G T T A Y E G N W N P E A
 H P P L I H H E H H E E E E T P H S T S T I Q A T P S S T T
 E E T A T Q K E Q W F G N R W H E G Y R Q T P R E D S H S T
 T G T A A A S A H T S H P M Q G R T T P S P E D S S W T D F
 F N P I S H P M G R G H Q A G R R

sekä niiden alleelit muunnokset ja glykosylaatiotuotteet.

10. Patenttivaatimuksen 7 mukaisia proteiineja vastaan vaikuttavat diagnostisina aineina käytettävät moni- ja yksiarvoiset vasta-aineet, t u n n e t t u siitä, että ne on valmistettu patenttivaatimuksen 1 mukaista DNA:ta tai patenttivaatimuksen 7 mukaisia proteiineja käyttäen.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-kappaleen, sitä täydentävien vastinjuosteiden, sen johdannaisten ja sen osien käyttö etäispesäkkeitä tuottavien kasvainsolujen pintaglykoproteiinin osaa koodaavien nukleotidisekvenssin, tai sen osien tunnistamiseksi, valmistamiseksi tai eristämiseksi.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukaisen vasta-aineen käyttö patenttivaatimusten 7-9 mukaisen polypeptidin tunnistamiseksi, valmistamiseksi tai eristämiseksi.

13. Aine etäispesäkkeitä muodostavien kasvaimien ja/tai etäispesäkkeiden diagnosoimiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään yhtä patenttivaatimuksen 10 mukaista vasta-ainetta.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen aine, t u n n e t t u siitä, että vasta-aine on kytketty entsyymiin tai merkitty väriaineella ja/tai radioisotoopilla.



Patentkrav

1. Ett DNA-stycke, som kodar för en del av ett ytprotein i metastasbildande tumörceller, k ä n n e t e c k n a t därav, att detta DNA-stycke är valt ur gruppen av

a) nukleotidsekvenser

...rMeta-1...

```
ATT GCA ACT ACT CCA TGG GTT TCT GCC CAC ACA AAA CAG AAC
CAG GAA CGG ACC CAG TGG AAC CCG ATC CAT TCA AAC CCA GAA
GTA CTA CTT CAG ACA ACC ACC AGG ATG ACT GAT ATA GAC AGA
AAC AGC ACC AGT GCT CAT GGA GAA AAC TGG ACC CAG GAA CCA
CAG CCT CCT TTC AAT AAC CAT GAG TAT CAG GAT GAA GAG GAG
ACC CCA CAT GCT ACA AGC ACA ACC TGG GCA GAT CCT AAT AGC
ACA ACA GAA GAA GCA GCT ACC CAG AAG GAG AAG TGG TTT GAG
AAT GAA TGG CAG GGG AAG AAC CCA CCC ACC CCA AGT GAA GAC
TCC CAT GTG ACA GAA GGG ACA ACT - GCC TCA GCC CAC AAC
AAC CAT CCA AGT CAA AGA AGT ACA ACA CAG AGT CAA GAG GAT
GTT TCA TGG ACC GAT TTC TTC GAC CCA ATC TCA CAT CCA ATG
GGA CAA
```

och

...hMeta-1...

```
AAC CCA AGC CAT TCA AAT CCG GAA GTG CTA CTT CAG ACA ACC
ACA AGG ATG CAT GAT GTA GAC AGA AAT GGC ACC ACT GCT TAT
GAA GGA AAC TGG AAC CCA GAA GCA CAC CCT CCC CTC ATT CAC
CAT GAG CAT CAT GAG GAA GAA GAG ACC CCA CAT TCT ACA AGC
ACA ATC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT
ACC CAG AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA
TAT CGC CAA ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG
ACA GCT GCA GCC TCA GCT CAT ACC AGC CAT CCA ATG CA
```

b) nukleotidsekvenser, vilka är degenererade i jämförelse med i punkt a) nämnda DNA-sekvenser och/eller är deras allela variationer.

2. DNA-stycken enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e därav att de innehåller nukleotidsekvenser, vilka hybridiserar med en av de i patentkrav 1a) nämnda nukleotidsekvenserna och kodar för ett komplett ytglykoprotein i metastasbildande tumör-celler.
3. DNA-stycket enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att det hybridiserar med en sådan i patentkrav 1 nämnd nukleotidsekvens, som sekvensen till minst 85-prosent är homo-logisk med reaktionspartnern.
4. En rekombination-DNA-molekyl, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar en vektorbaserad nukleotidsekvens och ett DNA-stycke enligt patentkrav 1, 2 eller 3.
5. Rekombination-DNA-molekylen enligt patentkrav 4, k ä n n e - t e c k n a d därav, att den är en expressionvektor.
6. En transformerad värdcell, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller ett DNA-stycke enligt patentkrav 1, 2 eller 3 eller en rekombination-DNA-molekyl enligt patentkrav 4 eller 5.
7. En polypeptid användbar som diagnostiskt ämne, k ä n n e - t e c k n a d därav, att ett DNA-stycke enligt patentkrav 1 kodar för den.
8. En polypeptid som används som ett diagnostiskt ämne, k ä n - n e t e c k n a d därav, att den kan framställas med en rekombination-DNA-molekyl enligt patentkrav 4 eller 5 omfattande ett DNA-stycke enligt patentkrav 1.
9. Polypeptiden som används som ett diagnostiskt ämne enligt patentkrav 7 eller 8, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller aminosyrasekvenserna

r-protein

I A T T P W V S A H T K Q N Q E R T Q W N P I H S N P E V L
L Q T T T R M T D I D R N S T S A H G E N W T Q E P Q P P F
N N H E Y Q D E E E T P H A T S T T W A D P N S T T E E A A
T Q K E K W F E N E W Q G K N P P T P S E D S H V T E G T T
A S A H N N H P S Q R M T T Q S Q E D V S W T D F F D P I S
H P M G Q G H Q T E S K

och h-protein

I S S T I S T T P R A F D H T K Q N Q D W T Q W N P S H S N
P E V L L Q T T T R M T D V D R N G T T A Y E G N W N P E A
H P P L I H H E H H E E E E T P H S T S T I Q A T P S S T T
E E T A T Q K E Q W F G N R W H E G Y R Q T P R E D S H S T
T G T A A A S A H T S H P M Q G R T T P S P E D S S W T D F
F N P I S H P M G R G H Q A G R R

samt deras allela variationer och glykosylationsprodukter.

10. Fler- eller envärdiga mot protein verkande antikroppar som används som diagnostiska ämnen enligt patentkrav 7, k ä n - n e t e c k n a d e därav att de har framställts genom att använda DNA enligt patentkrav 1 eller proteiner enligt patentkrav 7.

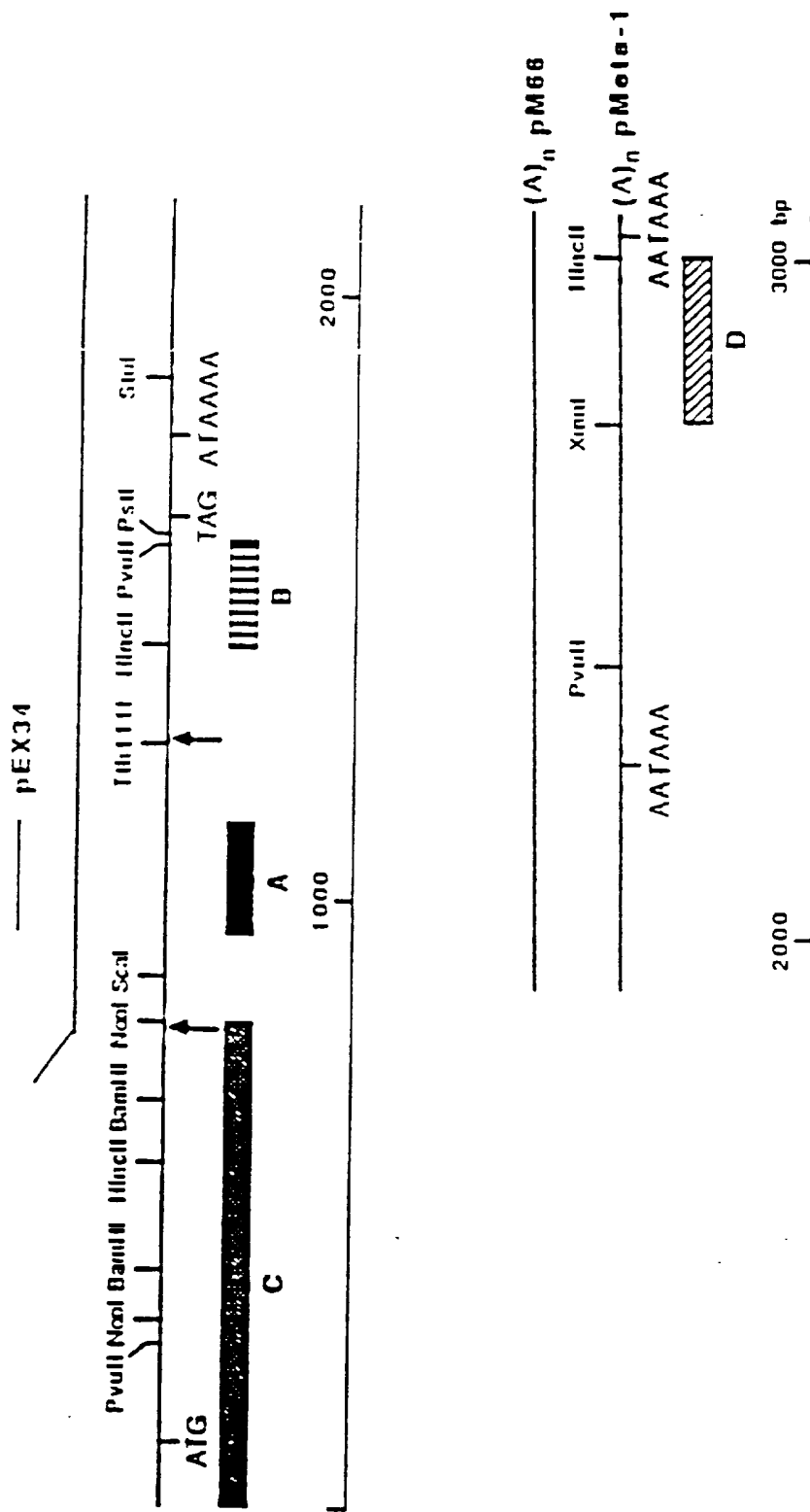
11. Användning av ett DNA-stycke enligt patentkrav 1, dess kompletterande/homologiska komplementsträngar, dess derivater och dess delar för identifiering, framställning eller isolering av en nukleotidsekvens, eller dess delar, som kodar för en del av ett ytglykoprotein i metastasbildande tumörceller.

12. Användning av en antikropp enligt patentkrav 10 för identifiering, framställning eller isolering av en polypeptid enligt patentkraven 7-9.

13. Ett ämne för diagnos av metastasbildande tumörer och/eller tumörmetastaser, k ä n n e t e c k n a t därav att, det innehåller minst en antikropp enligt patentkrav 10.

14. Ämnet enligt patentkrav 13, k ä n n e t e c k n a t därav att, en antikropp är förenad till en enzym eller markerad med ett färgämne och/eller en radioisotop.

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
2177
2178
2179
2180
2181
2182
2183
2184
2185
2186
2187
2188
2189
2190
2191
2192
2193
2194
2195
2196
2197
2198
2199
2200
2201
2202
2203
22



Kuvio 1 Rotan p-Meta-1:n pintaproteiini, restriktioentsymien leikkaukokohtat sekä vasta-aineiden hybridisaatioalueet

p-Meta-1:n DNA:n ja CD44-proteiinin täydellinen sekvenssi (osa 1)

.....signalpeptidi

→

→

SUA

Transmembranialue

[illegible]

p-Meta-1:n DNA:n ja CD44-proteiinin täydellinen sekvenssi (osa 2)

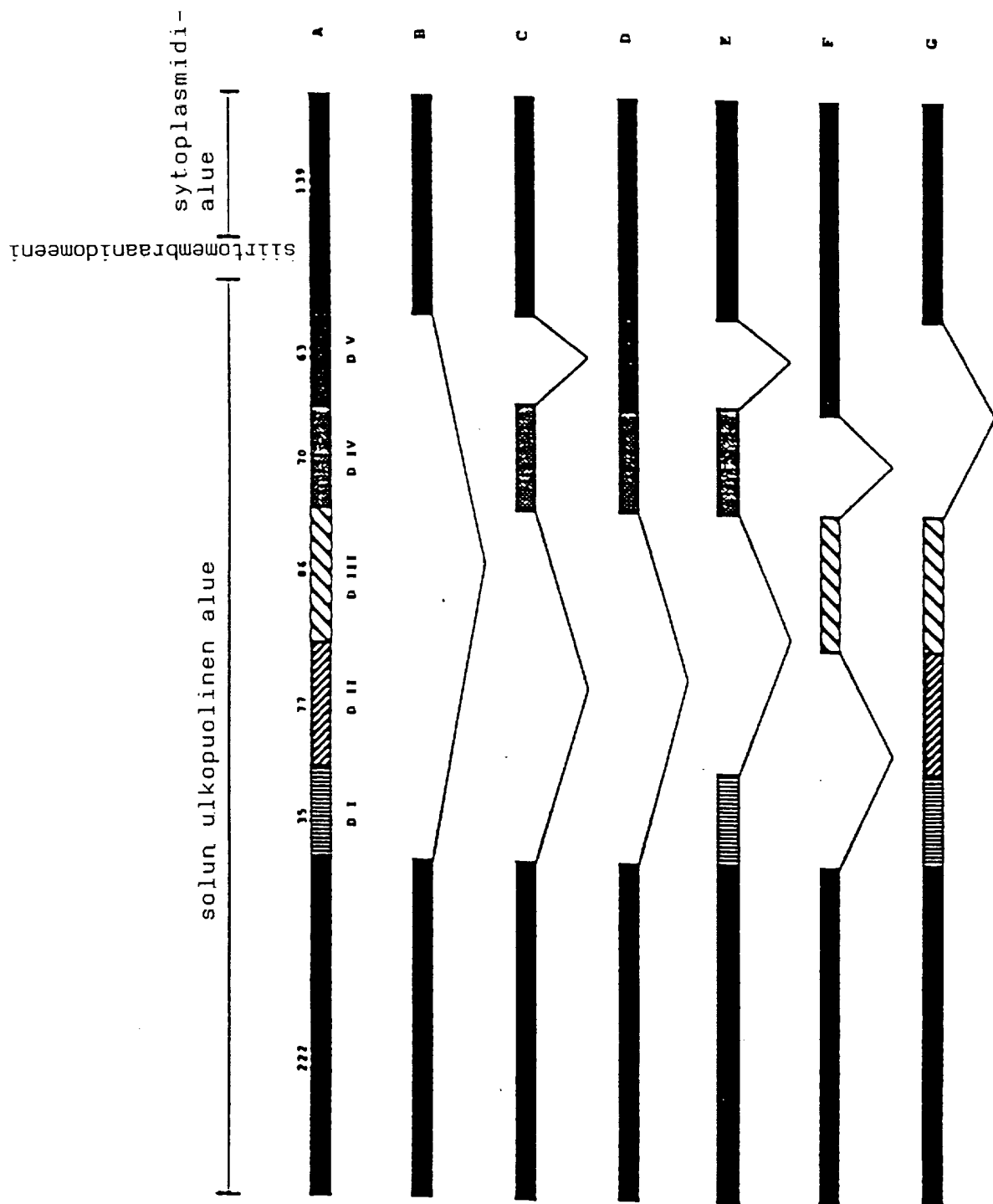
[illegible]

Meta-1	MDKV	WWHT	AWGL	LCL	LQ	LSLA	QQ	QIDLNI	TCRY	YAGVF	HVE	40				
hCD44	MDKVF	WWHT	AWGL	-CL	LV	PLSLA	-	QIDLNI	TCRF	YAGVF	HVE	37				
hCD44	MDKVF	WWHT	AWGL	-CL	LQ	LSLA	HQ	QIDLNV	TCRY	YAGVF	CVE	39				
Meta-1	KNGRYS	SISRTE	AADLC	EAFN	T	TLPTMA	QME	ELAL	RKGF	ETC		80				
hCD44	KNGRYS	SISRTE	AADLC	KAFN	S	TLPTMA	QME	KALS	IGFE	TC		77				
hCD44	KNGRYS	SISRTE	AADLC	QAFN	S	TLPTMD	QMKL	ALS	KGFE	TC		79				
Meta-1	RYGFIE	GHVV	IPRI	HPN	A	ICAA	NN	TGVY	ILL	AS	NTS	HYD	120			
hCD44	RYGFIE	GHVV	IPRI	HPN	A	ICAA	NN	TGVY	ILL	-Y	NTS	QYD	116			
hCD44	RYGFIE	GNVV	IPRI	HPN	A	ICAA	NN	TGVY	ILL	-S	NTS	HYD	119			
Meta-1	YCFNAS	APL	EEDC	TSVT	DL	PN	S	FDDG	PV	TTT	IVNR	DGTRY	160			
hCD44	YCFNAS	APP	EEDC	TSVT	DL	PN	A	FDDG	PV	TTT	IVNR	DGTRY	156			
hCD44	YCFNAS	APP	EEDC	TSVT	DL	PN	S	FDDG	PV	TTT	IVNR	DGTRY	159			
Meta-1	KKGEYR	HOED	DA	SN	I	DE	DVSS	SGS	TE	K-S	PEGY	199				
hCD44	QKGEYR	NPED	Y	PSN	P	DE	DVSS	SGS	S	ER	SSSG	GY	196			
hCD44	KKGEYR	HOED	DA	SN	I	DE	DVSS	SGS	TE	K-S	PEGY	198				
Meta-1	TDLP	TSQP	TGDR	DD	DAFF	IGS	L	-	A	-	ATTP	WVSA	HTKQ	236		
hCD44	TFSS	-VHP	TPDE	DS	PWIT	DS	TD	RI	PA	-	-	-	-	222		
hCD44	TFSS	TEQP	TGDR	DD	DSFF	IR	S	L	-	-	-	-	-	222		
Meta-1	NQERT	QWNP	THSN	PEVL	LQ	TT	TRMT	D	DRNS	TS	AHGEN	WT		276		
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Meta-1	QEP	OPPF	NNHE	YQDE	EE	TPHAT	S	TTWAD	PNS	TEEA	AATQ	K		316		
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Meta-1	EKWF	ENEW	QGKN	PP	TP	SED	SHV	TEGT	TASA	HNNH	PSQRM			356		
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Meta-1	TQS	QEDV	SWTD	FFDP	ISH	PMGQ	GHQ	TESK	-	-	-	-	-	385		
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	232		
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	233		
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	234		
Meta-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
hCD44	GSH	-	THE	SE	SD	GHS	SHGS	QEGG	AN	T	SSGP	IR	TP	QIP	EWL	413
hCD44	SSR	-	THG	SE	LA	GHS	SAN	QDS	GV	T	SSGP	IR	TP	QIP	EWL	271
hCD44	GTD	-	THG	SE	LA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	273
hCD44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	246
Meta-1	ILAS	LALAL	LILAV	CI	AVNS	RRRC	GQKK	KLVIN	S	GNG	-	VE				453
hCD44	ILAS	LALAL	LILAV	CI	AVNS	RRRC	GQKK	KLVIN	S	GNG	-	VE				312
hCD44	ILAS	LALAL	LILAV	CI	AVNS	RRRC	GQKK	KLVIN	G	GNG	-	VE				313
Meta-1	DRKPS	E	LNGE	ASKS	QEMV	HVLVN	KE	P	T	ET	PDQ	F	MTADE	ETRN		493
hCD44	DRKPS	SG	LNGE	ASKS	QEMV	HVLVN	KE	S	S	ET	PDQ	F	MTADE	ETRN		352
hCD44	DRKPS	SE	LNGE	ASKS	QEMV	HVLVN	KE	P	S	ET	PDQ	C	MTADE	ETRN		353
Meta-1	LQ	S	VDM	KIGV												503
hCD44	LQ	S	VDM	KIGV												362
hCD44	LQ	S	VDM	KIGV												363

Kuvio 3b

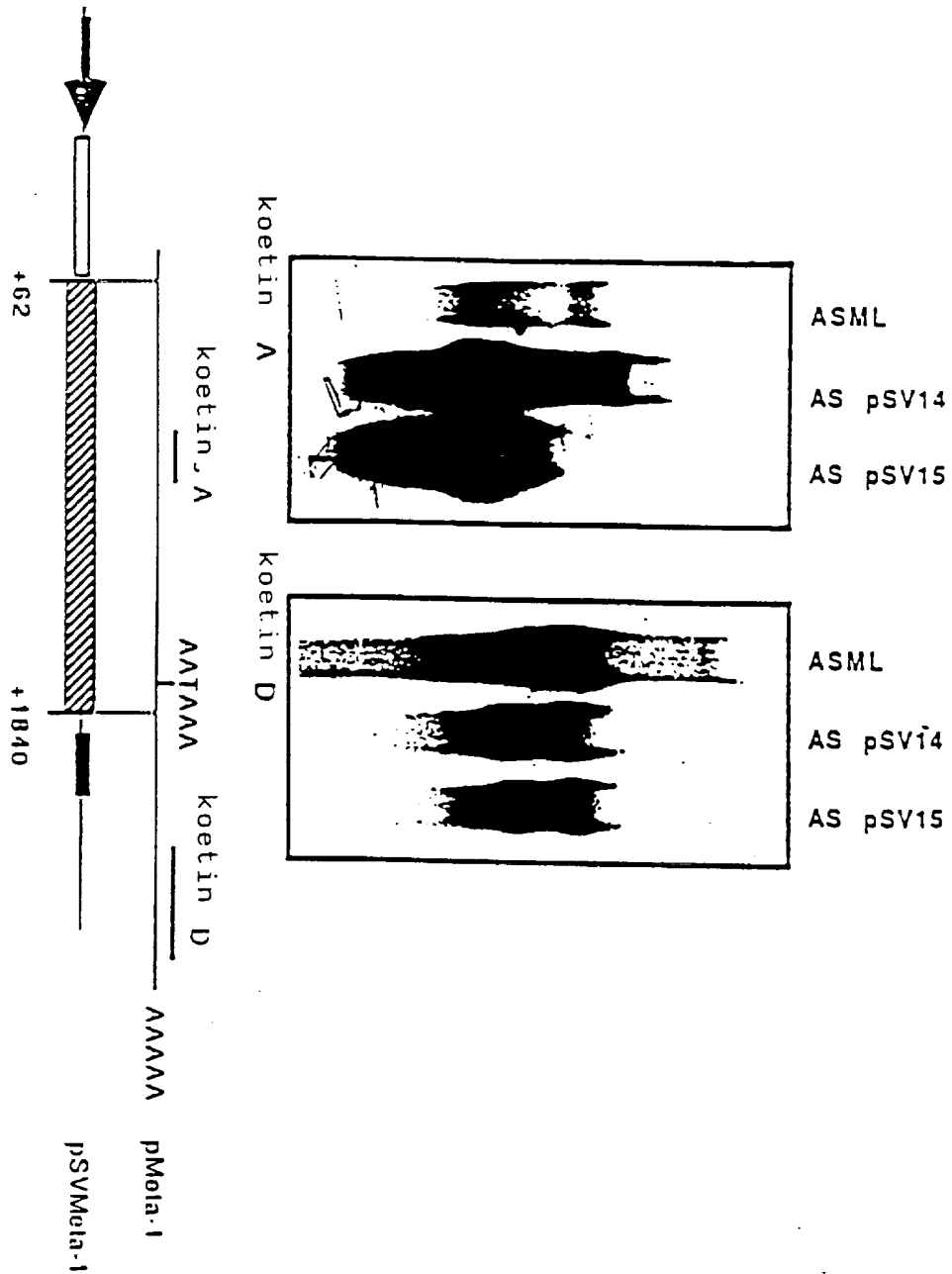
Rotan (rMeta-1), ihmisen (hCD44) ja hiiren (MCD44) pintaproteiinien proteiinisekvenssi sekä solun ulkopuoliset alueet rotan ja ihmisen proteiinissa.

08.11.83 90504



106128

Kuvio 4



Kuvio 5