



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **319383**

(13) **B1**

(51) Int Cl<sup>7</sup>

C 07 K 16/28, G 01 N 33/577, A 61 K 39/395

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	19965231	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.06.09 PCT/FI95/00337
(22)	Inng.dag	1996.12.06	(85)	Videreføringsdag	1996.12.06
(24)	Løpedag	1995.06.09	(30)	Prioritet	1994.06.09, US, 257754
(41)	Alm.tilgj	1996.12.06			
(45)	Meddelt	2005.07.25			
(83)	Biol.mat. dep	Ukjent nr. Ukjent			
(73)	Innehaver	Helsinki University Licensing Ltd , Viikinkaari 8 A, SF-00710 Helsingfors, FI Orion Corp , FI 65, SF-02200 Esbo, FI			
(72)	Oppfinner	Kari Alitalo, , Esbo, FI Arja Kaipainen, , Helsingfors, FI Jaana Korhonen, , Helsingfors, FI Tuija Mustonen, , Helsingfors, FI Marja-Terttu Matikainen, , Mynämäki, FI Päivi Karnani, , Åbo, FI Katri Pajusola, Museokatu 33 C 51, SF-00100 Helsingfors, FI			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS , Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, NO			

---

(54)	Benevnelse	FLT4-reseptor tyrosinkinase og dens anvendelse ved diagnose og terapi			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 94/1020 Pajusola et al., Oncogene, , vol.8, no 11, 1993, s 2931-2937 Galland et al., Oncogene, vol.8 no. 5, 1993, s 1233-1240			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet anti-FLT4-antistoffer, særlig monoklonale anti-FLT4-antistoffer som er nyttige som spesifikke markører for endotelceller i lymfekar og HEV, som diagnostisk verktøy til å detektere forandringer i lymfatiske vev, spesielt i lymfekar og HEV i sykdomstilstander, såsom lymfangiom, metastatiske lymfeknuter og inflammatoriske inektiøse og immunologiske sykdommer.

Den foreliggende oppfinnelse angår anvendelsen av et monoklonalt antistoff rettet mot det ekstracellulære domenet til FLT-4-reseptor tyrosinkinase til fremstilling av diagnostiske og farmasøytiske sammensetninger, og fremgangsmåte til å billedanne lymfatiske kar i en vevsprøve og diagnostisere sykdommer derav.

5 Fysiologien til karsystemet, embryonisk vaskulogenese og angiogenese, blodkoagulasjon, sårheling og reproduksjon såvel som flere sykdommer involverer det vaskulære endotel som ligger på innsiden av blodkarene. Utviklingen av det vaskulære tre skjer gjennom angiogenese og i henhold til noen teorier dannelsen av det lymfatiske system starter kort etter arteriell og venøs utvikling ved spiring fra  
10 vener <sup>(1,2)</sup>.

Etter den føtale periode prolifererer endotelceller meget langsomt, unntagen under angiogenese assosiert med neovaskularisering. Vekstfaktorer som stimulerer angiogenese utøver sin virkning ved hjelp av spesifikke endotelcelleoverflateresep-  
tortyrosinkinaser.

15 Proteinproduktet til FLT4-reseptortyrosinkinase cDNA, klonet fra en human erytroleukemicellelinje er N-glykosylert og inneholder syv immunoglobulinlignende løkker i sitt ekstracellulære domene. De cytoplasmatiske tyrosinkinasedomene til FLT4 er ca. 80% identisk på aminosyrenivå med de tilsvarende domener til FLT1 og KDR og ca. 60% identisk med reseptorene for blodplateavledet vekstfak-  
20 tor, kolonistimulerende faktor-1, stamcellefaktor og FLT3-reseptor <sup>(3)</sup>.

Skjønt den biologiske funksjonen til FLT4 enda er ukjent angir dens begrensede ekspresjonsmønster at dens funksjoner kan involvere det vaskulære endotel. Våre tidligere resultater avslørte FLT4 mRNA ekspresjon i endotelceller i kar under utvikling i flere føtale organer som beskrevet av Kaipanen et al., i *J. Exp. Med.*  
25 178:2077-2088, 1993. En sammenligning av FLT4, FLT1 og KDR/FLK-1 reseptor mRNA-signaler viste overlapping, men adskilte ekspresjonsmønster i de studerte vev <sup>(4)</sup>. Disse data tydet på at reseptortyrosinkinaser kodet av denne genfamilie kan ha adskilte funksjoner i regulering av vekst og/eller differensiering av blodkar.

En viktig funksjon til det lymfatiske system er å tilveiebringe væsketilbakestrømning fra vevene og transporterer mange ekstravaskulære stoffer tilbake til blodet. I tillegg, under modningsprosessen, forlater lymfocytter blodet, migrerer gjennom lymfoide organer og andre vev og går inn i de lymfatiske karene og returneres til blodet gjennom ductus thoracicus (den store lymfegang). Spesialiserte venyler, høye endotelvenyler (HEV) binder lymfocytter igjen og forårsaker deres ekstrava-  
35 sering inn i vevene. De lymfatiske kar og spesielt lymfeknutene spiller således en viktig rolle i immunologi og de er også seter for utvikling av metastaser til forskjellige tumører.

Siden begynnelsen av det 20. århundre, har tre forskjellige teorier angående den embryoniske opprinnelse til lymfesystemet blitt presentert. Før foreliggende oppfinnelse, har imidlertid lymfatiske kar vært vanskelig å identifisere fordi det ikke er noen spesifikke markører tilgjengelig for dem.

- 5 Lymfatiske kar er mest vanlig studert ved hjelp av lymfografi. I lymfografi blir røntgenkontrastmedium injisert direkte i et lymfekar. Det kontrastmediet blir fordelt langs de efferente dreneringskar i lymfesystemet. Kontrastmediet blir oppsamlet i lymfeknuter hvor det oppholder seg for opptil et halvt år i løpet av hvilken tid røntgenanalyser tillater oppfølging av lymfeknutestørrelse og arkitektur.
- 10 Denne diagnostikken er spesielt viktig hos kreftpasienter med metastaser i lymfeknutene og i ondartede lymfesykdommer såsom lymfom.

Det er derfor en hensikt å tilveiebringe markører for å identifisere lymfatiske kar og deres anvendelse i diagnostikk og terapi. Denne hensikt er oppnådd ved foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved det som fremgår av de vedlagte krav.

- 15 Oppfinnelsen er også rettet på anvendelse av antistoffer som gjenkjenner spesifikt FLT4, spesielt til monoklonale antistoffer og sammensetninger som inneholder slike antistoffer. Videre er det beskrevet i den foreliggende søknad anvendelse av slike monoklonale antistoffer med diagnostiske hensikter for å detektere og måle mengden av FLT4-reseptorer i vevene, spesielt i lymfevev og i lymfeendotelceller.
- 20 I en foretrukket utforming tilveiebringer oppfinnelsen anvendelse av monoklonale antistoffer som gjenkjenner spesifikt FLT4-reseptoren. Mer spesifikt tilveiebringer denne oppfinnelsen anvendelse av et monoklonalt antistoff betegnet 9D9F9. Hybridomcellelinjen som produserer det monoklonale antistoff 9D9F9 er deponert i Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) under retningslinjer foreskrevet i Budapestavtalen (DSMZ aksesjonsnr. ACC2210).
- 25

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også anvendelse av monoklonale antistoffer konjugert til et billeddannende middel. Som brukt heri inkluderer betegnelsen billeddannende middel men er ikke begrenset til radioisotoper. En foretrukket radioisotop er  $^{99m}\text{Tc}$ .

- 30 I en spesifikk utforming er oppfinnelsen rettet til en fremgangsmåte for å overvåke lymfatiske kar og deres endotelceller i vevsprøver og i organismer. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre kliniske deteksjonsfremgangsmåter som beskriver tilstanden til lymfevev og spesielt lymfekar (inflammasjon, infeksjon, traumer, vekst, neoplasi, etc.) og fremgangsmåter for å detektere lymfekar og
- 35 således lymfatisk vaskularisering i en organisme.

Mer spesifikt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte til å detektere og identifisere lymfatiske forandringer karakterisert ved FLT4-ekspresjon i sammenheng med metastatiske kreftformer, inflammasjoner, infeksiose og immunologiske tilstander, hvor fremgangsmåten omfatter trinnene;

5 (a) å oppnå en prøve av vev og/eller kroppsvæske som er mistenkt for lymfeforendringer, og

(b) å bringe nevnte prøve i kontakt med et FLT4-spesifikt monoklonalt antistoff under betingelser som er egnet for kompleksdannelse mellom det monoklonale antistoff og antigenet, og

10 (c) Detektere nærvær av ethvert dannet kompleks.

Et vev som kan detekteres ved denne fremgangsmåten er ethvert normalt forkreft eller kreft fast tumorvev med FLT4-holdige lymfatiske celler eller celler som uttrykker FLT4-reseptoren. I en utforming av foreliggende oppfinnelse er det monoklonale antistoff merket med en detekterbar markør som beskrevet heri.

15 Fremgangsmåtene er nyttig for detektering og differensiering av forskjellige former for kreft, særlig metastaser i lymfeknuter og andre ondartede lymfelidelser, såsom lymfom såvel som lymfangiom.

20 Fremgangsmåte til å billeddanne nærvær av lymfekar, høye endotelvenyler eller lymfeknuter i menneskelige pasienter er også tilveiebragt ved foreliggende oppfinnelse. Denne fremgangsmåten omfatter administrering av merkede antistoffer og deteksjon ved billeddannelse på steder hvor FLT4-uttrykkende celler er tilstede i lymfatiske kar eller lymfeknuter.

25 Fig. 1. Ekspresjon av FLT4 mRNA i musevev. A. Hybridisering av polyadenylert RNA isolert fra de angitte vev til voksne mus. Størrelsen til FLT4 mRNA-båndet er gitt i kilobaser. B. RNase beskyttelsesanalyse av RNA isolert fra museembryoer med forskjellige gestasjonsaldere (E8-E18) og fra nyfødte mus (1 dag). Prøve E8+P inneholder også placenta. Størrelsen av proben og det beskyttede FLT4-fragment er gitt i nt;  $\beta$ -aktin ble brukt som en kontroll.

30 Fig. 2. Ekspresjon av FLT4 mRNA i en 7,5-, 8,5- og 11,5-dag p.c. embryoer. Mørkefelt og lysfelt fotomikrografier av in situ autoradiogram er vist. Ingen ekspresjon av FLT4 mRNA kunne detekteres i en 7,5-dag embryo (A). FLT4-ekspresjon av en 8,5-dag p.c. musembryo er vist i (B) og (C). Piler viser til FLT4-positive celler i endoteliet i den bakre kardinalvene (cv), i allantois (al) i (B) og i angioblaster (ab) av hodemesenchym i (C). I en 8,5-dag p.c. placenta kan FLT4-transkripter sees i endotelceller til venøse lakuner (vl) (D). Panel E og F viser en sammenligning av FLT4 og Tie hybridiseringssignaler i 11,5-dag p.c. embryoer. Regionen for den utviklende dorsale aorta og metanefros (mn) er vist (20x). Bemerk at den dorsale aorta er negativ for FLT4 men positiv for Tie mRNA, mens

begge prober hybridiseres med endotelet til den subendokardiale vene (sv). FLT4-proben gir også et signal fra nyrevenen (v) (metanephric vein), mens Tie hybridiseres mest med nyrekapillærene (c, piler). da: dorsal aorta, ng: neural fure. Skala stolpe; 30  $\mu$ m.

5 Fig. 3. FLT4 mRNA ekspresjon i en 12,5-dag p.c. embryo. Et sagittalt snitt gjennom aksillarplanet er vist. Notér at FLT4 mRNA er prominent i dilaterte kar i akselkullen (ax), i et pleksuslignende mønster i den periorbitale (po) region, i det paravertebrale vev (pilhoder) og de subkutane (sc) vev. b:hjerne, li:lever. Skalastolpe: 5  $\mu$ m.

10 Fig. 4. FLT4 i 14- og 16,5-dag p.c. embryoer. Panelene A og B viser lys- og mørkefeltsbilder av et midtsagittalt snitt. po:periorbital region, lj:nedre kjeve, ne:halsregion, sc:subkutis, mt:mesenterium, ao:aorta, dt:ductus thoracicus. (C) viser et tverrsnitt av en 16,5-dag embryo i hematoksylin-eosinfarging. th:thymus, tr:trakea, e:esofagus, ca:karotidarterie, ba:brakiosefalisk arterie, dt:ductus  
15 thoracicus. (D) viser en høyere forstørrelse (40x) av regionen til ductus thoracicus; de autoradiografiske korn kan ses over endotelcellene. Også de små kar (v) i den øvre del av fotografiet er positiv. Skalastolpe: 10  $\mu$ m (A-C), 1  $\mu$ m (D).

Fig. 5. Sammenligning av FLT4 og Tie mRNA-ekspresjon i dyrkede endotelceller. Northern blotanalyse av polyadenylert RNA fra endotelceller fra menneskelig  
20 mikrovaskulatur i forhuden (MV), femoralvene (VE), aorta (AO) og umbilikalvene (HU). For sammenligning er hybridiseringssignalet til Tie-reseptortyrosinkinase mRNA vist. Båndene som resulterte fra den uspesifikke binding av proben til det ribosomale RNA er merket med stjerner.

Fig. 6. FLT4 i voksne menneskelige lymfatiske kar i mesenteriet (A,B), lunge  
25 (C,D), og tonsiler (E,F). Merk at bare de lymfatiske kar i A og C gir et FLT4-signal, mens venene, kapillærene og arteriene er negative for FLT4 mRNA. I tonsilene er signalet funnet i endoteliet til noen HEV. Skalastolpe: 200  $\mu$ m.

Fig. 7. FLT4 mRNA i normal (A,B) og metastatisk (C,D) lymfeknute og i lymfangiom (E-G). Pilhoder markerer de lymfesinuser og HEV, som er FLT4-positive.  
30 En sammenligning av FLT4 og von Willebrand faktorsignaler vises begge i lymfeendoteliet men bare von Willebrand faktorsignalene i kapillærendotel (c) og venøst endotel (v). Skalastolpe: 10  $\mu$ m (A-D) og 100  $\mu$ m (E-G).

Fig. 8. FLT4-ekspresjon i føtale mesenteriske kar detektert ved immunoperoksidasfarging. Snittene ble farget med affinitetsrenset anti-FLT4-antistoffer (A), med antigenblokkert antiserum (D) og med preimmunt serum (C) og med antiserum spesifikt mot faktor VIII-relatert antigen (D). Merk at farging er begrenset til noen  
35 men ikke alle kar (v). Skalastolpe: 0,05 mm.

Erkjennelsen av viktigheten av å identifisere forandringer i lymfevev, spesielt i lymfeknuter i sammenheng med metastatiske kreftformer og immunologiske sykdomstilstander har de foreliggende oppfinnere vist at FLT4 er en spesifikk markør som detekterer lymfekarendotel og derfor er nyttig som en markør for lymfatiske forandringer i patologiske tilstander hos menneske.

I foreliggende oppfinnelse er det tidligere vist at ekspresjonsmønsteret til FLT4 i sammenligning med FLT1 og KDR avviker betydelig i vevene til 18 uker gamle menneskefostere <sup>(4)</sup>. For å forstå rollen til FLT4 under utviklingen klonet oppfinnere delvis cDNA for muse FLT4. Ved å bruke disse prober i in situ hybridisering, ble FLT4 mRNA-ekspresjon under museutvikling analysert og det ble funnet at FLT4 blir uttrykt gjennom vaskulogenese og angiogenese i det lymatiske system. Relevansen til disse funn ble også konfirmert i normalt og patologisk menneskelig voksent vev, idet FLT4 ble funnet i lymfeendotelceller i menneskelig voksent vev både i normale og patologiske tilstander, såvel som i noen høye endotelvenyler (HEV).

Kloning av muse FLT4 cDNA-fragmenter viste at deres deduserte aminosyresekvens er nesten identisk med den tilsvarende menneskelige (aminosyreidentitet på ca. 96% i begge de undersøkte segmenter). Ytterligere tegn på identiteten til mus FLT4 cDNA ble oppnådd fra Northern hybridisering hvor prober fra begge arter ga det typiske 5,8 kb mRNA-signal fra musevev. Analyse av RNA isolert fra forskjellige vev fra voksne mus viste FLT4-ekspresjon i lever, lunge, hjerte, milt og nyre, men ingen eller meget lite hybridisering i hjernen og testikler. Dette mønster er likt det mønster rapportert tidligere av Galland et al. <sup>(5)</sup>. Resultatene av RNase beskyttelse antyder at FLT4-genet er nødvendig under musens utvikling, som starter i embryoer fra dag 8,5 p.c. og de relative ekspresjonsnivåer synes helt stabile.

For in situ hybridisering ble to fragmenter av mus FLT4 cDNA selektert, som koder sekvenser til det ekstracellulære domene. Dette tillot en klar adskillelse av hybridiseringsmønster fra de beslektede FLK-1 og FLT-1 reseptormønstere, som viser bare en meget lav grad av sekvensidentitet med FLT4 i den ekstracellulære region <sup>(6, 7, 8, 9)</sup>. FLT4, på samme måte som FLK-1, FLT-1, Tie og Tek endotelreseptortyrosinkinasegener ble ikke uttrykt i 7,5-dags p.c. embryoer. I en 8,5-dag p.c. embryo ble det sterkeste FLT4-signalet lokalisert i allantois, angioblastene i hodemesenchym og kardinalvenen. I motsetning var dorsal aorta, hjertets endokardium og angioblastere i plommesekken negative, forskjellig for Tie, Tek FLK-1 og FLT-1, Tie og Tek <sup>(10, 8)</sup>. Restriksjonen til FLT4-ekspresjon til det venøse system var til og med enda klarere i prøver fra 11,5-dager museembryoer; hvor Tie mRNA ble uttrykt også i arterier. I 12,5-dag p.c. embryoer dekorerte FLT4-signalet utviklende venøst endotel og presentivt lymfatisk endotel, men ulikt den endotele

Tie-reseptortyrosinkinase var arterielt endotel negativt. I løpet av senere stadier av utvikling ble FLT4 mRNA begrenset til vaskulære pleksus tomme for blodceller, og representerer utviklende lymfekar. Bare lymfeendotelet og noen høye endotelvenyler uttrykte FLT4 mRNA i voksent menneskelig vev. Økt ekspresjon skjedde i lymfesinuser og høye endotelvenyler i metastatiske lymfeknuter og i lymfangiom.

Pga. vanskeligheter med fortolkning av data fra museembryoer, ble menneskeendotel undersøkt fordi det lymfesystemet er mye bedre definert hos mennesker. I tillegg kunne celler etablert fra forskjellige endotel undersøkes i cellekultur for å se om spesifisiteten til FLT4-ekspresjon opprettholdes i in vitro betingelser. Endotelcellelinjer er kjent for å miste differensierende trekk i in vitro kultur. Derfor var det ikke uventet at de var negative for FLT4. Dyrkede aorta endotelceller manglet også FLT4 mRNA. Signaler ble imidlertid oppnådd fra menneskelige endotelceller dyrket fra mikrovaskulaturen og fra femoral- og umbilikalvenen. Således i det minste noe av spesifisiteten til FLT4-ekspresjon ble opprettholdt i cellekultur.

In situ hybridiseringsanalyse av voksent menneskelig vev confirmerte restriksjonen av FLT4 til lymfesystemet sett i de utviklende museembryoer. FLT4-ekspresjon ble sett i lymfeendotel og i sinusene til menneskelige lymfeknuter. Av interesse, noen av HEV som har et kubodialt endotel, vist å funksjonere i trafikkering av leukocytter til lymfeknutene, var FLT4 positive. Videre viste en parallellhybridiseringsanalyse at FLT4 mRNA-nivåer var økt i disse strukturer i metastatiske lymfeknuter sammenlignet med normale lymfeknuter. FLT4 var også meget prominent i lymfangiom som er benigne svulster komponert av bindevevstroma og voksende, endotelførede lymfatiske kanaler. FLT4 mRNA ble begrenset til lymfeendotelet til disse tumører og var fraværende i deres arterier, vener og kapillærer. I den humane lunge var vi istand til å identifisere lymfatiske strukturer, som var de eneste FLT4-positive kar i dette vev.

De ovennevnte resultater viser at FLT4 er en ny markør for lymfatiske kar og noen høye endotelvenyler i menneskelig voksent vev. De understøtter også teorien for den venøse opprinnelse av lymfekar. FLT4 som en vekstfaktorreseptor kan være involvert i differensiering og funksjoner av disse kar.

Disse resultater kombinert med FLT4-bindende forbindelser i henhold til foreliggende oppfinnelse tillater en selektiv merking av lymfeendotel, spesielt ved å bruke antistoffer i henhold til foreliggende oppfinnelse koblet til radioaktive, elektrontette eller andre rapportørsubstanser, som kan visualiseres. Det kan bli mulig å injisere inn i lymfesystemet stoffer som inneholder FLT4-reseptor internaliseringssinduserings monoklonale antistoffer, og derved transportere fordefinerte molekyler inn i det lymfatiske endotel. Det kan også bli mulig å benytte på en slik måte FLT4-bindende forbindelser i henhold til oppfinnelsen for deteksjon av høye

endotelvenyler, spesielt aktiverte HEV, som uttrykker økte nivåer av FLT4-reseptor. I henhold til vår kunnskap er ingen slike spesifikke markører for tiden tilgjengelig for lymfeendotel.

5 De følgende eksempler er gitt bare for å illustrere den foreliggende oppfinnelse og ikke for å begrense dens område.

### EKSEMPLER

#### Eksempel 1

##### Kloning av mus FLT4 cDNA-prober

10 Tilnærmet  $10^6$  plakker fra et IFIX®II genomisk bibliotek fra 129SV-mus (Stratagene) ble screenet med S2,5 human FLT4-reseptor cDNA-fragment som dekket det ekstracellulære domene <sup>(3)</sup>. Et 2,5 kb Bam HI-fragment ble subklonet fra en positiv plakk og sekvensert fra begge ender. Fra denne subklon ble polymerasekjedereaksjon brukt for å oppformere og klonne inn i pBluescript KSII+/- vektor (Stratagene) et eksonfragment som dekket nukleotidene 1745-2049 i mus FLT4  
15 cDNA-sekvens <sup>(9)</sup>.

Et andre fragment som dekket nukleotidene 1-192 ble klonet på samme måte.

#### Eksempel 2

##### Analyse av FLT4 mRNA i musevev

20 Total RNA ble isolert fra utviklende embryoer (8-18 dager p.c. og en dag gamle mus) i henhold til Chomoczynski et al. <sup>(11)</sup>. Prøven fra 8 dager p.c. embryoer inkluderte også placenta.

For RNase beskyttelsesanalyse, ble RNA-probe dannet fra det lineariserte FLT4-plasmid oppnådd i henhold til eksempel 1 ved å bruke [<sup>32</sup>P]-UTP og T7-polymerase for antisensorientering.  $\beta$ -aktinproben brukt tilsvarer nukleotidene 1188-1279 i det publiserte muse- $\beta$ -aktinsekvens <sup>(12)</sup>. Etter rensing i en 6% polyakrylamid/7M ureagel ble de merkede transkripter hybridisert til 30  $\mu$ g av total RNA natten over ved 52°C. Uhybridisert RNA ble fordøyd med RNase A (10 U/ml) og T1 (1  $\mu$ g/ml) ved 37°C, pH-verdi 7,5 i 1 time. RNasene ble inaktivert ved proteinase K-fordøyelse ved 37°C i 15 min. og prøvene ble analysert i en 6% polyakrylamid/7M ureagel.  
30

35 Ekspresjonsmønsteret til FLT4 analysert i dette eksperimentet viste at meget svake mRNA-signaler ble oppnådd fra lunge, lever, hjerte, nyre, skjelettmuskel og milt, mens testis og hjerne var tilsynelatende uten spesifikke signaler (fig. 1A). Analyse av en serie av RNA oppsamlet under forskjellige faser av musens utvikling ved RNase beskyttelsesassay viste at FLT4 mRNA ble uttrykt gjennom embryogenese fra dag 8 p.c. til nyfødte mus uten store variasjoner i signalintensitet (fig. 1B).

Eksempel 3In situ hybridisering for FLT4 i museembryoer

For bedre å an vise FLT4-transkripter til celler og vev, ble snitt på 7,5 og 8,5 dag p.c. museembryoer hybridisert med merkede FLT4 RNA. Museembryoer ble avledet fra parring av CBA- og NMRI-mus. Gravide mus ble drept ved cerviks dislokasjon og embryoene ble enten øyeblikkelig frosset eller overført via fosfatbuffret saltoppløsning til 4% paraformaldehyd. Embryoene og isolerte museorganer ble fiksert i 18 timer ved 4°C, dehydrert og innstøpt i parafin og snittet i 6 µm snitt.

- 5 RNA-prober (antisens og sens) på 192 og 349 nukleotider (se eksempel 1) ble dannet fra lineariserte plasmider ved å bruke [<sup>35</sup>S]-UTP. In situ hybridisering av snitt ble utført i henhold til Wilikinson et al. <sup>(13, 14)</sup>, med de følgende modifiksjoner: 1) istedenfor toluen ble xylen brukt før innstøping i parafinvoks, 2) 6 µm snitt ble snittet, plassert på et lag av dietylpyrokarbonatbehandlet vann på overflaten av objektglass forbehandlet med 2% 3-trietoksysilylpropylamin, 3) alkalisk hydrolyse av prøvene ble unngått, og 4) den høystringensvasken var i 80 min. ved 65°C i en oppløsning som inneholdt 30 mM DTT og 1 x SSC. Snittene ble dekket med NTB-2-emulsjon (Kodak) og lagret ved 4°C. Objektglassene ble eksponert i 14 dager, utviklet og farget med hematoksylin. Kontrollhybridiseringer med senstråder og RNase A-behandlede snitt ga ikke noe spesifikt signal over bakgrunnen.

- 10 Som vist i fig. 2A og 2B, ble FLT4 mRNA ikke uttrykt i 7,5 dagers p.c. museembryoer, men klare signaler ble detektert i bakre kardinalvene (cv) på dag 8,5 i utviklingen. I kontrast var det utviklende hjerte (data ikke vist) og dorsal aorta (da) FLT4-negative. I de ekstraembryone vevene var FLT4 prominent uttrykt i allantois (al i panel B), mens utviklende blodøyer i plommesekken var negative (data ikke vist). På den andre side var angioblaster (ab) i hodemesenchym sterkt FLT4-positive (C). I den utviklende placenta ble FLT4-signaler først sett i perifere sinusoidale vener (data ikke vist). I 9,5 dag p.c. placenta ble endotele til venøse lakuner (vl i D) og gigantceller delvis fusjonert til Reicherts membran (data ikke vist) uttrykt FLT4 mRNA.

- 15 Således, skjønt FLT4-ekspresjon var meget prominent i de tidligste endotelcelleforløpere, angioblastene, synes den å være begrenset bare til visse kar i 8,5 dag p.c. embryoer. Tie-reseptoren er kjent for å være uttrykt i alle endotelceller hos utviklende museembryoer og tilveiebringer således en markør for disse celler.
- 35 Bemerkelsesverdig i kontrast til Tie-proben, hybridiserte FLT4-proben meget svakt, hvis i det hele tatt med arterielt endotel hos 11,5 dag p.c. embryoer, f.eks. med endotelet til den utviklende dorsale aorta (da i fig. 2E,F) eller karotisarteriene (data ikke vist). Isteden var FLT4-signalene mye mer prominent i de utviklende

vener. F.eks. ble FLT4-signal detektert i vener som omgir den utviklende metanefros (v, sv i E), mens Tie-proben hovedsakelig gjenkjente kapillærer (c) i metanefros (F).

Som kan ses fra fig. 3, er FLT4 mRNA fordelt i flere regioner hos en 12,5 dag p.c. museembryo, og er spesielt prominent i de dilaterte kar i aksillarregionen (ax). En lignende FLT4-positiv karstruktur ble sett i midtsagittalsnittet i jugularområdet (data ikke vist). Et pleksuslikt mønster til FLT4-uttrykkende kar kom til syne i den periorbitale region (po) og omgir den utviklende ryggrad (vb). Også direkte under den utviklende hud var et FLT4-positivt vaskulært nettverk klart (sc). Svake kapillær-signaler ble oppnådd fra flere regioner, inkludert den utviklende hjerne (b). FLT4 mRNA kunne også detekteres i små kar i halsregionen, til den utviklende snute og i basis av den utviklende tunge såvel som i haleregionen (data ikke vist). Ved siden var lever (li) sterkt positiv for FLT4 mRNA i et flekklikt mønster.

Under ytterligere utvikling synes FLT4 RNA å bli mer begrenset til visse kar i embryo. En 14,5-dag p.c. embryo viser meget pent dette begrensede ekspresjonsmønster (fig. 4A, B). I det midtsagittale snitt i fig. 4 er det mest prominente FLT4-signal sett langs den utviklede ryggmargen i dens fremre part. Dette signal ble vurdert å ha sin opprinnelse fra endotelceller i ductus throacicus (dt), som er det største lymfekar dannet på dette utviklingstrinn. I kontrast var dorsal aorta (da) og nedre vena cava (vc) negative. Dilaterte kar i mesenteriere (involls) -regionen var også sterkt positive for FLT4. Videre, som i 12,5-dag p.c. embryoer, inneholdt karnettverk langs anatomiske grenser i den periorbitale (po) region, lavere kjeve-region (lj) såvel som i halsregionen (ne) FLT4-positivt endotel. Lignende strukturer var tilstede i det perikardiale rom og gjennom det subkutane (sc) vev. Bemerkelsesverdig i kontrast til FLT4-negative kar var alle FLT4-positive kar tomme for blodceller i sitt lumen. Disse ekspresjonsmønster antyder at FLT4 blir begrenset til endotel i lymfekar på dette utviklingstrinn. Et ytterligere sete hvor vi observerte FLT4-ekspresjon var i sinusene til den utviklende benmarg (bm).

Fotografier av et transverselt snitt av øvre thorax til et 16,5 dag p.c. embryo hybridisert med FLT4-proben er vist i panelene C og D i fig. 4. Snittet vist i C er blitt farget med hematoksylin-eosin for å synliggjøre de forskjellige typer av kar i dette området. Disse inkluderer arteria carotis og brachiocephalic (ca, ba), vena cava (vc) og ductus thoracicus, som er mindre i størrelse og mangler omgivende muskulært vev og bindevev (pil). En forstørrelse av regionen til ductus thoracicus er vist i panel D, hvor FLT4 autoradiografikornene kan sees. Endotelceller i ductus throacicus såvel som små kar (v) i nærheten hybridiserer med FLT4-proben.

#### Eksempel 4

##### Analyse av FLT4 mRNA i dyrkede endotelceller

In situ hybridiseringsresultater beskrevet i eksempel 3 viste at FLT4 er uttrykt i venøse endotelceller og senere i lymfatiske kar og noen venøse endotelceller, men ikke i arterielt endotel. For å se om slik regulering ble opprettholdt in vitro, studerte vi dyrkede endotelceller ved å bruke Northern blotting og hybridiseringsanalyse.

- 5 Endotelceller fra human aorta, femoralvene, umbilikalvene og fra mikrokar i forhud ble isolert, dyrket og karakterisert som tidligere beskrevet av Van Hinsberg, <sup>(15, 16)</sup>. De ble brukt ved konfluent tetthet etter fem til åtte passasjer (splittratio 1:3) for isolering av polyadenylert RNA.

Endotelcellelinjer EA hy926, BCE og LEII uttrykte ikke FLT4 (data ikke vist).

- 10 Dyrkede menneskelige mikrovaskulære endotelceller, venøse endotelceller og umbilikalvene endotelceller var imidlertid positive for FLT4-spesifikk 5,8 og 4,5 kb mRNA, mens aorta endotelcellene var negative (fig. 5). I motsetning til dette ble et annet endotelreseptortyrosinkinasegen, Tie, uttrykt som et 4,4 kb mRNA i alle endotelcelletyper undersøkt.

15 Eksempel 5

FLT4 mRNA i voksent humant vev

- Resultatene oppnådd i eksempel 3 anga at FLT4 mRNA blir i det store og hele begrenset til endotelet i lymfekar under utvikling. Pga. den potensielle betydning av dette funn hos mennesker, undersøkte vi også FLT4 i voksne humane vev ved å  
20 bruke en human FLT4-probe. Den humane FLT4-probe som ble benyttet var et EcoRI-SphI-fragment som dekket baseparene 1-595 i cDNA <sup>(3)</sup>. von Willebrand-faktorproben var et EcoRI-HindIII-fragment som dekket baseparene 1-2334 <sup>(17)</sup>.

Vi brukte rutinemessig fiksert materiale sendt for histopatologisk diagnose.

- 25 Normalt lungevev ble oppnådd fra en reseksjon av venstre nedre lungelapp påvirket av epidermoid kreft. Mesenterium og mesenteriale lymfeknuter ble oppnådd fra en pasient som hadde adenocarcinoma i kolon. En normal lymfeknute tilstøtende spyttkjertel ble enukleert pga. sin unormale størrelse. Tonsillene fra to pasienter og to blindtarmen hadde ingen diagnostiske forandringer. To lymfangiomyom og tre cystisk lymfangiom ble studert med lignende resultater.

- 30 For humane vev som var rutineprøver fiksert med 10% formalin for histopatologisk diagnose, ga den normale in situ-protokoll bare bakgrunn, mens mikrobølgebehandling i stedet for proteinase K gjorde det mulig med spesifikk hybridisering <sup>(18, 19)</sup>.

- 35 I lymfatisk endotel (lv) i mesenterium, lunge og appendiks ble det registrert FLT4-signaler, mens vener (v), arterier (a) og kapillærer (c) var negative (fig. 6A-D og data ikke vist). For å undersøke i hvilken grad FLT4 er uttrykt i HEV, ble tonsiller

studert. I tonsiller ble virkelig FLT4-spesifikk autoradiografiske korn detektert i noen HEV (E, F).

#### Eksempel 6

##### Analyse av FLT4 mRNA i normal og metastatisk lymfeknute og i lymfangiom

5

En del av en human mesenterial lymfeknute (se eks. 5) ble analysert for FLT4-ekspresjon. Resultatene er vist i fig. 7.

10

FLT4 er uttrykt i de lymfatiske sinuser (ls) og afferente og efferente lymfatiske kar (data ikke vist). Det samme mønster er sett i en lymfeknute som inneholder adenokarsinommetastaser (C,D). Noen HEV i både normale og metastatiske lymfeknuter var også positive. I panel E, er FLT4-ekspresjonen vist i et cystisk lymfangiom (sammenlign med hematoksylin-eosin farget snitt i F). Det bemerkes at spesifisiteten til FLT4 til lymfatisk endotel er klart fra sammenligningen med in situ-signaler for von Willebrandt-faktor i alle blodkar (F).

15

#### Eksempel 7

##### Lokalisering av FLT4 i føtale endotelceller

20

Et FLT4 cDNA-fragment som koder de 40 karboksyterminale aminosyrer og den korte formen ble klonet som et 657 bp EcoRI-fragment inn i pGEX-11T bakteriell ekspresjonsvektor (Pharmacia) i ramme med glutation-S-transferase kodende region. Den resulterende GST-FLT4-fusjonsprotein ble produsert i E.coli og rensed ved affinitetskromatografi ved å bruke en glutation-Sepharose 4B-kolonne. Det rensede protein ble lyofilisert, oppløst i PBS, blandet med Freund's adjuvans og brukt for immunisering av kaniner. Antisera ble brukt etter den fjerde boosterimmunisering.

25

Vev fra 17 og 20-ukers gamle humane foster ble oppnådd fra legale aborter induisert med prostaglandiner. Undersøkelsen ble godkjent av den etiske komité til Helsinki University Central Hospital. Gestasjonsalder ble estimert fra fosterets fotlengde. Føtal vev ble innbakt i Tissue-Tek (Miles), frosset umiddelbart og lagret ved -70°C.

30

Anti-FLT4-antiserum ble kryssabsorbert til en GST-sefarosekolonne for å fjerne anti-GST-antistoffer og deretter rensed ved GST-FLT4-affinitetskromatografi. Flere 6 µm tykke kryostatsnitt av vevene ble fiksert med aceton og behandlet med 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i metanol i 30 min. for å blokkere endogen peroksidaseaktivitet. Etter vasking ble snittene inkubert med 5% normalt svineserum. Snittene ble deretter

35

inkubert med antistoffer mot FLT4, vasket og bundede antistoffer ble detektert med peroksidasekonjugert svineanti-kanin IgG etterfulgt av farging for peroksidaseakti-

vitet ved å bruke 0,2% 3,3-diaminbenzidin (Amersham) som et substrat. Snittene ble motfarget i Meyers hematoksylin.

5 Anti-FLT4 immunperoksidasefarging av humant føtalt mesenterium viste FLT4-protein i endotelet til flere kar (fig. 4A), mens kontrollfargingen med antigenblokkert anti-FLT4-antistoffer (B) og preimmunsera (C) var negative. For sammenligning viser fig. 4D resultatene av farging ved å bruke et antiserum mot faktor VIII-relatert antigen, som er spesifikk for vaskulære endotelceller.

### Eksempel 8

#### Produksjon av monoklonale antistoffer mot FLT4

##### 10 Fusjon I:

15 Fire måneder gamle Balb/c hanmus ble immunisert ved intraperitoneal injeksjon av de rekombinant produserte FLT4-protein (se eksempel 7) i konsentrert medium (150 µg/mus), emulgert med Freund's fullstendige adjuvans. Boosterinjeksjoner på 150 µg blir gitt ved tre til fire ukers intervaller og en avsluttende booster (10 µg FLT4 i PBS administrert intraperitonealt) ble gitt etter enda tre ukers interval. Fire dager etter den avsluttende boosterdose ble musene ofret og musens miltlymfoidceller ble fusjonert med SP 2/0 plasmacytomceller i et 2:1 forhold.

20 De fusjonerte celler ble høstet i 96-brønners kulturplater (NUNC) i Ex-Cell 320 medium (SERALAB) som inneholder 20% føtalt kalveserum og HAT-supplement (hypoxantin-aminopterin-tymidin; GIBCO, 043-01060H; fortynnet 50 ganger). Cellene ble dyrket ved +37°C i en 5% CO<sub>2</sub> atmosfære. Etter 10 dager ble HAT-supplementert medium forandret til HT-supplementert cellekultur (GIBCO; 043-01065H, fortynnet 50 ganger). HT-medium er identisk til HAT-medium, men mangler aminopterin.

25 I tre uker ble spesifikk antistoffproduksjon bestemt ved antigen-spesifikk immunofluoremetrisk assay, IFMA, beskrevet i eksempel 10. Herreklonene ble klonet ved begrensede fortynninger som beskrevet av Staszewski et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 57:865-868 (1984). Positive kloner ble ekspandert på 24-brønners vevskulturplater (NUNC), reklonet og retestet ved samme metode.  
30 Positive kloner ble testet med fluorescens-aktivert celledatering (FACS).

De stabile kloner sektrerte immunoglobuliner som hører til IgG1-klassen, unntagen en som produserte Ig som sannsynligvis tilhører klasse IgA. Underklassen til monoklonalt antistoff ble bestemt ved å bruke rottemonoklonalt antistoff til museunderklasse som biotinkonjugater (SEROTEC) i IFMA.

Balb/c-mus ble brukt for å fremstille monoklonale antistoffer i ascitesvæske. Hybridomene beskrevet ovenfor ble intraperitonealt injisert i mus etter forbehandling av dyrene med pristan (2, 6, 10, 14-tetrametylpentadekan 98%, ALDRICH-CHEMIE D7924 Steinheim, Cat.No. T 2,280-2). 0,5 ml pristan (i.v.) ble injisert ca. 5 to uker før hybridomcellene. Mengden av celler injisert var tilnærmet  $7,5$  til  $9 \times 10^6$  pr. mus. Ascites ble oppsamlet 10 til 14 dager etter injeksjon av hybridomene.

#### Fusjonering II:

10 To måneder gamle balb/c-mus (hun) ble immunisert ved intraperitoneal injeksjon av rekombinant produsert FLT4-protein (se eksempel 7) ( $20 \mu\text{g}/\text{mus}$ ), emulgert med Freund's fullstendige adjuvans. Boosterinjeksjoner på  $20 \mu\text{g}$  ble gitt ved tre til fire ukeintervaller og en avsluttende booster ( $10 \mu\text{g}$  FLT-4 i PBS administrert i.v.) ble gitt etter et annet tre ukers intervall. Fire dager etter den avsluttende boosterdose, ble musene ofret og lymfoidceller fra musemilt ble fusjonert med SP 2/0 plasmacytomceller i et 2:1 forhold.

15 De fusjonerte celler ble høstet i 96-brønners kulturplater (FALCON) i OptiMEM 1 (med Glutamax 1, 51985-026, GIBCO BRL) medium som inneholder 20% føtalt kalveserum og HAT-supplement (hypoxanthin-aminopterin-thymidin; GIBCO BRL 21060-017; fortyntet 1:50 ganger). Celler ble dyrket ved  $37^\circ\text{C}$  i en 5%  $\text{CO}_2$  atmosfære. Etter 10 dager, ble HAT-supplementert medium forandret til HT-supplementert cellekulturmedium (GIBCO BRL; 41065-012, fortyntet 1:50 20 ganger). HT-medium er identisk til HAT-medium, men mangler aminopterin.

25 I tre uker ble spesifikk antistoffproduksjon bestemt ved antigen-spesifikk ImmunoFluoroMetric Assay (IFMA) beskrevet i eksempel 9. Tre herrekloner ble klonet ved begrensede fortyninger som beskrevet av Staszewski et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 57:865-868 (1984). Positive kloner ble ekspandert på 24-brønners vevskulturplater (FALCON), reklonet og retestet ved samme metode. Positive kloner ble testet ved fluoresens-aktivert celledatering (FACS).

30 2E11-klon og 6B2-klon sekreterte immunoglobuliner som hører til klasse  $\text{IgG}_1$ , 2B12-kloner produserte Ig som hører til underklassen  $\text{IgM}$ . Museunderklasse  $\text{IgG}_1$  ble bestemt ved å bruke rottemonoklonalt antistoff mot museunderklasse tung kjede som biotinkonjugat (SEROTEC) i IFMA og musunderklasse  $\text{IgM}$  ble bestemt med Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Dipstick Format) (19663-012, Life Technologies Inc.).

#### Eksempel 9

35 Spesifisitet til monoklonale antistoffer mot FLT4

#### Fusjon I antistoffer:

Det ekstracellulære domene til FLT4 beskrevet i eksempel 7, ble merket i henhold til Mukkala et al., i *Anal.Biochem.* 176(2):319-325, 1989, med følgende modifikasjoner: et 250 ganger molart overskudd av isotiocyanat DTTA-Eu (N1 chelat, WALLAC, Finland) ble satt til FLT4-oppløsningen (0,5 mg/ml i PBS) og pH-verdien ble justert til ca. 9 ved tilsetning av 0,5 mol/l natriumkarbonatbuffer, pH-verdi lik 9,8. Merkingen ble utført natten over ved 4°C. Ubundet merke ble fjernet ved å bruke PD-10 (PHARMACIA, Sverige) med TSA-buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH-verdi 7,8 som inneholder 0,15 mol/l NaCl) som elueringsmiddel.

Etter rensing ble 1 mg/ml bovint serumalbumin (BSA) satt til det merkede FLT4 og merket ble lagret ved +4°C. Antall europiumioner inkorporert pr. FLT4-molekyl var 1,9, som bestemt ved å måle fluoresensen i et forhold til det for kjent  $\text{EuCl}_3$ -standarder (Hemmilä et al., *Anal.Biochem.*, 137:335-343, 1984).

Antistoffene produsert i eksempel 8, ble screenet ved å bruke en Sandwichtype immunofluorometrisk assay som benytter mikrotitreringsstripbrønner (NUNC, polysorb) belagt med kanin anti-mus Ig (Z 259, DAKOPATTS). De forbelagte brønner ble vasket en gang med Platewash 1296-024 (WALLAC) med DELFIA vaskeoppløsning. DELFIA assaybuffer ble brukt som en fortynningsbuffer for cellekultursupernatanter og for serum til den spleenektomerte mus (ved fortynninger mellom 1:1000 til 1:100 000) brukt som positiv kontroll i den preliminare screeningsassay.

En natten over inkubasjon ved +4°C (eller alternativt i 2 timer ved værelsestemperatur) ble begynt ved å riste på en Plateshake ristemaskin (1296-001, WALLAC) i 5 min. etterfulgt av vasking fire ganger med vaskeoppløsning som beskrevet ovenfor.

Europium-merket FLT4 ble tilsatt i en fortynning på 1:500 i 100 µl av assaybuffer. Etter 5 min. på en Plateshake ristemaskin og en times inkubasjon ved RT ble strimlene vasket som beskrevet ovenfor.

Forsterkningsoppløsning (DELFIA) ble tilsatt med 200 µl/brønn. Platene ble deretter ristet i 5 min. på en Plateshake ristemaskin og intensiteten til fluoresensen ble målt med ARCUS-1230 (WALLAC) i 10-15 min. (Lövgren et al., i: Collins W.P. (red) *Alternative Immunoassays*, John Wiley & Sons Ltd., 1985; pp. 203-216).

De resulterende monoklonale antistoffer mot FLT4 og tilsvarende FACS-resultater er oppsummert i tabell 2.

Tabell 2

Mab-kloner	LTR% <sup>a)</sup>	NEO% <sup>b)</sup>	DELFLIA-tellinger
1B1	67,3	1	20625
1B1D11	75	1,2	19694
1B1F8	76,1	1,4	18580
4F6	69,9	1,2	23229
4F6B8G12	75	0,3	24374
4F6B8H11	75,9	0,3	28281
4F6B8E12	74,8	0,4	27097
4F6B8G10	75,3	0,4	26063
9D9	45,1	0,75	17316
9D9D10	71,7	2,3	18230
9D9F9	73	1,8	11904
9D9G6	74,3	2,9	16743
9D9G7	70,7	1,3	17009
10E4	24,2	1,4	39202
10E4B10E12	32,3	0,3	42490
10E4B10G10	36,5	0,3	54815
10E4B10F12	45,6	0,4	43909
10E4B10G12	45,7	0,5	35576
11G2	30,2	1,6	11304
11G2D12	74,4	1,5	14660
11G2G9	74,2	0,9	10283
11G2H7	74,4	2,1	25382

<sup>a)</sup> FACS resultater med LTR-transfekterte celler

<sup>b)</sup> FACS resultater med NEO-celler (kontroll)

- 5 En klon, betegnet anti-FLT4 9D9F9 ble funnet å sekretere stabilt monoklonalt antistoff som ble bestemt å være av immunoglobulinklasse i IgG1 ved IFMA. Hybridom 9D9F9 ble deponert med German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Department of Human and Animal Cell Cultures and Viruses, Mascheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig, Tyskland, 23. mars 1995 og gitt aksjesjonsnr. ACC2210.

Fusjon II antistoffer:

- Det ekstracellulære domene til FLT-4 beskrevet i eksempel 7, ble merket i henhold til Mukkala et al., i Anal.Biochem. 176(2): 319-325, 1989, med følgende modifikasjoner: et 250 ganger molart overskudd av isotiacyanat DTTA-Eu (N1 chelat, 5  
Wallac, Finland) ble satt til FLT-4-oppløsningen (0,5 mg/ml i PBS) og pH-verdien ble justert til ca. 9 ved tilsetning av 0,5 mol/l natriumkarbonatbuffer, pH-verdi 9,8. Merkingen ble utført natten over ved +4°C. Ubundet merke ble fjernet ved å bruke PD-10 (PHARMACIA) med TSA-buffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH-verdi 7,8 som inneholder 0,15 mol/l NaCl) som elueringsmiddel.
- 10 Etter rensing ble 1 mg/ml bovint serumalbumin (BSA) tilsatt det merkede FLT-4 og merket ble lagret ved +4°C. Antall europiumioner inkorporert pr. FLT-4-molekyl var 1,9, som bestemt ved å måle fluoresensen i et forhold til fluoresensen til kjente EuCl<sub>3</sub>-standard (Hemmil et al., Anal.Biochem., 137:335-343, 1984).
- Antistoffene produsert i eksempel 8 ble screenet ved å bruke en FLT-4-spesifikk 15 IFMA ved å bruke mikrotitreringsbrønner (Nunc, Polysorb) belagt med kanin antimus Ig (Z 259, DAKO). De forbelagte brønner ble vaske en gang med vaskeoppløsning (Wallac) ved å bruke DELFIA platevask.
- DELFIA assaybufferen ble brukt som fortynningsbuffer for cellekultursupernatanter (fortynning 1:2 i preliminær screening) og for serum til de splenektomerte mus 20 (fortynninger 1:1000 til 1:100 000) som ble brukt som positiv kontroll. Som standard ble det rensede anti FLT-4 9D9F9 (musunderklasse IgG1) ved konsentrasjoner mellom 1,0 ng/ml og 250 ng/ml. Prøver ble først ristet i romtemperatur i fem minutter på Plate shake (Wallac) og deretter inkubert tilnærmet 18 timer ved +4°C. Rammene ble først vasket fire timer, deretter ble den Eu-merkede FLT-4 (1:2000 i 25 100 µl assaybuffer) tilsatt og endelig ble rammene inkubert i 1 time ved værelses-temperatur. Etter vasking som beskrevet i forsterkningsoppløsningen (200 µl/brønn, Wallac) tilsatt og rammene ble ristet i 5 minutter på Plate shake. Intensiteten av fluoresensen ble målt med ARCUS-1230 (Wallac).
- De resulterende monoklonale antistoffer mot FLT-4 og tilsvarende resultater er 30 oppsummert i tabell 3.
- En standardkurve for kvantifisering av anti-FLT4-antistoffer ble gjort ved å bruke affinitetsrenset anti-FLT-4 9D9F9. Det lineære området strakte seg fra 1,0 ng/ml til 250 ng/ml.
- Cellelysat av NIH 3T3-celler kotransfektet med pLTRFLT4-konstruksjon som 35 uttrykker full lengde FLT4 på overflaten ble elektroforet i 6,5% SDS-PAGE, proteiner ble overført på nitrocellulosenitratmembran (0,45 µm, SCHLEICHER &

SCHUELL) og immunoblottet med Mab cellekultursupernatanter (1:10, 50 mmol/l TRIS - 40 mmol/l glycinbuffer som inneholder metanol 4%, SDS 0,04%). Spesifisiteten til Mab ble detektert ved å bruke inkubasjon med HRP-konjugert kanin antimus Ig (P 161, DAKO, fortynnet 1:1000 i 20 mmol/l TRIS-buffer pH-verdi 7,5 som inneholder 150 mmol/l saltoppløsning, 5% melkepulver) og ECL (forøket kjemoluminescens, AMERSHAM).

**Tabell 3**

Mab-kloner	LTR% <sup>a)</sup>	NEO <sup>b)</sup>	Ca. Mab-prod. ng/ml/10 <sup>6</sup> celler <sup>c)</sup>	WB
2B12E10	39,5	6,0	440	+
2E11D11	44,6	8,8	110	+
2E11F9	49,5	4,5	100	+
2E11F12	46,0	4,1	180	+
2E11G8	41,2	7,8	160	+
6B2E12	NF	NF	1390	+
6B2F8	NF	NF	470	+
6B2G6	NF	NF	630	+
6B2H5	NF	NF	740	+
6B2H8	NF	NF	1800	+

<sup>a)</sup> FACS resultater med LTR-transfektete celler

<sup>b)</sup> FACS resultater med NEO-celler (kontroll)

10 NF ikke funksjonerende i FACS

<sup>c)</sup> kvantifisering av Mab-produksjon basert på affinitetsrenset antiFLT 9D9F9 antistoff brukt som standard

15 Som bør være klart fra det foregående er anvendelse av antistoffer i henhold til foreliggende oppfinnelse nyttig ved diagnose og identifisering av lymfatiske kar, lymfatiske endotelceller, høye endotelvenyler, lymfangiom, metastatiske lymfeknuter og andre sykdomstilstander i det lymfatiske system, deteksjon og overvåking av metastatiske spredning ved stimulering og inhibisjon av endotelceller i lymfekar og høye endotelvenyler, i introduksjon av molekyler selektivt inn i endotelceller og i billedannelse av lymfatiske kar og deres sykdomstilstander.

## SEKVENSLISTE

## (1) GENERELL INFORMASJON

## (i) SØKER:

- 5 (A) NAVN: Kari Alitalo  
(B) GATE: Nyyrikintie 4 A  
(C) BY: ESPOO  
(E) LAND: FINLAND  
(F) POSTKODE (ZIP): FIN-02100
- 10 (A) NAVN: Arja Kaipainen  
(B) GATE: Messeniuksenkatu 7 A 9  
(C) BY: HELSINKI  
(E) LAND: FINLAND  
(F) POSTKODE (ZIP): FIN-00250
- 15 (A) NAVN: Jaana Korhonen  
(B) GATE: Agricolankatu 7 C 68  
(C) BY: HELSINKI  
(E) LAND: FINLAND  
(F) POSTKODE (ZIP): FIN-00530
- 20 (A) NAVN: Tuija Mustonen  
(B) GATE: Pihlajatie 8 A 2  
(C) BY: HELSINKI  
(E) LAND: FINLAND  
(F) POSTKODE (ZIP): FIN-00270
- 25 (A) NAVN: Katri Pajusola  
(B) GATE: Kasteholmantie 4 A 8  
(C) BY: HELSINKI  
(E) LAND: FINLAND  
(F) POSTKODE (ZIP): FIN-00900
- 30 (A) NAVN: Katri Pajusola  
(B) GATE: Kasteholmantie 4 A 8  
(C) BY: HELSINKI  
(E) LAND: FINLAND  
(F) POSTKODE (ZIP): FIN-00900

- (A) NAVN: Marja-Terttu Matikainen  
 (B) GATE: Lankkistentanhua 12  
 (C) BY: MYNÄMÄKI  
 (E) LAND: FINLAND  
 5 (F) POSTKODE (ZIP): FIN-23100
- (A) NAVN: Päivi Karnani  
 (B) GATE: Mullintie 10 B 62  
 (C) BY: TURKU  
 10 (E) LAND: FINLAND  
 (F) POSTKODE (ZIP): FIN-20300
- (ii) OPPFINNELSENS TITTEL: FLT4-reseptor tyrosinkinase og dens  
 anvendelse i diagnose og terapi
- (iii) ANTALL SEKVENSER: 1
- 15 (iv) COMPUTERLESBART FORMAT  
 (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
 (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel  
 (C) OPERATIVSYST: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1,0, versjon 1,25  
 20 (EPO)
- (v) RELEVANT SØKNADSDATA: søknadsnummer WO skal gis
- (vi) TIDLIGERE SØKNADSDATA  
 (A) SØKNADSNUMMER: US 08/257754  
 (B) INNSENDINGSDATO: 9. juni 1994
- 25 (2) INFORMASJON OM SEQ ID No: 1

CCACGCGCAG CGGCCGGAG ATG CAG CGG GGC GCC GCG CTG TGC CTG CGA CTG  
 52

Met Gln Arg Gly Ala Ala Leu Cys Leu Arg Leu

1

5

10

TGG CTC TGC CTG GGA CTC CTG GAC GGC CTG GTG AGT GGC TAC TCC ATG  
 100

Trp Leu Cys Leu Gly Leu Leu Asp Gly Leu Val Ser Gly Tyr Ser Met  
 15 20 25

ACC CCC CCG ACC TTG AAC ATC ACG GAG GAG TCA CAC GTC ATC GAC ACC  
 148  
 Thr Pro Pro Thr Leu Asn Ile Thr Glu Glu Ser His Val Ile Asp Thr  
 30 35 40

GGT GAC AGC CTG TCC ATC TCC TGC AGG GGA CAG CAC CCC CTC GAG TGG  
 196  
 Gly Asp Ser Leu Ser Ile Ser Cys Arg Gly Gln His Pro Leu Glu Trp  
 45 50 55

GCT TGG CCA GGA GCT CAG GAG GCG CCA GCC ACC GGA GAC AAG GAC AGC  
 244  
 Ala Trp Pro Gly Ala Gln Glu Ala Pro Ala Thr Gly Asp Lys Asp Ser  
 60 65 70 75

GAG GAC ACG GGG GTG GTG CGA GAC TGC GAG GGC ACA GAC GCC AGG CCC  
 292  
 Glu Asp Thr Gly Val Val Arg Asp Cys Glu Gly Thr Asp Ala Arg Pro  
 80 85 90

TAC TGC AAG GTG TTG CTG CTG CAC GAG GTA CAT GCC AAC GAC ACA GGC  
 340  
 Tyr Cys Lys Val Leu Leu Leu His Glu Val His Ala Asn Asp Thr Gly  
 95 100 105

AGC TAC GTC TGC TAC TAC AAG TAC ATC AAG GCA CGC ATC GAG GGC ACC  
 388  
 Ser Tyr Val Cys Tyr Tyr Lys Tyr Ile Lys Ala Arg Ile Glu Gly Thr  
 110 115 120

ACG GCC GCC AGC TCC TAC GTG TTC GTG AGA GAC TTT GAG CAG CCA TTC  
 436  
 Thr Ala Ala Ser Ser Tyr Val Phe Val Arg Asp Phe Glu Gln Pro Phe  
 125 130 135

ATC AAC AAG CCT GAC ACG CTC TTG GTC AAC AGG AAG GAC GCC ATG TGG  
 484  
 Ile Asn Lys Pro Asp Thr Leu Leu Val Asn Arg Lys Asp Ala Met Trp  
 140 145 150 155

GTG CCC TGT CTG GTG TCC ATC CCC GGC CTC AAT GTC ACG CTG CGC TCG  
 532  
 Val Pro Cys Leu Val Ser Ile Pro Gly Leu Asn Val Thr Leu Arg Ser  
 160 165 170

CAA AGC TCG GTG CTG TGG CCA GAC GGG CAG GAG GTG GTG TGG GAT GAC  
 580  
 Gln Ser Ser Val Leu Trp Pro Asp Gly Gln Glu Val Val Trp Asp Asp  
 175 180 185

CGG CGG GGC ATG CTC GTG TCC ACG CCA CTG CTG CAC GAT GCC CTG TAC  
 628  
 Arg Arg Gly Met Leu Val Ser Thr Pro Leu Leu His Asp Ala Leu Tyr  
 190 195 200

CTG CAG TGC GAG ACC ACC TGG GGA GAC CAG GAC TTC CTT TCC AAC CCC  
 676  
 Leu Gln Cys Glu Thr Thr Trp Gly Asp Gln Asp Phe Leu Ser Asn Pro  
 205 210 215

TTC CTG GTG CAC ATC ACA GGC AAC GAG CTC TAT GAC ATC CAG CTG TTG  
 724  
 Phe Leu Val His Ile Thr Gly Asn Glu Leu Tyr Asp Ile Gln Leu Leu  
 220 225 230 235

CCC AGG AAG TCG CTG GAG CTG CTG GTA GGG GAG AAG CTG GTC CTG AAC  
 772  
 Pro Arg Lys Ser Leu Glu Leu Leu Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn  
 240 245 250

TGC ACC GTG TGG GCT GAG TTT AAC TCA GGT GTC ACC TTT GAC TGG GAC  
 820  
 Cys Thr Val Trp Ala Glu Phe Asn Ser Gly Val Thr Phe Asp Trp Asp  
 255 260 265

TAC CCA GGG AAG CAG GCA GAG CGG GGT AAG TGG GTG CCC GAG CGA CGC  
 868  
 Tyr Pro Gly Lys Gln Ala Glu Arg Gly Lys Trp Val Pro Glu Arg Arg  
 270 275 280

TCC CAG CAG ACC CAC ACA GAA CTC TCC AGC ATC CTG ACC ATC CAC AAC  
 916  
 Ser Gln Gln Thr His Thr Glu Leu Ser Ser Ile Leu Thr Ile His Asn  
 285 290 295

GTC AGC CAG CAC GAC CTG GGC TCG TAT GTG TGC AAG GCC AAC AAC GGC  
 964  
 Val Ser Gln His Asp Leu Gly Ser Tyr Val Cys Lys Ala Asn Asn Gly  
 300 305 310 315

ATC CAG CGA TTT CGG GAG AGC ACC GAG GTC ATT GTG CAT GAA AAT CCC  
 1012  
 Ile Gln Arg Phe Arg Glu Ser Thr Glu Val Ile Val His Glu Asn Pro  
 320 325 330

TTC ATC AGC GTC GAG TGG CTC AAA GGA CCC ATC CTG GAG GCC ACG GCA  
 1060  
 Phe Ile Ser Val Glu Trp Leu Lys Gly Pro Ile Leu Glu Ala Thr Ala  
 335 340 345

GGA GAC GAG CTG GTG AAG CTG CCC GTG AAG CTG GCA GCG TAC CCC CCG  
 1108  
 Gly Asp Glu Leu Val Lys Leu Pro Val Lys Leu Ala Ala Tyr Pro Pro  
 350 355 360

CCC GAG TTC CAG TGG TAC AAG GAT GGA AAG GCA CTG TCC GGG CGC CAC  
 1156  
 Pro Glu Phe Gln Trp Tyr Lys Asp Gly Lys Ala Leu Ser Gly Arg His  
 365 370 375

AGT CCA CAT GCC CTG GTG CTC AAG GAG GTG ACA GAG GCC AGC ACA GGC  
 1204  
 Ser Pro His Ala Leu Val Leu Lys Glu Val Thr Glu Ala Ser Thr Gly  
 380 385 390 395

ACC TAC ACC CTC GCC CTG TGG AAC TCC GCT GCT GGC CTG AGG CGC AAC  
 1252  
 Thr Tyr Thr Leu Ala Leu Trp Asn Ser Ala Ala Gly Leu Arg Arg Asn  
 400 405 410

ATC AGC CTG GAG CTG GTG GTG AAT GTG CCC CCC CAG ATA CAT GAG AAG  
 1300  
 Ile Ser Leu Glu Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile His Glu Lys  
 415 420 425

GAG GCC TCC TCC CCC AGC ATC TAC TCG CGT CAC AGC CGC CAG GCC CTC  
 1348  
 Glu Ala Ser Ser Pro Ser Ile Tyr Ser Arg His Ser Arg Gln Ala Leu  
 430 435 440

ACC TGC ACG GCC TAC GGG GTG CCC CTG CCT CTC AGC ATC CAG TGG CAC  
 1396  
 Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Val Pro Leu Pro Leu Ser Ile Gln Trp His  
 445 450 455

TGG CGG CCC TGG ACA CCC TGC AAG ATG TTT GCC CAG CGT AGT CTC CGG  
 1444

Trp Arg Pro Trp Thr Pro Cys Lys Met Phe Ala Gln Arg Ser Leu Arg  
 460 465 470 475

CGG CGG CAG CAG CAA GAC CTC ATG CCA CAG TGC CGT GAC TGG AGG GCG  
 1492  
 Arg Arg Gln Gln Gln Asp Leu Met Pro Gln Cys Arg Asp Trp Arg Ala  
 480 485 490

GTG ACC ACG CAG GAT GCC GTG AAC CCC ATC GAG AGC CTG GAC ACC TGG  
 1540  
 Val Thr Thr Gln Asp Ala Val Asn Pro Ile Glu Ser Leu Asp Thr Trp  
 495 500 505

ACC GAG TTT GTG GAG GGA AAG AAT AAG ACT GTG AGC AAG CTG GTG ATC  
 1588  
 Thr Glu Phe Val Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser Lys Leu Val Ile  
 510 515 520

CAG AAT GCC AAC GTG TCT GCC ATG TAC AAG TGT GTG GTC TCC AAC AAG  
 1636  
 Gln Asn Ala Asn Val Ser Ala Met Tyr Lys Cys Val Val Ser Asn Lys  
 525 530 535

GTG GGC CAG GAT GAG CGG CTC ATC TAC TTC TAT GTG ACC ACC ATC CCC  
 1684  
 Val Gly Gln Asp Glu Arg Leu Ile Tyr Phe Tyr Val Thr Thr Ile Pro  
 540 545 550 555

GAC GGC TTC ACC ATC GAA TCC AAG CCA TCC GAG GAG CTA CTA GAG GGC  
 1732  
 Asp Gly Phe Thr Ile Glu Ser Lys Pro Ser Glu Glu Leu Leu Glu Gly  
 560 565 570

CAG CCG GTG CTC CTG AGC TGC CAA GCC GAC AGC TAC AAG TAC GAG CAT  
 1780  
 Gln Pro Val Leu Leu Ser Cys Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Tyr Glu His  
 575 580 585

CTG CGC TGG TAC CGC CTC AAC CTG TCC ACG CTG CAC GAT GCG CAC GGG  
 1828  
 Leu Arg Trp Tyr Arg Leu Asn Leu Ser Thr Leu His Asp Ala His Gly  
 590 595 600

AAC CCG CTT CTG CTC GAC TGC AAG AAC GTG CAT CTG TTC GCC ACC CCT  
 1876  
 Asn Pro Leu Leu Leu Asp Cys Lys Asn Val His Leu Phe Ala Thr Pro  
 605 610 615

CTG GCC GCC AGC CTG GAG GAG GTG GCA CCT GGG GCG CGC CAC GCC ACG  
 1924  
 Leu Ala Ala Ser Leu Glu Glu Val Ala Pro Gly Ala Arg His Ala Thr  
 620 625 630 635

CTC AGC CTG AGT ATC CCC CGC GTC GCG CCC GAG CAC GAG GGC CAC TAT  
 1972  
 Leu Ser Leu Ser Ile Pro Arg Val Ala Pro Glu His Glu Gly His Tyr  
 640 645 650

GTG TGC GAA GTG CAA GAC CGG CGC AGC CAT GAC AAG CAC TGC CAC AAG  
 2020  
 Val Cys Glu Val Gln Asp Arg Arg Ser His Asp Lys His Cys His Lys  
 655 660 665

AAG TAC CTG TCG GTG CAG GCC CTG GAA GCC CCT CGG CTC ACG CAG AAC  
 2068  
 Lys Tyr Leu Ser Val Gln Ala Leu Glu Ala Pro Arg Leu Thr Gln Asn  
 670 675 680

TTG ACC GAC CTC CTG GTG AAC GTG AGC GAC TCG CTG GAG ATG CAG TGC  
 2116  
 Leu Thr Asp Leu Leu Val Asn Val Ser Asp Ser Leu Glu Met Gln Cys  
 685 690 695

TTG GTG GCC GGA GCG CAC GCG CCC AGC ATC GTG TGG TAC AAA GAC GAG  
 2164  
 Leu Val Ala Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Val Trp Tyr Lys Asp Glu  
 700 705 710 715

AGG CTG CTG GAG GAA AAG TCT GGA GTC GAC TTG GCG GAC TCC AAC CAG  
 2212  
 Arg Leu Leu Glu Glu Lys Ser Gly Val Asp Leu Ala Asp Ser Asn Gln  
 720 725 730

AAG CTG AGC ATC CAG CGC GTG CGC GAG GAG GAT GCG GGA CGC TAT CTG  
 2260  
 Lys Leu Ser Ile Gln Arg Val Arg Glu Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Leu  
 735 740 745

TGC AGC GTG TGC AAC GCC AAG GGC TGC GTC AAC TCC TCC GCC AGC GTG  
 2308  
 Cys Ser Val Cys Asn Ala Lys Gly Cys Val Asn Ser Ser Ala Ser Val  
 750 755 760

GCC GTG GAA GGC TCC GAG GAT AAG GGC AGC ATG GAG ATC GTG ATC CTT  
 2356  
 Ala Val Glu Gly Ser Glu Asp Lys Gly Ser Met Glu Ile Val Ile Leu  
 765 770 775

GTC GGT ACC GGC GTC ATC GCT GTC TTC TTC TGG GTC CTC CTC CTC CTC  
 2404  
 Val Gly Thr Gly Val Ile Ala Val Phe Phe Trp Val Leu Leu Leu Leu  
 780 785 790 795

ATC TTC TGT AAC ATG AGG AGG CCG GCC CAC GCA GAC ATC AAG ACG GGC  
 2452  
 Ile Phe Cys Asn Met Arg Arg Pro Ala His Ala Asp Ile Lys Thr Gly  
 800 805 810

TAC CTG TCC ATC ATC ATG GAC CCC GGG GAG GTG CCT CTG GAG GAG CAA  
 2500  
 Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp Pro Gly Glu Val Pro Leu Glu Glu Gln  
 815 820 825

TGC GAA TAC CTG TCC TAC GAT GCC AGC CAG TGG GAA TTC CCC CGA GAG  
 2548  
 Cys Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp Ala Ser Gln Trp Glu Phe Pro Arg Glu  
 830 835 840

CGG CTG CAC CTG GGG AGA GTG CTC GGC TAC GGC GCC TTC GGG AAG GTG  
 2596  
 Arg Leu His Leu Gly Arg Val Leu Gly Tyr Gly Ala Phe Gly Lys Val  
 845 850 855

GTG GAA GCC TCC GCT TTC GGC ATC CAC AAG GGC AGC AGC TGT GAC ACC  
 2644  
 Val Glu Ala Ser Ala Phe Gly Ile His Lys Gly Ser Ser Cys Asp Thr  
 850 865 870 875

GTG GCC GTG AAA ATG CTG AAA GAG GGC GCC ACG GCC AGC GAG CAC CGC  
 2692  
 Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu His Arg  
 880 885 890

GCG CTG ATG TCG GAG CTC AAG ATC CTC ATT CAC ATC GGC AAC CAC CTC  
 2740  
 Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly Asn His Leu  
 895 900 905

AAC GTG GTC AAC CTC CTC GGG GCG TGC ACC AAG CCG CAG GGC CCC CTC  
 2788  
 Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gln Gly Pro Leu  
 910 915 920

ATG GTG ATC GTG GAG TTC TGC AAG TAC GGC AAC CTC TCC AAC TTC CTG  
 2836  
 Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Phe Leu  
 925 930 935

CGC GCC AAG CGG GAC GCC TTC AGC CCC TGC GCG GAG AAG TCT CCC GAG  
 2884  
 Arg Ala Lys Arg Asp Ala Phe Ser Pro Cys Ala Glu Lys Ser Pro Gln  
 940 945 950 955

CAG CGC GGA CGC TTC CGC GCC ATG GTG GAG CTC GCC AGG CTG GAT CGG  
 2932  
 Gln Arg Gly Arg Phe Arg Ala Met Val Glu Leu Ala Arg Leu Asp Arg  
 960 965 970

AGG CGG CCG GGG AGC AGC GAC AGG GTC CTC TTC GCG CGG TTC TCG AAG  
 2980  
 Arg Arg Pro Gly Ser Ser Asp Arg Val Leu Phe Ala Arg Phe Ser Lys  
 975 980 985

ACC GAG GGC GGA GCG AGG CGG GCT TCT CCA GAC CAA GAA GCT GAG GAC  
 3028  
 Thr Glu Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ser Pro Asp Gln Glu Ala Glu Asp  
 990 995 1000

CTG TGG CTG AGC CCG CTG ACC ATG GAA GAT CTT GTC TGC TAC AGC TTC  
 3076  
 Leu Trp Leu Ser Pro Leu Thr Met Glu Asp Leu Val Cys Tyr Ser Phe  
 1005 1010 1015

CAG GTG GCC AGA GGG ATG GAG TTC CTG GCT TCC CGA AAG TGC ATC CAC  
 3124  
 Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His  
 1020 1025 1030 1035

AGA GAC CTG GCT GCT CGG AAC ATT CTG CTG TCG GAA AGC GAC GTG GTG  
 3172  
 Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Ser Asp Val Val  
 1040 1045 1050

AAG ATC TGT GAC TTT GGC CTT GCC CGG GAC ATC TAC AAA GAC CCT GAC  
 3220  
 Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp  
 1055 1060 1065

TAC GTC CGC AAG GGC AGT GCC CGG CTG CCC CTG AAG TGG ATG GCC CCT  
 3268  
 Tyr Val Arg Lys Gly Ser Ala Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro  
 1070 1075 1080

GAA AGC ATC TTC GAC AAG GTG TAC ACC ACG CAG AGT GAC GTG TGG TCC  
 3316  
 Glu Ser Ile Phe Asp Lys Val Tyr Thr Thr Gln Ser Asp Val Trp Ser  
 1085 1090 1095

TTT GGG GTG CTT CTC TGG GAG ATC TTC TCT CTG GGG GCC TCC CCG TAC  
 3364  
 Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr  
 1100 1105 1110 1115

CCT GGG GTG CAG ATC AAT GAG GAG TTC TGC CAG CGG CTG AGA GAC GGC  
 3412  
 Pro Gly Val Gln Ile Asn Glu Glu Phe Cys Gln Arg Leu Arg Asp Gly  
 1120 1125 1130

ACA AGG ATG AGG GCC CCG GAG CTG GCC ACT CCC GCC ATA CGC CGC ATC  
 3460  
 Thr Arg Met Arg Ala Pro Glu Leu Ala Thr Pro Ala Ile Arg Arg Ile  
 1135 1140 1145

ATG CTG AAC TGC TGG TCC GGA GAC CCC AAG GCG AGA CCT GCA TTC TCG  
 3508  
 Met Leu Asn Cys Trp Ser Gly Asp Pro Lys Ala Arg Pro Ala Phe Ser  
 1150 1155 1160

GAG CTG GTG GAG ATC CTG GGG GAC CTG CTC CAG GGC AGG GGC CTG CAA  
 3556  
 Glu Leu Val Glu Ile Leu Gly Asp Leu Leu Gln Gly Arg Gly Leu Gln  
 1165 1170 1175

GAG GAA GAG GAG GTC TGC ATG GCC CCG CGC AGC TCT CAG AGC TCA GAA  
 3604  
 Glu Glu Glu Glu Val Cys Met Ala Pro Arg Ser Ser Gln Ser Ser Glu  
 1180 1185 1190 1195

GAG GGC AGC TTC TCG CAG GTG TCC ACC ATG GCC CTA CAC ATC GCC CAG  
 3652  
 Glu Gly Ser Phe Ser Gln Val Ser Thr Met Ala Leu His Ile Ala Gln  
 1200 1205 1210

GCT GAC GCT GAG GAC AGC CCG CCA AGC CTG CAG CGC CAC AGC CTG GCC  
 3700  
 Ala Asp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Ser Leu Gln Arg His Ser Leu Ala  
 1215 1220 1225

GCC AGG TAT TAC AAC TGG GTG TCC TTT CCC GGG TGC CTG GCC AGA GGG  
 3748  
 Ala Arg Tyr Tyr Asn Trp Val Ser Phe Pro Gly Cys Leu Ala Arg Gly  
 1230 1235 1240

GCT GAG ACC CGT GGT TCC TCC AGG ATG AAG ACA TTT GAG GAA TTC CCC  
 3796  
 Ala Glu Thr Arg Gly Ser Ser Arg Met Lys Thr Phe Glu Glu Phe Pro  
 1245 1250 1255

ATG ACC CCA ACG ACC TAC AAA GGC TCT GTG GAC AAC CAG ACA GAC AGT  
 3844  
 Met Thr Pro Thr Thr Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gln Thr Asp Ser  
 1260 1265 1270 1275

GGG ATG GTG CTG GCC TCG GAG GAG TTT GAG CAG ATA GAG AGC AGG CAT  
 3892  
 Gly Met Val Leu Ala Ser Glu Glu Phe Glu Gln Ile Glu Ser Arg His  
 1280 1285 1290

AGA CAA GAA AGC GGC TTC AGG TAGCTGAAGC AGAGAGAGAG AAGGCAGCAT  
 3943  
 Arg Gln Glu Ser Gly Phe Arg  
 1295

ACGTCAGCAT TTTCTTCTCT GCACTTATAA GAAAGATCAA AGACTTTAAG ACTTTCGCTA  
 4003

TTTCTTCTAC TGCTATCTAC TACAACTTC AAAGAGGAAC CAGGAGGACA AGAGGAGCAT  
 4063

GAAAGTGGAC AAGGAGTGTG ACCACTGAAG CACCACAGGG AAGGGGTTAG GCCTCCGGAT  
 4123

GACTGCGGGC AGGCCTGGAT AATATCCAGC CTCCCACAAG AAGCTGGTGG AGCAGAGTGT  
 4183

TCCCTGACTC CT  
 4195

## REFERANSER

1. Sabin, F.R. 1909. The lymphatic system in human embryos, with consideration of the morphology of the system as a whole. *Am. J. Anat.* 9:43.
2. van der Putte, S.C.J. 1975. The development of the lymphatic system in man. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 51:3.
3. Pajusola, K., O. Aprelikova, J. Korhonen, A. Kaipainen, L. Pertovaara, R. Alitalo, and K. Alitalo. 1992. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.* 52:5738.
- 10 4. Kaipainen, A., J. Korhonen, K. Pajusola, O. Aprelikova, M.G. Persico, B.I. Terman, and K. Alitalo. 1993. The Related FLT4, FLT1 and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. *J. Exp. Med.* 178:2077.
- 15 5. Galland, F., A. Karamysheva, M.-J. Pebusque, J.-P. Borg, R. Rottapel, P. Dubreuil, O. Rosnet, and D. Birnbaum. 1993. The *FLT4* gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene.* 8:1233.
- 20 6. Millauer, B., S. Witzmann-Voos, H. Schnürch, R. Martinez, N.-P.H. Moller, W. Risau, and A. Ullrich. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 72:835.
7. Yamaguchi, T.P., D. Dumont, R.A. Conlon, M.L. Breitman, and J. Rossant. 1993. *flk-1*, an *flt*-related tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development.* 118:489.
- 25 8. Peters, K.G., C. De Vries, and L.T. Williams. 1993. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8915.
9. Finnerty, H., K. Kelleher, G. Morris E., K. Bean, D. Merberg, R. Kritz, J. Morris C., H. Sookdeo, K.J. Turner, and C.R. Wood 1993. Molecular cloning of murine FLT and FLT4. *Oncogene.* 8:2293.

10. Korhonen, J., A. Polvi, J. Partanen, and K. Alitalo. 1993. The mouse *tie* receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene*. 8:395.
11. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156.
12. Tokunaga, K., H. Taniguchi, K. Yoda, M. Shimizu, and S. Sakiyama. 1986. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal beta-actin mRNA. *Nucleic Acid. Res.* 14:2829.
13. Wilkinson, D.G., J.A. Bailes, J.E. Champion, and A.P. McMahon. 1987. A molecular analysis of mouse development from 8 to 10 days post coitum detects changes only in embryonic globin expression. *Development.* 99:493.
14. Wilkinson, D.G., J.A. Bailes, and A.P. McMahon. 1987. Expression of the proto-oncogene *int-1* is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell.* 50:79.
15. Van Hinsberg, V.W.M., D. Binnema, M.A. Scheffer, E.D. Sprengers, T. Kooistra, and D.C. Rijken. 1987. Production of plasminogen activators and inhibitors by serially propagated endothelial cells from adult human blood vessels. *Arteriosclerosis.* 7:389.
16. Van Hinsberg, V.W.M., M.A. Scheffer, and T. Kooistra. 1987. Effect of thrombin on the production of plasminogen activators and PA inhibitor-1 by human foreskin microvascular endothelial cells. *Thromb. Haemostas.* 57:148.
17. Bonthron, D.T., E.C. Orr, L.M. Mitscock, D. Ginsberg, R.I. Handin, and S.H. Orkin. 1986. Nucleotide sequence of pre-pro-von Willebrand factor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 14:7125.
18. Shi, E., M. Kan, J. Xu, and W.L. McKeehan. 1991. 16-kilodalton heparin binding (fibroblast) growth factor type one appears in a stable 40-kilodalton complex after receptor-dependent internalization. *J. Biol. Chem.* 266:5774.
19. Cattoretti, G., M.H.G. Becker, G. Key, M. Duchrow, C. Schlüter, J. Galle, and J. Gerdest. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin section. *J. of Pathol.* 168:357.

## PATENTKRAV

1.      Anvendelse av et monoklonalt antistoff rettet mot det ekstracellulære domenet til FLT-4-reseptor tyrosinkinase til fremstilling av en diagnostisk sammensetning for billeddanning av lymfatiske kar, lymfeknuter eller høye endoteliale venyler (HEV).  
5
2.      Anvendelse av et monoklonalt antistoff rettet mot det ekstracellulære domenet til FLT-4-reseptor tyrosinkinase til fremstilling av en diagnostisk sammensetning for å detektere lymfevev, lymfatiske kar og høye endoteliale venyler (HEV).
- 10     3.      Anvendelse som angitt i krav 2, hvori lymfe vevet som skal detekteres er lymfeknutevev.
4.      Anvendelse av et monoklonalt antistoff rettet mot det ekstracellulære domenet av FLT-4-reseptor tyrosinkinase til fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for å inhibere FLT-4-mediert lymfatisk vaskularisering som er  
15     assosiert med en sykdom valgt fra gruppen som består av: metastatisk kreft, lymfomer, lymfangiomer, kroniske eller akutte inflammasjoner, infeksjoner og immunologiske sykdommer.
5.      Anvendelse som angitt i ethvert av kravene 1-4, hvori nevnte monoklonale antistoff er et anti-FLT-4 monoklonalt antistoff fremstilt av en hybridom celledinje,  
20     deponert som DSM ACC 2210.
6.      Fremgangsmåte til å billeddanne lymfatiske kar i en vevsprøve,  
karakterisert ved at det omfatter trinnene:  
    (a) å applisere et detekterbart merket anti-FLT-4 antistoff på nevnte  
vevsprøve som er mistenkt for å inneholde lymfatiske kar; og  
25      (b) å detektere nevnte detekterbart merkede anti-FLT-4 antistoff bundet til nevnte vevsprøve.
7.      Fremgangsmåte til å diagnostisere sykdommer, kjennetegnet ved forand-  
ringer i lymfatiske kar og HEV,  
karakterisert ved at den omfatter trinnene:  
30      (a) å eksponere en vevsprøve oppnådd fra en pasient som er mistenkt for å ha en sykdom kjennetegnet ved forandringer i lymfatiske celler og HEV, til et merket anti-FLT-4 antistoff;  
    (b) å vaske nevnte vevsprøve; og  
    (c) å detektere nærvær av nevnte detekterbare merkede anti-FLT-4 i nevnte  
35     vevsprøve.

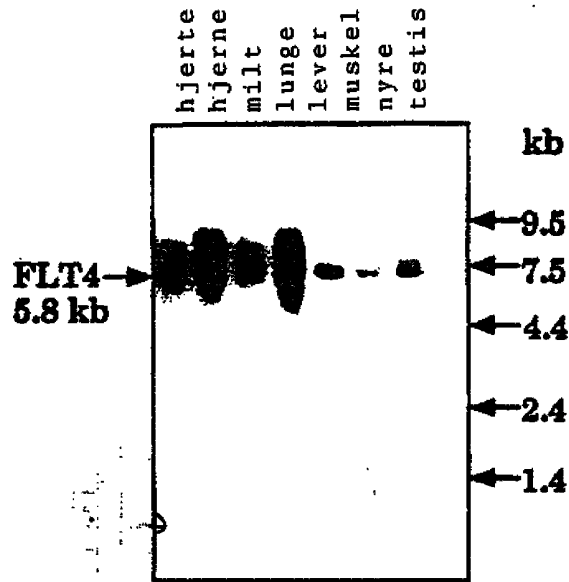


Fig. 1A

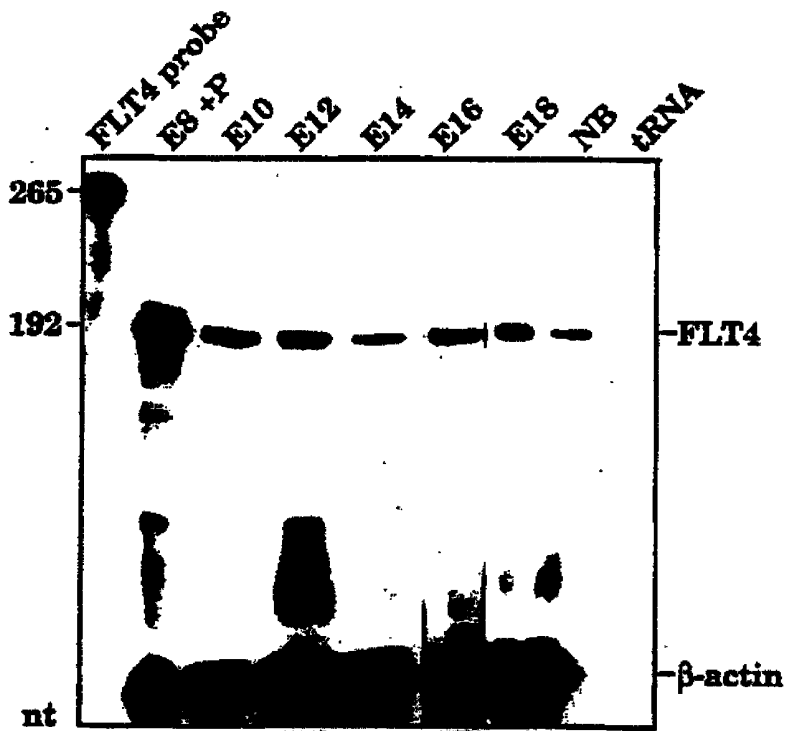


Fig. 1B

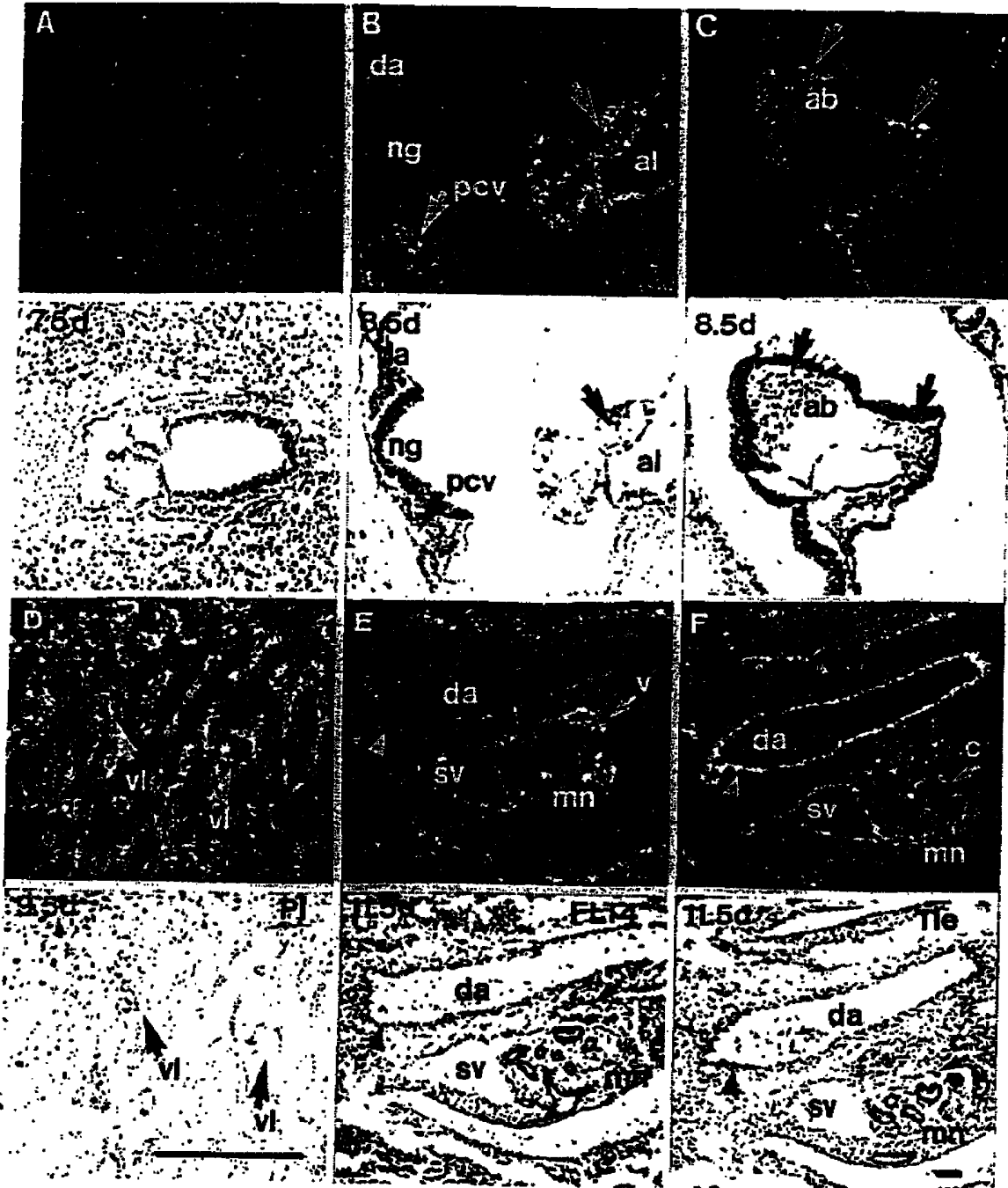


Fig. 2

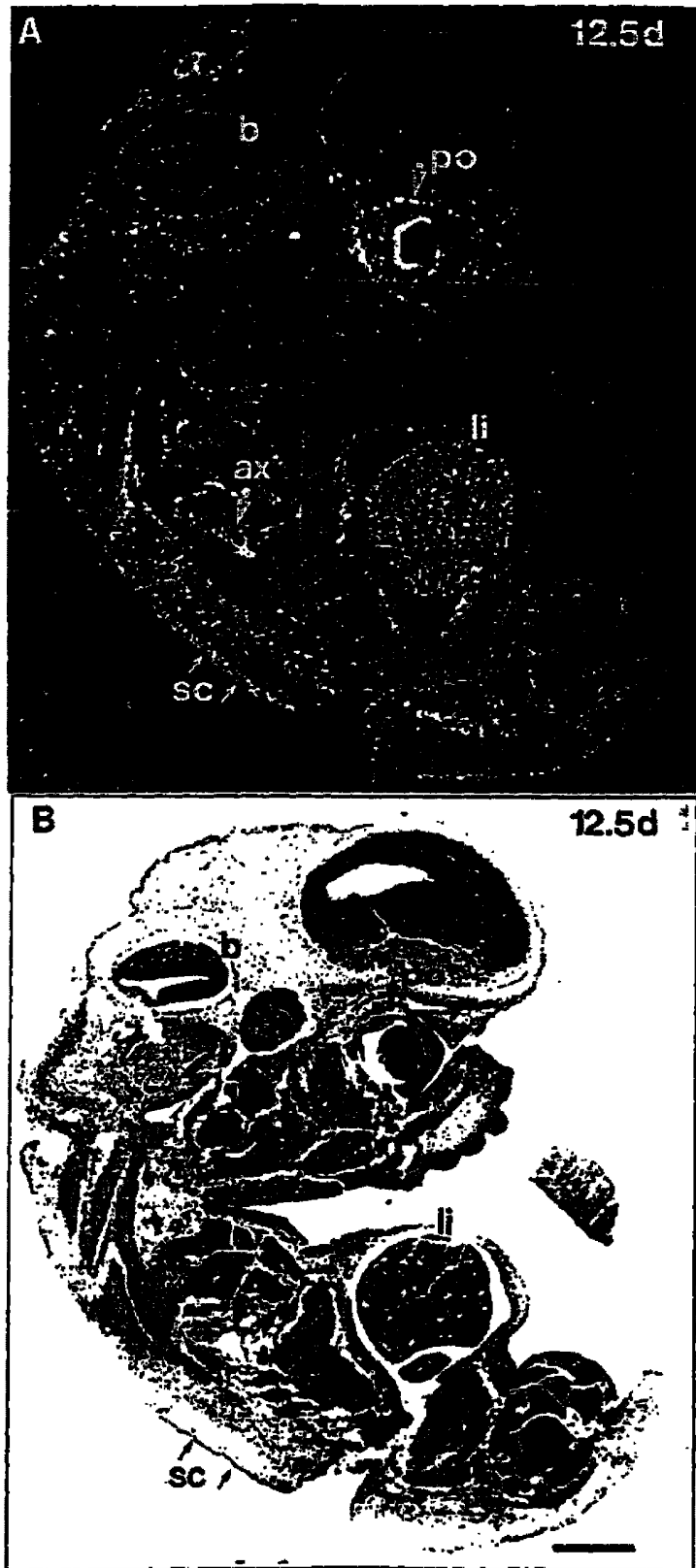


Fig. 3

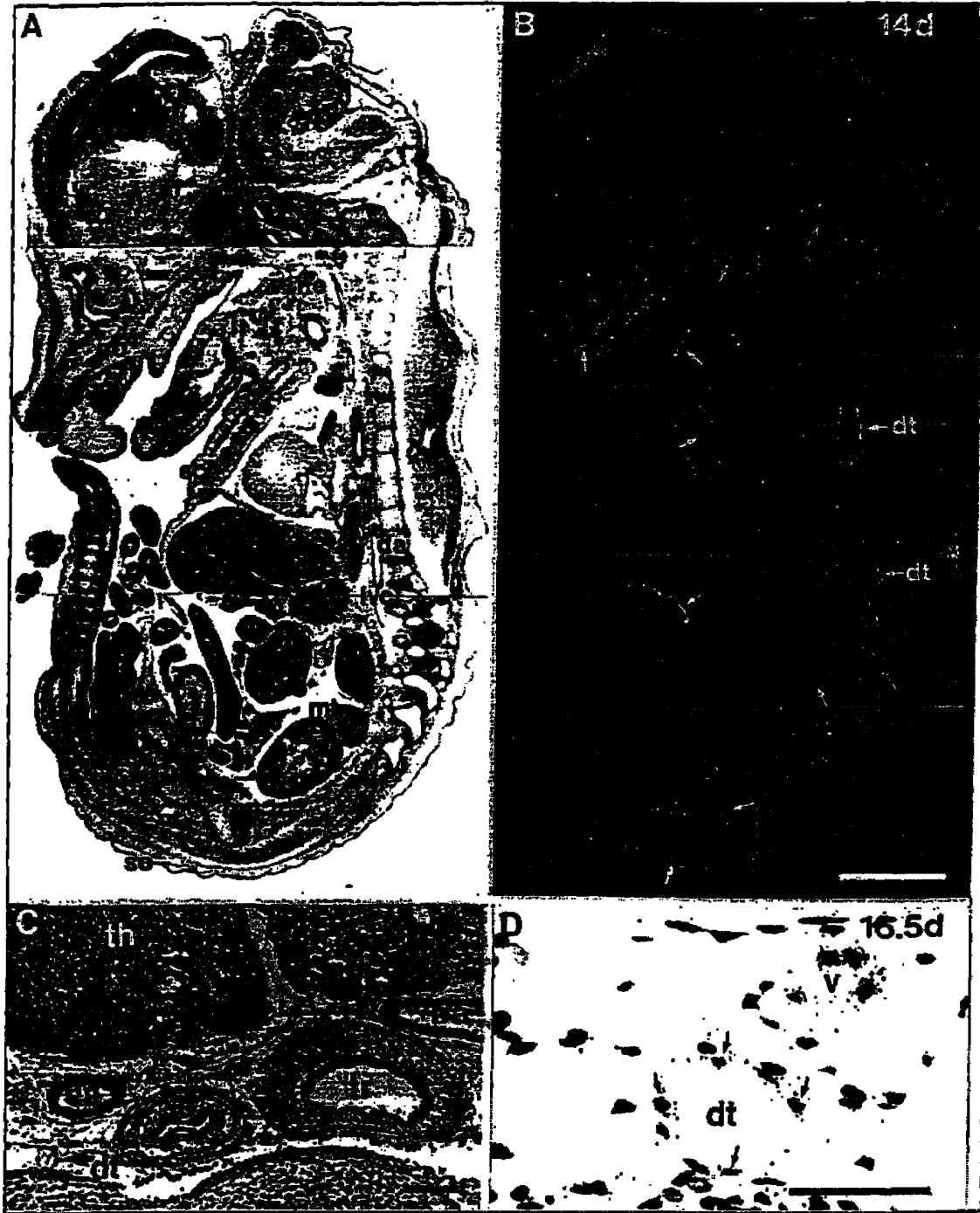
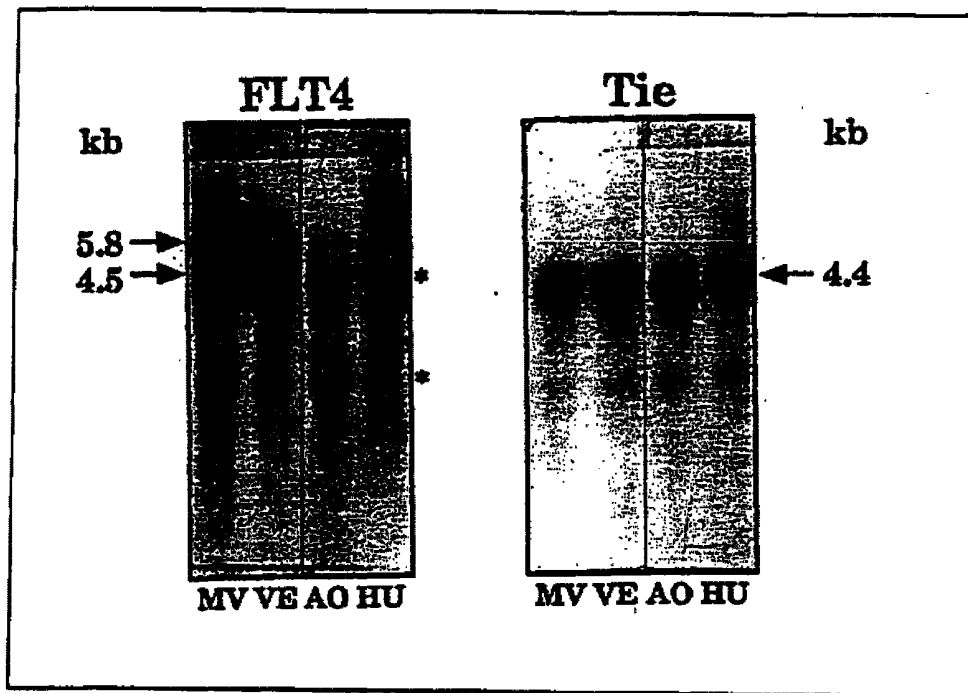
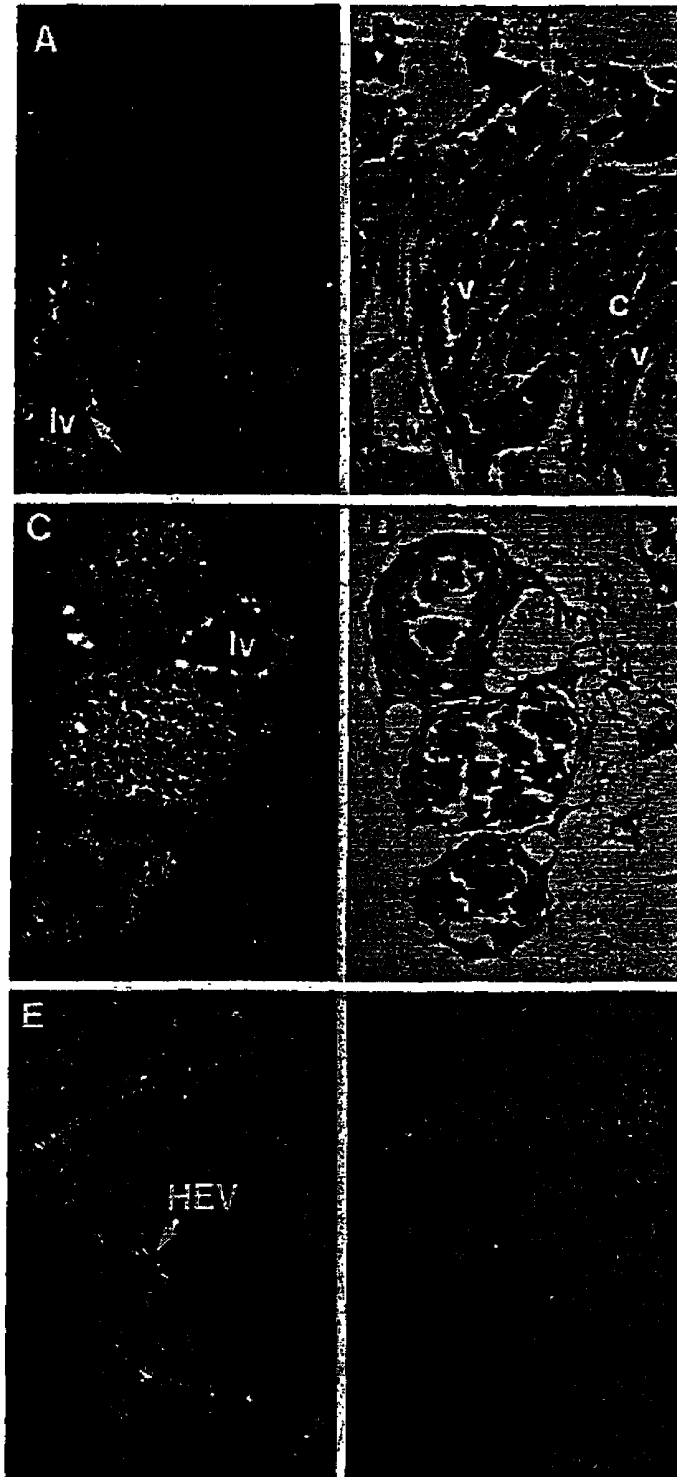


Fig. 4



*Fig. 5*



*Fig. 6*

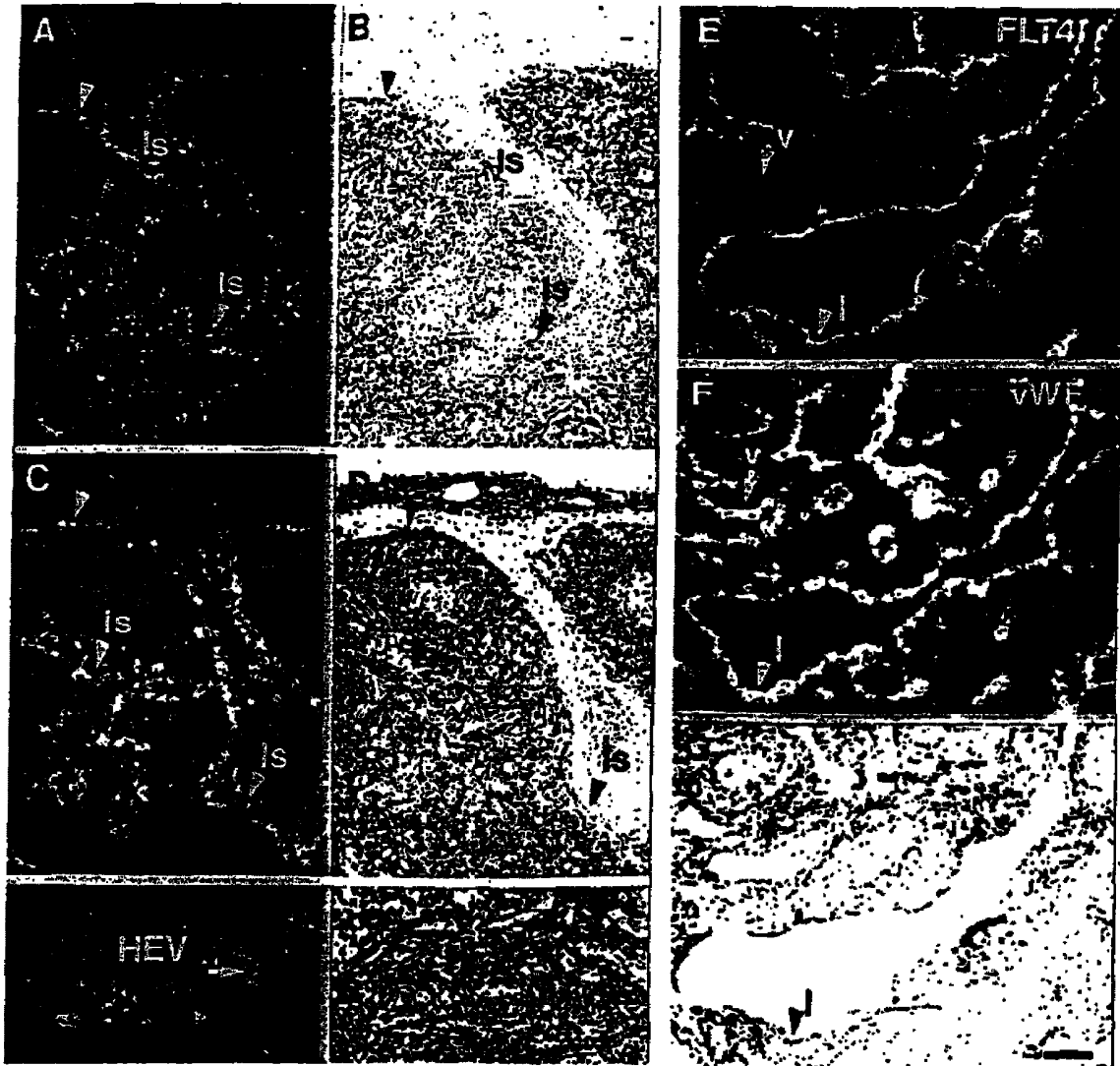


Fig. 7



*Fig. 8*