(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 964845 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 964845

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 16/28
C12N 5/20
G01N 33/577
A61K 39/395

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.06.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.12.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.12.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **02.06.1995 PCT/EP1995/002126**

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

08.06.1994 DE 4419913 02.09.1994 DE 4431297

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Boehringer Ingelheim International GmbH,** Postfach 200, 55216 Ingelheim am Rhein, SAKSA, (DE)
2 • **Forschungszentrum Karlsruhe GmbH,** Postfach 3640 76133 Karlsruhe, Germany, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Adolf, Günther R.,** Österreich, ITÄVALTA, (AT)
2 • **Patzelt, Erik,** Österreich, ITÄVALTA, (AT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
CD44v6:n vastaiset monoklonaaliset vasta-aineet
Monoklonala antikroppar mot CD44v6

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

ACC 2174 DSM

CD44v6:n vastaiset monoklonaaliset vasta-aineet - Monoklonala antikroppar mot CD44v6

Keksintö koskee monoklonaalista vasta-ainetta epitooppia vastaan, jota koodaa CD44-geenin variantti-eksoni v6, siitä johdettuja vasta-ainemolekyylejä, samoin kuin vasta-aineen tai vasta-ainemolekyylien käyttöjä diagnostiikassa ja terapiassa.

Hiljattain osoitettiin, että pintaglykoproteiinin CD44 varianttien ekspressio on välttämätöntä ja riittävää nk. spontaanin metastaattisen suhtautumisen laukaisemiseksi sekä rotan etäispesäkkeitä muodostamattomalla haima-adenokarsinooma-solulinjalla että rotan etäispesäkkeitä muodostamattomalla fibrosarkooma-solulinjalla (Günthert et al., 1991). Samalla kun pienin CD44-isoformi, standardimuotoa CD44s (eli CD44std), ekspressoituu yleisesti joukossa erilaisia kudoksia, näiden joukossa epiteelisoluissa, ekspressoituu CD44:n määrättyjä lohkeamisvariantteja (CD44v, CD44var) vain yhdessä epiteelisolujen alaryhmässä. CD44-variantit muodostuvat vaihtoehtoisella lohkeamisella niin, että 10 eksonin sekvenssit (v1 - v10) katkaistaan CD44s:ssä täydellisesti pois, mutta niitä voi kuitenkin esiintyä suuremmissa varianteissa eri yhdistelminä (Screaton et al., 1992; Tölg et al., 1993; Hofmann et al., 1991). Variantit eroavat toisistaan siten, että proteiinin solunulkoisen osan määrättyyn paikkaan on insertoitu toisistaan eroavia aminohapposekvenssejä. Sellaisia variantteja voitiin osoittaa ihmisen eri kasvainsoluissa ja ihmisen kasvainkudoksessa. Siten hiljattain tutkittiin CD44-variantin ekspressiota kolorektaalisen karsinogeneesin kuluessa (Heider et al., 1993a). CD44-variantin ekspressio puuttuu normaalissa ihmisen paksusuoliepiteelissä, ja kuopakkeiden proliferoituvissa soluissa on osoitettavissa vain heikkoa ekspressiota. Kasvaimen etenemisen myöhemmissä vaiheissa, esimerkiksi adenokarsinoomissa, ekspressoivat kaikki pahanlaatuiset huonontuneet solut CD44:n variantteja. Korkealla tasolla tapahtuvaa variantti-CD44:n kudosekspressiota voitiin osoittaa

myös aggressiivisissa ei-Hodgkin-imukudoskasvaimissa (Koopman et al., 1993).

Erityinen merkitys erityisesti etäispesäkkeiden leviämisessä vaikuttaa olevan eksoni v6:lla (Rudy et al., 1993). Eläinmalleissa voitiin v6-spesifisten epitooppien vastaisilla vasta-aineilla estää etäispesäkkeitä muodostavien solujen sijoilleen asettuminen ja etäispesäkkeiden kasvu (Seiter et al., 1993). Paksusuolikarsinoomissa v6-ekspressio korreloi kasvaimen etenemisen kanssa (Wielenga et al., 1993). Mahakasvaimissa v6-ekspressio on tärkeä diagnostinen merkki suoliston ja laajalle levinnyttä tyyppiä olevien kasvainten välisessä erittelyssä (Heider et al., 1993b). v6-ekspressio mitattiin kummassakin viimeksi mainituista töistä v6-spesifisten epitooppien vastaisten vasta-aineiden avulla.

Monoklonaaliset vasta-aineet epitooppeja vastaan, joita koodaa eksoni v6, ovat tekniikan tasosta tunnettuja (Hofmann et al., 1991; Wielenga et al., 1993). Johtuen suuresta mahdollisesta hyödystä, joka sellaisilla vasta-aineilla voi olla diagnoosissa ja terapiassa, on suurta tarvetta vasta-aineita kohtaan, joilla on parannetut ominaisuudet.

Tämän keksinnön tehtävänä oli aikaansaada vasta-aine, jolla on tunnettuihin v6-spesifisiin vasta-aineisiin merkittävästi parantuneet ominaisuudet.

Tämä tehtävä voitiin ratkaista tämän keksinnön avulla. Se koskee vasta-ainetta, jolla on nimi VFF-18. Lisäksi keksintö koskee hybridoomasolulinjaa, joka erittää tätä vasta-ainetta, ja joka talletettiin tulonumerolla DSM ACC2174 kansainväliseen talletuslaitokseen DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Saksa.

Seuraavassa ymmärretään käsitteillä vasta-aineet tai vasta-ainemolekyylit ei ainostaan täydellisiä immunglobuliineja, vaan myös sitoutumisspesifisyyden ja -affiniteetin suhteen ekvivalentteja aineita, kuten kuvattuja vasta-aine-johdannaisia ja yhdistelmä-DNA-vasta-ainemolekyylejä.

Keksinnön mukainen vasta-aine VFF-18 valmistettiin esimerkin 1 mukaisella menetelmällä. Lisäksi vasta-aine voidaan saada talletetusta hybridoomasolulinjasta. Ammattimies osaa valmistaa keksinnön mukaisen vasta-aineen johdannaisia tai, tämän vasta-aineen sekvenssianalyysistä lähtien ja/tai käyttämällä hybridoomasolulinjaa, joka tuottaa tätä vasta-ainetta, valmistaa yhdistelmä-DNA-vasta-ainemolekyylejä, joilla on sama idiotyyppi, ts. vasta-ainemolekyylejä, joilla on antigeeninsitoutumispaikoissa (complementarity-determining regions, CDR) sama aminohapposekvenssi kuin vasta-aineella VFF-18. Sellaiset johdannaiset ja yhdistelmä-DNA-vasta-ainemolekyylit kuuluvat tämän vuoksi nimenomaisesti keksintöön.

VFF-18-vasta-aineen täydellisestä immunoglobuliinista voidaan valmistaa esimerkiksi Fab- tai F(ab')-fragmentteja tai muita fragmentteja (Kreitman et al., 1993). Diagnostisiin menetelmiin voidaan VFF-18-vasta-ainemolekyylejä, niiden fragmentteja tai yhdistelmä-DNA-vasta-ainemolekyylejä, joissa on sama idiotyyppi, kytkeä esimerkiksi radioaktiivisten isotooppien kuten ^{131}I, ^{111}In, ^{99m}Tc tai radioaktiivisten yhdisteiden (Larson et al., 1991; Thomas et al., 1989; Srivastava, 1988), entsyymien kuten peroksidaasin tai alkalisen fosfataasin (Catty et Raykundalia, 1989), fluoresenssiväriaineiden (Johnson, 1989) tai biotiinimolekyylien (Guesdon et al., 1979) kanssa. Terapeuttisiin käyttöihin voidaan VFF-18:aa tai VFF-18:sta johdettuja vasta-ainemolekyylejä kytkeä toksiinien (Vitetta et al., 1991; Vitetta et Thorpe, 1991; Kreitman et al., 1993; Theuer et al., 1993), sytostaattisten aineiden (Schrappe et al., 1992), esilääkkeiden (Wang et al., 1992; Senter et al., 1989) tai radioaktiivisten aineiden kanssa. Lisäksi vasta-aine voidaan kytkeä sytokiinin

tai muun immuniteettia moduloivan polypeptidin, esimerkiksi tumor necrosis factor'in tai interleukiini-2:n kanssa.

Lisäksi ammattimies pystyy VFF-18-vasta-aineen aminohapposekvenssin analyysin jälkeen ja/tai käyttämällä hybridoomasolulinjaa, joka tuottaa tätä vasta-ainetta, erityisesti siinä sisältyvää geneettistä informaatiota, valmistamaan rekombinanttivasta-ainemolekyyleja, joilla on sama idiotyyppi kuin VFF-18. Vastaavat menetelmät ovat tekniikan tasoa. Sellaiset yhdistelmä-DNA-vasta-ainemolekyylit voivat olla esimerkiksi humanisoituja vasta-aineita (Shin et al., 1989; Güssow et Seemann, 1991), bispesifisiä vasta-aineita (Weiner et al., 1993; Goodwin, 1989), yksiketjuista vasta-ainetta (scFv, Johnson et Bird, 1991), täydellisiä tai fragmentti-immunoglobuliineja (Coloma et al. 1992, Nesbit et al.; Barbas et al., 1992), tai "chain shuffling"-menetelmällä valmistettuja vasta-aineita (Winter et al., 1994). Humanisoituja vasta-aineita voidaan valmistaa esimerkiksi CDR-oksastuksella (EP 0239400). Voidaan myös modifioida kehysalueita (EP 0519596). Humanisointiin voidaan käyttää nykyisin menetelmiä kuten PCR (katso esimerkiksi julkaisuja EP 0368684; EP 0438310; WO 9207075) tai tietokonemallitusta (katso esimerkiksi WO 9222653). Voidaan valmistaa myös fuusioproteiineja, esimerkiksi yksiketjuvasta-aine/toksiini-fuusioproteiineja (Chaudhary et al., 1990; Friedman et al., 1993). Tämän vuoksi myös sellaiset vasta-ainemolekyylit kuuluvat keksintöön.

Samoin ammattimies osaa ottaa selville VFF-18:n täsmällisen epitoopin ja valmistaa tämän tuntemuksen avulla samanarvoisia vasta-aineita, joilla on sama sitoutumisspesifisyys. Tämä voi tapahtua esimerkiksi peptidisitoutumistutkimuksilla, kuten esimerkissä 2, mahdollisesti peptidin Hu1 varioinnilla. Tämän vuoksi sellaiset vasta-aineet kuuluvat samoin keksintöön.

Keksinnön edelleen eräs näkökanta on VFF-18:n tai VFF-18:sta johdettujen tai samanarvoisten vasta-ainemolekyylien käyttö diagnostiikassa ja terapiassa.

Diagnostiset menetelmät voivat olla sinänsä tunnettuja menetelmiä, joissa käytetään keksinnön mukaisia vasta-ainemolekyylejä, esimerkiksi entsyymikytkettyjä immunomäärityksiä (ELISA, Catty ja Raykundalia, 1989), radioimmunomäärityksiä (Catty ja Murphy, 1989), immunohistokemiallisia menetelmiä (Heider et al., 1993b) tai "Western Blot"-määrityksiä. Sellaisia menetelmiä voidaan tarkoituksenmukaisesti suorittaa kehosta otetuilla kudosnäytteillä tai kehonesteillä, esimerkiksi elävästä kudoksesta otetuilla näytteillä. Tutkimukset voivat tapahtua kvalitatiivisesti, semikvantitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. Vasta-ainetta tai vasta-ainemolekyylejä voidaan tällöin käyttää tavalla, kuten esimerkiksi tekniikan tasolla on kuvattu muille v6-spesifisille vasta-aineille (WO 9500851), jolloin keksinnön mukaisen vasta-aineen tai keksinnön mukaisten vasta-ainemolekyylien edulliset ominaisuudet voivat merkitä sellaisten menetelmien merkittävää parannusta.

In vitro-diagnostiikan ohella keksinnön mukaiset vasta-ainemolekyylit soveltuvat myös in vivo-diagnostiikkaan, erityisesti kasvainten diagnostiikkaan. Jos vasta-ainemolekyllissä on osoitettavissa oleva leima, voi tapahtua leiman osoitus diagnostisiin tarkoituksiin, esimerkiksi kasvaimen visualisointi in vivo (Imaging), tai esimerkiksi radiotuettuun kirurgiaan (radioguided surgery). Esimerkiksi radioaktiivisten isotooppien kanssa kytkettyjen vasta-aineiden käyttämiseksi immunotuikekuvauksessa (Imaging) on olemassa joukko työohjeita, joiden pohjalta ammattimies voi suorittaa keksinnön (Siccardi et al., 1989; Keenan et al., 1987; Perkins et Pimm, 1992; Colcher et al., 1987; Thompson et al., 1984).

Terapeuttinen käyttö voi tapahtua esimerkiksi analogisesti vasta-aineen 1.1ASML (Seiter et al., 1993) käytölle. Tällöin

anto voi tapahtua systeemisesti tai paikallisesti, esimerkiksi laskimonsisäisellä (boluksena tai kestoinfuusiolla), vatsaontelonsisäisesti, lihaksensisäisesti, ihonalaisesti o.a. injektiolla/infuusiolla. Voidaan myös perfusoida yksittäisten elinten tai jäsenten kautta. Protokollat konjugoitujen tai konjugoimattomien vasta-aineiden antoon (olivatpa nämä sitten täydellisiä immunoglobuliineja, fragmentteja, kimeerisiä yhdistelmä-DNA-molekyylejä tai vastaavia) ovat tekniikan tason mukaisia (Mulshine et al., 1991; Larson et al., 1991; Vitetta et Thorpe , 1991; Vitetta et al., 1991; Breitz et al., 1992; Press et al., 1989; Weiner et al., 1989; Chatal et al., 1989; Sears et al., 1982).

VFF-18:n ylivoimaiset ominaisuudet muihin anti-CD44v6-vasta-aineisiin verrattuna osoitetaan esimerkeissä 2 - 4.

Piirrokset

Kuvio 1: GST-CD44(v3-v10)-fuusioproteiinin kaaviomainen kuvaus. GST = glutationi-S-transferaasi Schistosoma japonicum'ista. v3-v10 = keratinosyytti-CD44:n variantti-insertio. Trombiini-katkaisukohta on merkitty nuolella.

Kuvio 2: Ihmisen ja rotan CD44-geenin v6-eksonin sekvenssivertailu. Sekvenssit peptideille Ra1 ja Hu1, joihin vasta-aineet 1.1ASML (anti-rotta-CD44v6) ja VFF-18 (anti-humaani-CD44v6) sitoutuvat, esitetään lihavalla. Identtiset aminohapot tunnistetaan tähdellä.

Kuvio 3: CD44v6-spesifisten vasta-aineiden sitouituminen synteettisiin peptideihin. Vasta-aineiden sitoutuminen peptideihin määritettiin ELISA-määrityksellä, jossa peptidit immobilisoitiin, ja inkuboitiin sitten vasta-aineliuosten kanssa. Liittynyt vasta-aine osoitettiin vastaavien pesuvaiheiden jälkeen peroksidaasikonjugoidulla anti-hiiri-IgG-vasta-aineella. (A): Ensimmäisessä kokeessa osoitettiin rotta-CD44v6-spesifisen

vasta-aineen 1.1ASML sitoutuminen peptidiin Ra1 (KWFEN EWQGK NPPT). (B): Eräässä muussa kokeessa syntetisoitiin Ra1:lle homologinen peptidi humaani-CD44v6-sekvenssistä. Erilaiset anti-humaani-CD44v6-hybridoomaulokkeet sitoutuivat tähän peptidiin Hu1 (QWFGN RWHEG YRQT). Tällöin ilmenee, että VFF-18 sitoutuu peptidiin oleellisesti paremmin kuin muut käytetyt vasta-aineet. (C): Tämä koe toistettiin kvantitatiivista arviointia varten puhdistettujen vasta-aineiden eri konsentraatioilla. Myös tässä ilmenee, että VFF-18:lla on suurempi sitoutumisaffiniteetti kuin muilla vasta-aineilla.

Kuvio 4: Radioaktiivisesti merkittyjen vasta-aineiden sitoutuminen kasvainsoluihin. Kolme vasta-ainetta VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) ja VFF-18 (anti-v6) merkittiin radioaktiivisesti N-sukkiinimyyli[2,3- ^{3}H]propionaatilla, ja käytettiin sitoutumistesteihin eri kasvainsolulinjoilla. Tällöin käytettiin seuraavia solulinjoja: CHO-CD44var: yhdistelmä-DNA-hamsterisolulinja (Chinese Hamster Ovary), joka ekspressoi pinnalla humaani-variantti-CD44:ää (eksonit v3-v10); HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205: ihmisen paksusyöpäkarsinoomalinjoja; A431: ihmisen levyepiteelikarsinoomalinja. Osoitetaan vasta-aineiden spesifinen sitoutuminen eri solulinjoihin. Samalla kun v6-spesifisten vasta-aineiden VFF-7 ja VFF-18 yhdistelmä-DNA-solulinjaan CHO-CD44var sitoutuminen on samaa suuruusluokkaa, nähdään vasta-aineilla kasvainsolulinjoilla hyvin erilainen sitoutumiskäyttäytyminen. Joissakin tapauksissa havaitaan vain VFF-18- ja vähäisessä laajuudessa VFF-8-sitoumista (HT-29, CaCo, COLO 205), toisilla solulinjoilla VFF-18 sitoutuu oleellisesti paremmin kuin VFF-7.

Kuvio 5: Liukoisten CD44-varianttien osoitus, jotka sisältävät eksoni v6:n, ihmisen normaaliseerumissa. Kerrostus-ELISA-kokeessa käytettiin kolmea v6-spesifistä vasta-ainetta VFF-4, VFF-7 tai VFF-18 päällystysvasta-aineina. Kaikissa kolmessa tapauksessa käytettiin osoitusvasta-aineena peroksidaasikonjugoitua CD44std-spesifistä vasta-ainetta (BU-52, std = standar-

di). Näissä testeissä ((A) ja (B)) osoitetaan signaali kahdesta eri humaani-normaaliseerumista eri laimennoksilla. Molemmissa tapauksissa voidaan VFF-18:lla havaita oleellisesti voimakkaampi signaali kuin molemmilla muilla vasta-aineilla.

Kuvio 6: v6:ta sisältävien CD44-varianttien seerumiarvot. Kahdella eri ELISA-testillä määritettiin liukoisen CD44var:n pitoisuus kuuden terveen luovuttajan seerumeista. Yhdessä testissä käytetään päällystysvasta-aineena VFF-7:ää, toisessa VFF-18:aa; molemmat vasta-aineet tunnistavat eksonin v6. Vertailupreparaattina toimi molemmissa tapauksissa CHO-soluissa valmistettu liukoinen yhdistelmä-DNA-CD44-variantti (eksoni v3-v10). VFF-18-ELISA osoittaa keskimäärin 3,5 kertaa korkeammat arvot kuin VFF-7-ELISA. Tämä merkitsee, että VFF-18 tunnistaa seerumissa esiintyvän liukoisen CD44var:n paremmin kuin VFF-7.

Esimerkit

Esimerkki 1: Monoklonaalisen vasta-aineen VFF-18 valmistus

pGEX-fuusioproteiinien kloonaus

CD44v:n HPKII-tyypin koko vaihteleva alue (Hofmann et al., 1991) nomistettiin ihmisen keratinosyytti-cDNA:sta polymeraasiketjureaktiolla (PCR). LCLC97-variantti-alueen molemmat PCR-alukkeet 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3', asemat 25 - 52, ja 5'- TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3', asemat 1013 - 984, jotka on kuvannut Hofmann et al., sisälsivät EcoRI-tunnistuskohdan, jota hyödynnettiin PCR-tuotteen kloonaamiseksi suoraan vektoriin pGEX-2T (Smith et al., 1988). Tulokseksi saatu konstrukti (pGEX CD44v HPKII, v3 - v10) koodaa fuusioproteiinia, jonka koko on 70 kD, ja joka koostuu glutationi-S-transferaasista Schistosoma japonicum'ista ja humaani-CD44:n eksoneista v3 - v10 (Fig. 1; Heider et al., 1993a). Fuusioproteiini ekspressoitiin E. coli'ssa, ja affiniteettipuhdistettiin seuraavaksi glutationi-agaroosilla (Smith et al., 1988).

Immunisointi ja seulonta

Naaraspuolisia Balb/c-hiiriä immunisoitiin vatsaontelonsisäisesti affiniteettipuhdistetulla fuusioproteiinilla seuraavan kaavion mukaisesti:

1. immunisointi:	90 µg fuusioproteiinia täydellisessä Freund'in adjuvatissa
2. ja 3. immunisointi:	50 µg fuusioproteiinia epätäydellisessä Freund'in adjuvantissa.

Immunisoinnit tapahtuivat kulloinkin 4 viikon välein. 14 päivää viimeisen immunisoinnin jälkeen eläimet immunisoitiin vielä kolmena peräkkäisenä päivänä kulloinkin 10 µg:lla fuusioproteiinia PBS:ssä. Tätä seuraavana päivänä pernasolut yhdestä eläimestä, jolla oli korkea vasta-ainetiitteri, fuusioitiin P3.X63-Ag8.653-hiirimyeloomasolujen kanssa polyetyleeniglykoli 4000:n avulla. Sitten hybridoomasolut valikoitiin mikrotiitterilevyillä HAT-väliaineessa (Köhler ja Milstein, 1975; Kearney et al., 1979).

Vasta-ainetiitterin määritys seerumissa tai eloon jääneiden hybridoomien seulonta suoritettiin ELISA-määritysten avulla. Tässä testissä päällystettiin ensin mikrotiitterilevyjä fuusioproteiinilla (GST-CD44v3-10) taivain glutationi-S-transferaasilla. Seuraavaksi inkuboitiin seeruminäytteiden tai eloon jääneiden hybridoomien sarjalaimennosten kanssa, ja osoitettiin spesifiset vasta-aineet hiiri-immunoglobuliinin vastaisilla, peroksidaasikonjugoiduilla vasta-aineella. Hybridoomat, jotka reagoivat vain glutationi-S-transferaasin kanssa, heitettiin pois. Jäljelle jääneet vasta-aineet karakterisoitiin ensin ELISA-määrityksessä domeenispesifisillä fuusioproteiineilla (eksoni v3, eksoni v5 + v6, eksoni v6 + v7, eksoni v8 - v10) (Koopman et al., 1993). Niiden immunohistokemiallinen reaktiivisuus testattiin ihmisen iholeikkeillä. Vasta-aine VFF-18 tunnistettiin silloin sitoutumisella synteettiseen Hu1-pepti-

diin (QWFGN RWHEG YRQT). Hu1:n sekvenssi on ihmis-CD44-eksonin v6 fragmentti.

Esimerkki 2: CD44v6-spesifisten vasta-aineiden sitoutuminen synteettisiin peptideihin

CD44v6-spesifisten vasta-aineiden sitoutuminen synteettisiin peptideihin määritettiin ELISA-määrityksessä.

Liuokset:

Päällystyspuskuri:	0,05 M natriumkarbonaatti, pH 9,6
Määrityspuskuri:	PBS (fosfaattipuskuroitu suolaliuos) 0,5-% BSA (naudanseerumialbumiini) 0,05 % Tween 20
Substraattiliuos	Yhtiö Kierkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg MD, USA; TMB-peroksidaasisubstraatti: peroksidaasiliuos B (H_2O_2) 1:1

Peptidit (50 µg/ml päällystyspuskurissa) immobilisoitiin NUNC Maxisorp-immunolevyille (1.1ASML) tai Acti-A-levyille yhtiöstä Bio Products (VFF-vasta-aine) 4°C:ssa yön yli. Acti-A-levyillä peptidi liittyy kovalenttisesti levyyn. Seuraavaksi pestiin PBS/0,05-% Tween:illä, levyn pinnalla olevat vapaat adsorptiokohdat salvattiin määrityspuskurilla (1 tunti huoneenlämpötilassa), ja pestiin jälleen kerran PBS/0,05-% Tween 20:llä. Acti-A-levyt pelkistettiin salpauksen jälkeen 10 mM natriumborohydridillä 20 mM natriumvetykarbonaatissa, pH 9,0 (ravisteltiin 1 tunti huoneenlämpötilassa), ja pestiin seuraavaksi kolmesti PBS/0,05-% Tween 20:llä. Sitten eloon jääneitä hybridoomia tai vasta-aineliuoksia määrityspuskurissa konsentraatioissa välillä 0,02 ja 10,0 µg/ml lisättiin kuppeihin, ja inkuboitiin 2 tuntia huoneenlämpötilassa levynravistelijassa. Tämän jälkeen seurasi kolme pesuvaihetta PBS/0,05-% Tween 20:llä. Sitten lisättiin 100 µl/kuppi piparjuuriperoksidaasin kanssa konjugoitua anti-hiiri-IgG-vasta-ainetta sopivana laimennoksena määrityspuskurissa. Kun oli inkuboitu huoneenlämpötilassa 2 tuntia

levynravistelijalla, pestiin kolmesti PBS/0,05-% Tween 20:llä, ja värjättiin substraattiliuoksellat. Kun oli kehitetty 10 - 15 min ajan, reaktio pysäytettiin 2 M rikkihapolla, ja mitattiin absorptio 450 nm:llä (referenssi 690 nm) fotometrillä.

Ensimmäisessä kokeessa osoitettiin rotta-CD44v6-spesifisen vasta-aineen 1.1ASML sitoutuminen Ra1-peptidin (KWFEN EWQGK NPPT) (Taulukko 1, kuvio 3 (A)).

Taulukko 1

1.1 ASML µg/ml	Absorptio
10.00	1.652
5.00	1.702
2.50	1.658
1.25	1.595
0.63	1.502
0.31	1.211
0.16	0.971
0.08	0.686
0.04	0.458
0.02	0.270

Edelleen eräässä kokeessa syntetisoitiin Ra1-homologinen peptidi humaani-CD44v6-sekvenssistä (Hu1, QWFGN RWHEG YRQT). Erilaiset anti-humaani-CD44v6-vasta-aineet liittyivät Hu1:een. Tällöin osoittautuu, että VFF-18:lla on yllättävästi suurempi sitoutumisaffiniteetti kuin millään muista käytetyistä vasta-aineista (Taulukko 2, kuvio 3 (B)).

Taulukko 2

Vasta-aine	Absorptio
VFF-2	0.067
VFF-4	1.333
VFF-7	0.199
VFF-18	2.384

Kvantitatiiviseen arviointiin kiinnitettiin Hu1-peptidin lisäksi puhdistettuja anti-humaani-CD44v6-vasta-aineita eri konsentraatioissa. Myös tässä osoittautuu selvästi parempi sitoutumisaffiniteetti muihin vasta-aineisiin verrattuna (Taulukko 3, kuvio 3 (C))

Taulukko 3

µg/ml Vasta-aine	VFF-4	VFF-7	VFF-18
10.000	1.225	0.247	2.320
3.333	1.404	0.226	2.550
1.111	0.853	0.094	2.483
0.370	0.336	0.054	2.426
0.123	0.163	0.028	1.354
0.041	0.086	0.025	0.615
0.014	0.048	0.021	0.266
0.005	0.036	0.031	0.095
0.002	0.021	0.021	0.061

Esimerkki 3: Radioaktiivisesti merkittyjen CD44v6-spesifisten vasta-aineiden sitoutuminen kasvainsolulinjoihin

Vasta-aineiden radioaktiivinen merkintä

1 mCi N-sukkiinimidyyli-[2,3-^{3}H]-propionaattia ([^{3}H]-NSP, Amersham 1 mCi/ml) haihdutettiin silikonisoidussa koeputkessa 0°C:ssa suihkupullotyhjössä melkein kuiviin. Lisättiin 15 g vasta-ainetta (1 mg/ml PBS:ssä, pH 7,4), ja inkuboitiin 48 tuntia 4°C:ssa. Seuraavaksi ylimääräinen [^{3}H]-NSP siepattiin reaktiolla 30 µl:m kanssa 1 M glysiiniä PBS:ssä (20 min huoneen lämpötilassa). Merkityn vasta-aineen erotus [^{3}H]-glysiinistä tapahtui Sephadex-G-25-M-kolonnilla (kolonnin tilavuus 15 ml), jolloin eluenttipuskurina käytettiin PBS/0,5-% BSA:ta. [^{3}H]-merkitty vasta-aine ilmaantuu syrjäytystilavuuksissa. Vasta-ainemäärä määritettiin hiiri-immunoglobuliinin havaitsemiseen tarkoitetulla ELISA:lla, ja laskettiin spesifinen aktiivisuus.

Radioleimattujen vasta-aineiden sitoutuminen kasvainsoluihin

Kolme vasta-ainetta VFF-7 (anti-v6), VFF-8 (anti-v5) ja VFF-18 (anti-v6) leimattiin radioaktiivisesti N-sukkiini-imidyyli-[2,3-3H]propionaatilla ja siirrettiin sitoutumiskokeita varten eri kasvainsolulinjoihin. Tällöin käytettiin seuraavia solulinjoja: CHO-CD44var: yhdistelmä-DNA-hamsterisolulinja (kiinalaisen hamsterin munasarja), ihmismuunnos CD44 (eksonit v3- v10) pinnalle eksprimoitu; HCT-116, CX-1, HT-29, CaCo, COLO 205:

ihmisen suolistokarsinoma-linja; A431: ihmisen levypiteelin karsinoma-linja.

Solut pantiin 12-lokeroisiin kudosviljelylevyihin, inkuboitiin yön yli 37oC CO_2-kaasukaapissa, lopuksi pestiin kerran PBS:llä ja kiinnitettiin etanolilla (1 min. huoneenlämpötilassa). Sitten pestiin kerran viljelyväliaineella (RPMI 1640/10% sikiövasikan seerumilla) ja radioaktiivinen vasta-aine (250 000 dpm/kulho viljelyväliainetta) sidottiin. 25 tunnin inkuboinnin jälkeen huoneenlämpötilassa levyravistelijassa pestiin kolme kertaa PBS/0.5 % BSA, solut solubilisoitiin 0.1 M NaOH/1% Triton X-100 ja radioaktiivisuus motattiin skintillaatiolaskimella. Epämääräinen sidos määrättiin leimaamattoman vasta-aineen 100-kertaisen ylimäärän läsnäollessa. Sidos kohdistettiin yhdenmukaiseen solulukuun (400 000 solua). Vasta-aineen ominaisaktiivisuuden määrityksen jälkeen voitiin sidottujen vasta-aineiden määrä ilmaista fmol:na.

Taulukko 4 ja kuva 4 osoittaa vasta-aineiden ominaissitoutumisen eri solulinjoihin. Kun v6-spesiifisen vasta-aineen VFF-7 ja VFF-18 sitoutuminen rekombinanttisolulinjaan CHO-CD44var on lähes samanlainen, osoittavat vasta-aineet kasvainsolulinjalla huomattavasti erilaisia sitoutumiskäyttäytymisiä. Joissakin tapauksissa huomioidaan ainoastaan VFF-18- ja pienemmässä määrin VFF-8-sitoutumisen (HT-29, CaCo, COLO 205), muihin solulinjoihin VFF-18 sitoutuu huomattavasti paremmin kuin VFF-7.

Taulukko 4

Zellinie	VFF-7 fmol	VFF-8 fmol	VFF-18 fmol
CHO CD44var	33.50	68.42	46.52
HCT-116	1.44	11.08	20.22
CX-1	0.19	2.20	9.48
HT-29	0.00	2.60	26.07
CaCo	0.03	2.81	12.57
COLO 205	0.00	0.32	2.88
A431	8.19	42.32	38.73

Esimerkki 4: ELISA liukoisen CD44v6 määrittämiseen seerumissa

Liuokset:

Kerrostuspuskuri:	0.05 M natriumkarbonaatti pH 9.6
Määritys-puskuri:	PBS (fosfaattipuskuroitu suolaliuos) 0.5 % BSA (nautaseerumialbumiini) 0.05 % Tween 20
Näytelaimennin:	Fa. Bender MedSystems, Wien, Itävalta
Substraattiliuos:	Fa. Kierkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg MD, USA; TMB peroksidaasisubstraatti; peroksidaasi-liuos B H_2O_2) 1:1

Mikrotiiterilevyjä (Nunc-Immunoplate MaxiSorp F96) päällystettiin 5 g/ml CD44v6-spesiifisellä vasta-aineella (inkuboitiin 4°C yön yli). Sitten pestiin PBS/0,05% Tween, vapaat adsorptiokohdat levyjen pinnoilla suljettiin määrityspuskurilla (1 tunti huoneenlämpötilassa), ja pestiin taas kerran PBS/0.05% Tween 20. Seeruminäyte laimenettiin sitten ainakin 1:5 näytelaimentimeen ja sarjalaimennuksella 1:2 lisälaimennettiin levyihin näytelaimentimella. Lopuksi lisättiin 50 l/kulho piparjuuri-(meerrettich)peroksidaasilla konjugoitua anti-CD44std vasta-ainetta (klooni BU-52, The Binding Site, Birmingham) sopivalla laimennuksella (1:3000 - 1:10 000) määrityspuskurissa. Kolmen tunnin inkuboinnin jälkeen huoneenlämpötilassa levyravistelijassa pestiin kolme kertaa PBS/0.05% Tween 20 ja värjättiin substraattiliuoksella. 10-15 min kehityksen jälkeen katkaistiin 2M rikkihapolla, ja absorptio mitattiin 450 nm (referenssi 690 nm) fotometrillä.

Kvantifiointia varten valmistettiin liukoisen CD44-standardivalmisteen sarjalaimennus määrityspuskurissa rinnakkain seeruminäytteen kanssa. Tämä valmiste oli puhdistettu hamsterin rekombinanttisolujen (CHO) pääliliuoksesta, jotka eksprimoivat liukoisia CD44v3-v10. CD44v3-v10 kohdalla on kysymys ihmisen CD44-muunelmasta, joka sisältää eksoneilla v3 - v10 koodattuja peptidisekvenssejä.

Taulukko 5 ja kuva 5 esittävät näyttöä liukoisista CD44-muunnoksista, jotka sisältävät eksonin v6, ihmisen normaaliseerumissa. Kerrostettuun ELISA:aan laitettiin kolme v6-spesiifistä vasta-ainetta VFF-4, VFF-7 tai VFF-18 päällystysvasta-aineina. Kaikissa kolmessa tapauksessa käytettiin indikointivasta-aineena peroksidaasilla konjugoitua CD44std-spesiifistä vasta-ainetta (BU-52, std = standard). Esitetään kahden eri ihmisseerumin signaalit eri laimennuksilla tässä kokeessa. Molemmissa tapauksissa ((A) ja (B)) on VFF-18:llä havaittu huomattavasti voimakkaammat signaalit kuin molemmilla muilla vasta-aineilla.

Taulukko 5 A
Seerumi 1

Laimennus	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	0.406	0.417	3.143
1:10	0.378	0.289	3.055
1:20	0.296	0.179	2.630
1:40	0.207	0.072	1.778
1:80	0.109	0.062	1.084
1:160	0.050	0.030	0.594
1:320	0.026	0.008	0.318
1:640	0.012	0.007	0.159

Taulukko 5 B
Seerumi 2

Laimennus	VFF-4	VFF-7	VFF-18
1:5	1.690	1.280	3.290
1:10	1.756	1.185	3.321
1:20	1.564	0.857	3.163
1:40	1.213	0.468	3.050
1:80	0.699	0.208	2.537
1:160	0.336	0.061	1.666
1:320	0.138	0.014	0.988
1:640	0.054	0.018	0.546

Taulukko 6 ja kuva 6 esittävät v6 sisältävien CD44-muunnosten seerumiarvoja. Kahdella erilaisella ELISA:lla määrättiin liukoisten CD44var-pitoisuus 6 terveen luovuttajan seerumissa. Toisessa kokeessa käytettiin VFF-7, toisessa VFF-18 kerrostamisvasta-aineena; molemmat vasta-aineet tunnistavat eksonin v6. Vertailuvalmisteena käytettiin molemmissa tapauksissa CHO-so-

luissa valmistettu liukoista rekombinantti-CD44-muunnosta (eksoni v3-v10). VFF-18-ELISA osoitti keskimäärin 3,5 kertaa korkeimpia arvoja kuin VFF-7-ELISA. Tämä tarkoittaa sitä, että seerumin sisältämät liukoiset CD44var verrattuna VFF-18:n rekombinantti-proteiiniin ovat paremmin tunnistetavissa kuin VFF-7:n.

Taulukko 6

Luovuttaja	VFF-7 ng/ml	VFF-18 ng/ml	VFF-18/VFF-7
1	18.2	75.9	4.17
2	32.1	85.5	2.66
3	22.4	87.6	3.91
4	27.7	91.6	3.31
5	26.8	98.3	3.67
6	95.4	332	3.48
Keskiarvo			3.53
SD			0.52
CV%			14.9%

Kirjallisuus

Barbas C F, Björling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones T M, Zebedee S L, Persson M A A, Nara P L, Norrby E, Burton D R. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 9339-9343 (1992).

Breitz H B, Weiden P L, Vanderheyden J-L, Appelbaum J W, Bjorn M J, Fer M F, Wolf S B, Ratcliff B A, Seiler C A, Foisie D C, Fisher D R, Schroff R W, Fritzberg A R, Abrams P G. Clinical experience with rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: results of phase I trials. J. Nucl. Med. 33: 1099-1112 (1992).

Catty, D., Raykundalia, C. ELISA and related immunoassays. In: Catty, D (Hrsg). Antibodies Vol. II. IRL Press Oxford (1989), 97-152, s. S. 105-109.

Catty, D., Murphy, G. Immunoassays using radiolabels. In: Catty, D (Hrsg). Antibodies Vol. II. IRL Press Oxford (1989), 77-96.

Chatal J-F, Saccavini J-C, Gestin J-F, Thédrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibé D, Fumoleau P, Guillard Y. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas. Cancer Res. 49: 3087-3094 (1989).

Chaudhary V K, Batra J K, Galdo M G, Willingham M C, Fitzgerald D J, Pastan I. A rapid method of cloning functional variableregion antibody genes in Escherichia coli as singlechain immunotoxins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 1066 (1990).

Colcher D, Esteban J, Carrasquillo J A, Sugarbaker P, Reynolds J C, Bryant G, Larson S M, Schlom J. Complementation of intracavitary and intravenous administration of a monoclonal antibody (B72.3) in patients with carcinoma. Cancer Res. 47: 4218-4224 (1987).

Coloma M J, Hastings A, Wims L A, Morrison S L. Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. J. Immunol. Methods 152: 89-104 (1992).

Friedmann P N, McAndrew S J, Gawlak S L, Chace D, Trail P A, Brown J P, Siegall C B. BR96 sFv-PE40, a potent single-chain immunotoxin that selectively kills carcinoma cells. Cancer Res. 53: 334-339 (1993).

Goodwin D A. A new appoach to the problem of targeting specific monoclonal antibodies to human tumors using anti-hapten chimeric antibodies. J. Nucl. Med. Biol. 16: 645 (1989).

Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 65: 13-24 (1991).

Guesdon, J. I., Ternynck, T., Avrameas, S. J. Histochem. Cytochem. 27: 1131 (1979).

Güssow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991):

Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. J. Cell Biol. 120: 227-233 (1993a).

Heider, K-H., Dämmrich, J., Skroch-Angel, P., Müller-Hermelink, H-K., Vollmers, H-P., Herrlich, P., and Ponta, H. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffusetype human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. Cancer Res. 53: 4197-4203 (1993b).

Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich P., and Günthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. Cancer Res. 51: 5292-5297 (1991).

Johnson, G. D. Immunofluorescence. In: Catty, D (Hrsg). Antibodies Vol. II. IRL Press Oxford (1989), 179-200, s. S. 180-189.

Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in Escherichia coli. Methods Enzymol. 203: 88-98 (1991).

Kearney, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost imunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. 123: 1548 (1979).

Keenan A M, Weinstein J N, Carrasquillo J A, Bunn P A, Reynolds J C, Foon K A et al. Immunolymphoscintigraphy and the dose dependence of ^{111}In-labeled T101 monoclonal antibody in patients with cutaneous T-cell lymphoma. Cancer Res. 47: 6093-6099 (1987).

Köhler, G., Milstein, C. Continous culture of fused cells secreting antibody of predefined specifity. Nature 265: 495 (1975)

Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin´s lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. J. Exp. Med. 177: 897-904 (1993).

Kreitman R J Hansen H J, Jones A L, FitzGerald D J P, Goldenberg D M, Pastan I. Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. Cancer Res. 53: 819-825 (1993).

Larson S M, Cheung N-K V, Leibel S A. Radioisotope Conjugates. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.). Biologic therapy of cancer. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 496-511 (1991).

Mulshine J L, Magnani J L, Linnoila R I: Applications of monoclonal antibodies in the treatment of solid tumors. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.). Biologic therapy

of cancer. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 563-588 (1991).

Nesbit M, Fu Z F, McDonald-Smith J, Steplewski Z, Curtis P J. Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from a baculovirus expression system. J. Immunol. Methods 151: 201-208 (1992).

Perkins A C, Pimm M V. A role for gamma scintigraphy in cancer immunology and immunotherapy. Eur. J. Nucl. Med. 19: 1054-1063 (1992).

Press O W, Eary J F, Badger C C, Martin P J, Appelbaum F R, Levy R, Miller R, Brown S, Nelp W B, Krohn K A, Fisher D, DeSantes K, Porter B, Kidd P, Thomas E D, Bernstein I D. Treatment of refractory Non-Hodgkin's lymphoma with radiolabeled MB-1 (anti-CD37) antibody. J. Clin. Oncol. 7: 1027-1038 (1989).

Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K.-H., Ponta, H., Herrlich, P. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: Each one individually suffices to confer metastatic behaviour. Cancer Res. 53: 1262-1268 (1993).

Schrappe M, Bumol T F, Apelgren L D, Briggs S L, Koppel G A, Markowitz D D, Mueller B M, Reisfeld R A. Long-term growth suppression of human glioma xenografts by chemoimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9.2.27. Cancer Res. 52: 3838-3844 (1992).

Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 12160-12164 (1992).

Sears H F, Mattis J, Herlyn D, Häyry P, Atkinson B, Ernst C, Steplewski Z, Koprowski H. Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. Lancet 1982 (1): 762-765 (1982).

Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H:, Herrlich, P., Matzku, S., Zöller, M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. J. Exp. Med. 177: 443-455 (1993).

Senter P D, Schreiber G J, Hirschberg D L, Ashe S A, Hellström K E, Hellström I. Enhancement of the in vitro and in vivo anti-tumor activities of phosphorylated mitomycin C and etoposide derivatives by monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugates. Cancer Res. 49: 5789-5792 (1989).

Shin S-U, Morrison S L. Production and properties of chimeric antibody molecules. Methods Enzymol. 178: 459-476 (1989).

Siccardi A G, Buraggi G L, Callegaro L, Colella A C, DeFilippi P G et al. Immunoscintigraphy of adenocarcinomas by means of radiolabeled $F(ab')_2$ fragments of an anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody: a multicenter study. Cancer Res. 49: 3095-3103 (1989).

Smith, D.B., Johnson, K.S. Single-step purification of polypetides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene 67: 31-40 (1988).

Srivastava S C (Hrsg). Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy. Life Sciences Series A 152, Plenum New York (1988).

Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. Nucleic Acids. Res. 21: 1225-1229 (1993).

Theuer C P, Kreitman R J, FitzGerald D J, Pastan I. Immunotoxins made with a recombinant form of pseudomonas exotoxin A that do not require proteolysis for activity. Cancer Res. 53: 340-347 (1993).

Thomas G D, Dykes P W, Bradwell A R. Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling. In: Catty D (Hrsg.). Antibodies. IRL Press Oxford, 223-244 (1989), 223-244.

Thompson C H, Stacker S A, Salehi N, Lichtenstein M, Leyden M J, Andrews J T. Immunoscintigraphy for detection of lymph node metastases from breast cancer. Lancet **1984** (2): 1245-1247 (1984).

Vitetta E S, Thorpe P E. Immunotoxins. In: DeVita V T, Hellman S, Rosenberg S A (Hrsg.). Biologic therapy of cancer. J. B. Lippincott Comp., Philadelphia, 482-495 (1991)

Vitetta E S, Stone M, Amlot P, Fay J, May R, Till M, Newman J, Clark P, Collins R, Cunningham D, Ghetie V, Uhr J W, Thorpe P E. Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. Cancer Res. 51: 4052-4058 (1991).

Wang S-M, Chern J-W, Yeh M-Y, Ng J C, Tung E, Roffler S R. Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. Cancer Res. 52: 4484-4491 (1992).

Weiner L M, O'Dwyer J, Kitson J, Comis R L, Frankel A E, Bauer R J, Kopnrad M S, Groves E S. Phase I evaluation of an antibreast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate. Cancer Res. 49: 4062-4067 (1989).

Wielenga, V. J. M., Heider, K.-H., Offerhaus, G. J. A., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S.T. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res. 53: 4754-4756 (1993).

Winter, G., Griffith, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R. Making antibodies by phage display technology. Ann. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994).

Patenttivaatimukset

1. Vasta-aine epitooppia vastaan, joka sisältyy aminohapposekvenssiin, jota koodaa CD-44-geenin variaabeli eksoni v6, t u n n e t t u siitä, että se on vasta-aine VFF-18, joka on muodostettu hybridoma-solulinjasta, jonka talletusnumero on DSM ACC2174.

2. Hybridoma-solulinja, jonka talletusnumero on DSM ACC2174.

3. Vasta-ainemolekyyli, joka saadaan patenttivaatimuksen 1 mukaisen vasta-aineen kemiallisella tai entsymaattisella modifikaatiolla.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että se on patenttivaatimuksen 1 mukaisen vasta-aineen fragmentti.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että se on Fab- tai F(ab')2-fragmentti.

6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että vasta-aine on liittynyt toiseen molekyyliin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että toinen molekyyli on polypeptidi.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 3 - 5 mukainen vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että se on liittynyt radioaktiiviseen isotooppiin.

9. Rekombinantti-vasta-ainemolekyyli, jolla on patenttivaatimuksen 1 mukaisen vasta-aineen idiotyyppi.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen rekombinantti-vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että se on mielikuvituksellinen, humanisoitu, yksiketjuinen (single chain) tai ketjuntumisella (chain shuffling) saatu vasta-ainemolekyyli.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen rekombinantti-vasta-ainemolekyyli, t u n n e t t u siitä, että se on liittynyt toiseen molekyyliin tai radioaktiiviseen isotooppiin.

12. Vasta-ainemolekyyli, joka tunnistaa saman epitoopin kuin patenttivaatimuksen 1 mukainen vasta-aine.

13. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 3 - 12 mukaisen vasta-aineen tai vasta-ainemolekyylin käyttö diagnostiseen menetelmään ihmis- tai eläinkehon ulkopuolella.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että menetelmä on entsyymi-kytketty immunokoe tai radioimmunokoe.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että menetelmä on immunhistokemiallinen menetelmä.

16. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 3 - 12 mukainen vasta-aine tai vasta-ainemolekyyli farmaseuttiseen käyttöön.

17. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 3 - 12 mukaisen vasta-aineen tai vasta-ainemolekyylin käyttö in vivo diagnostiikassa käytetyn aineen valmistamiseksi.

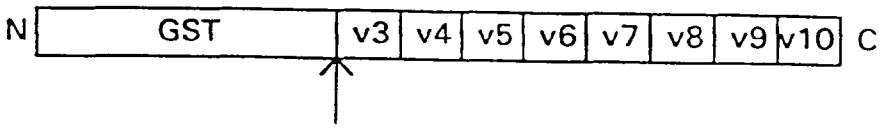
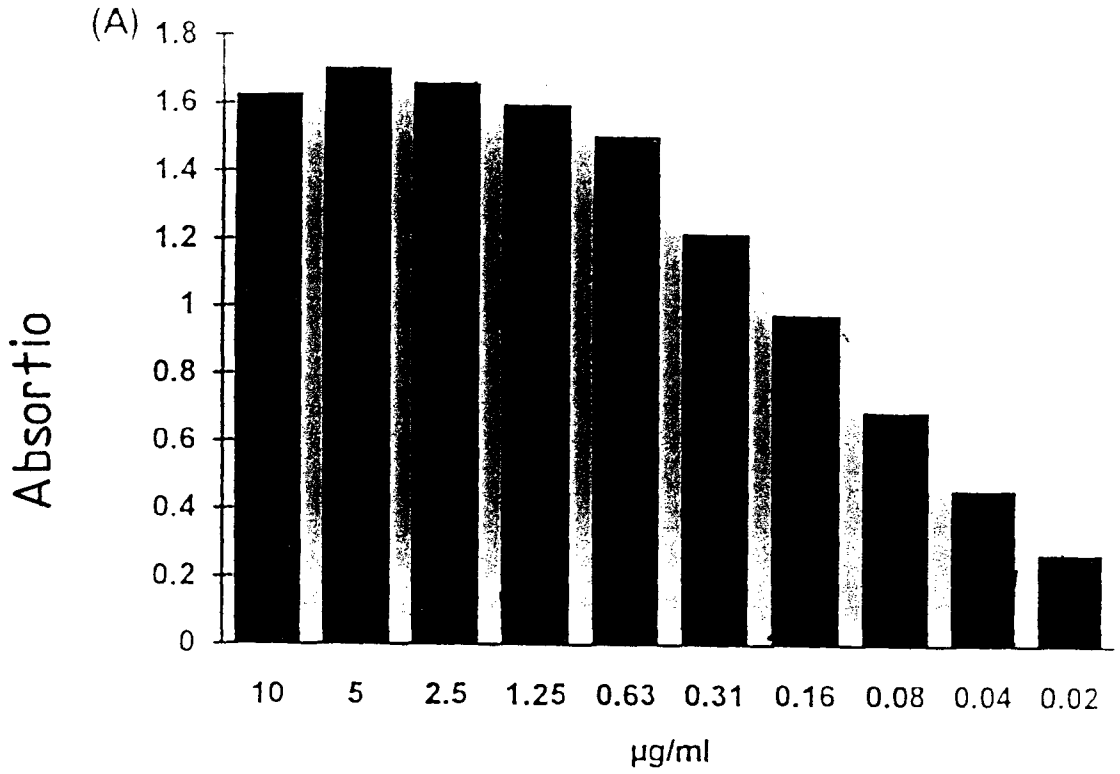


Fig. 1

```
                 * * ***** ***** ** * *        ** **** * **
Ratte:    WADPNSTTEEAATQKEKWFENEWQGKNPPTPSEDSHVTEGT T
Human:    QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSHSTTGTAA
```

Peptid Ral tai Hul

Fig. 2


(A)
Absortio
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
5
2.5
1.25
0.63
0.31
0.16
0.08
0.04
0.02
µg/ml

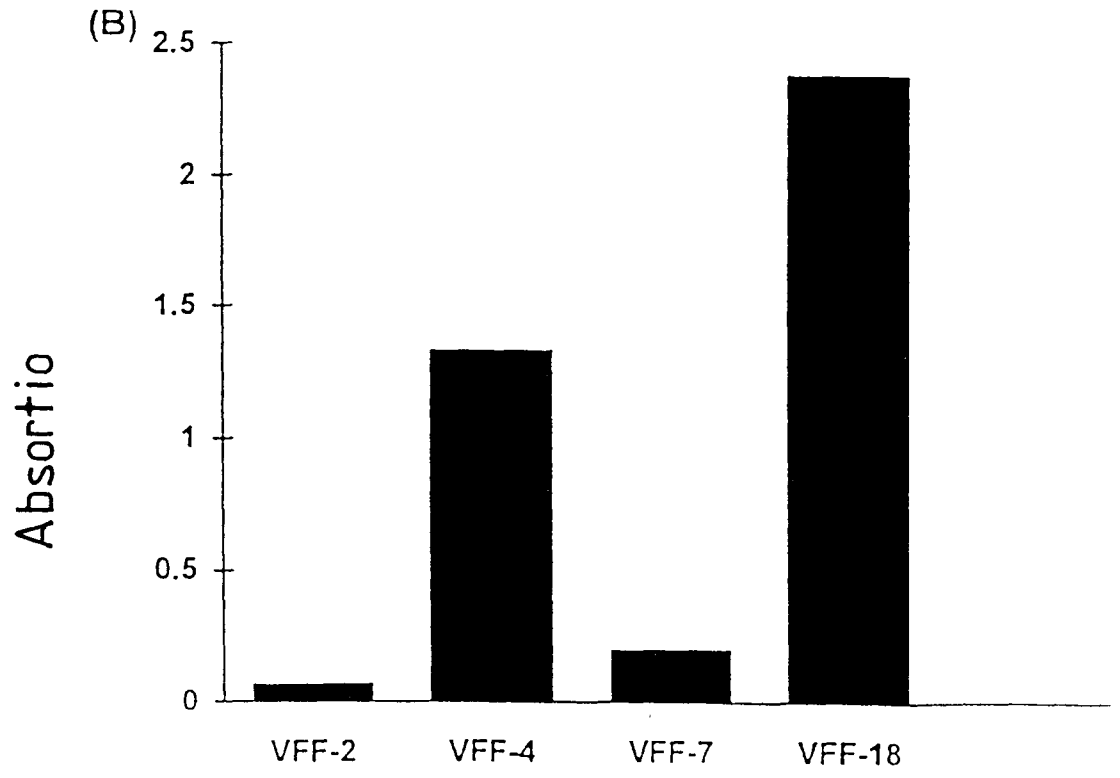

(B)
Absortio
2.5
2
1.5
1
0.5
0
VFF-2
VFF-4
VFF-7
VFF-18

Fig.3

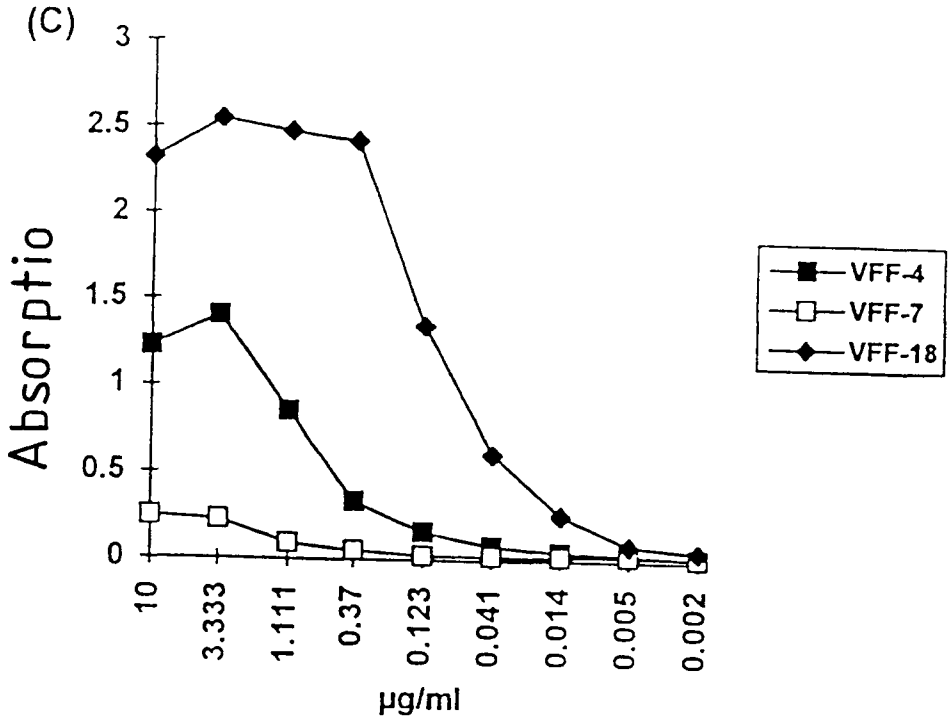

(C)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Absorptio
10
3.333
1.111
0.37
0.123
0.041
0.014
0.005
0.002
µg/ml
VFF-4
VFF-7
VFF-18

Fig. 3 jatkuu

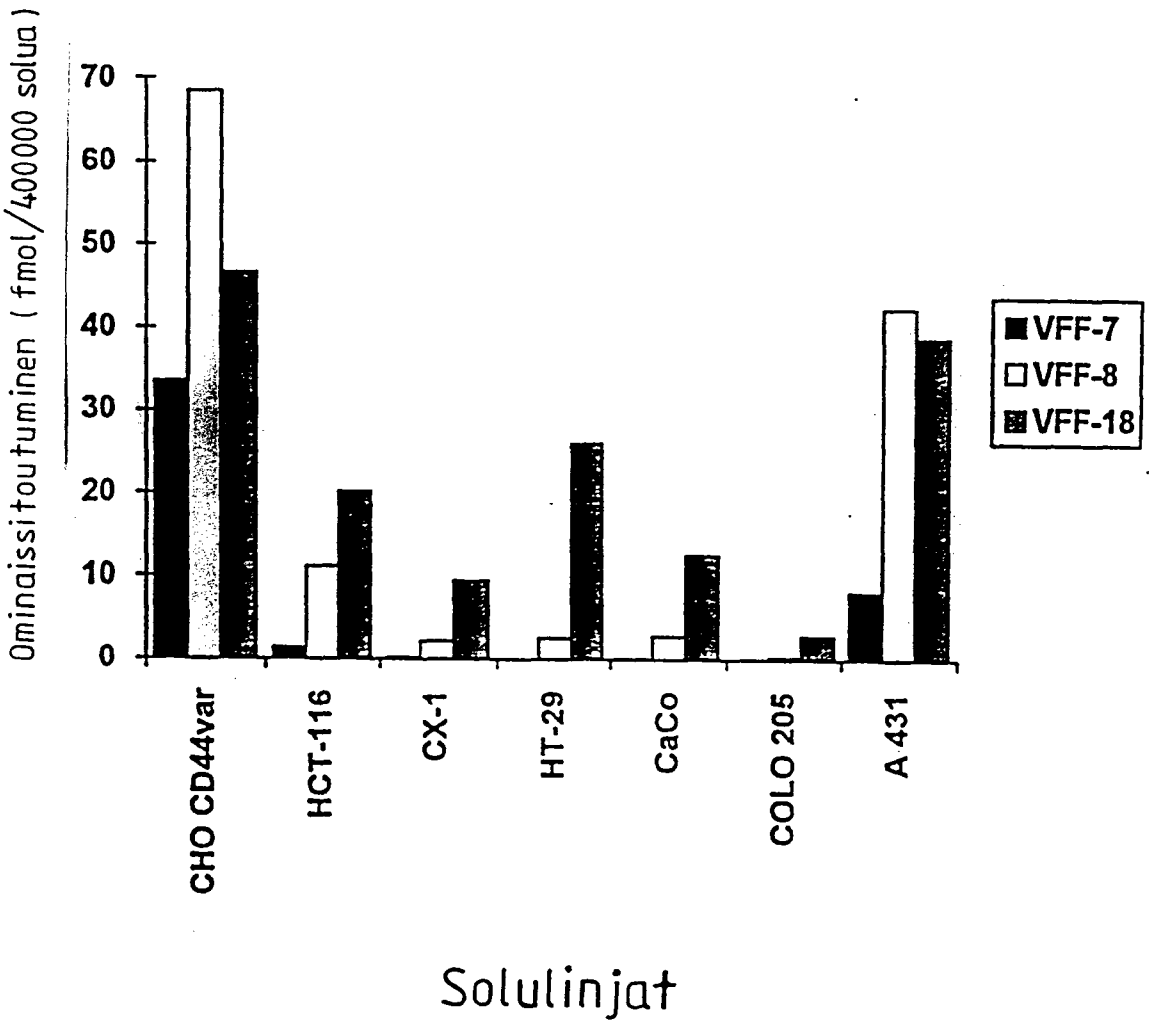
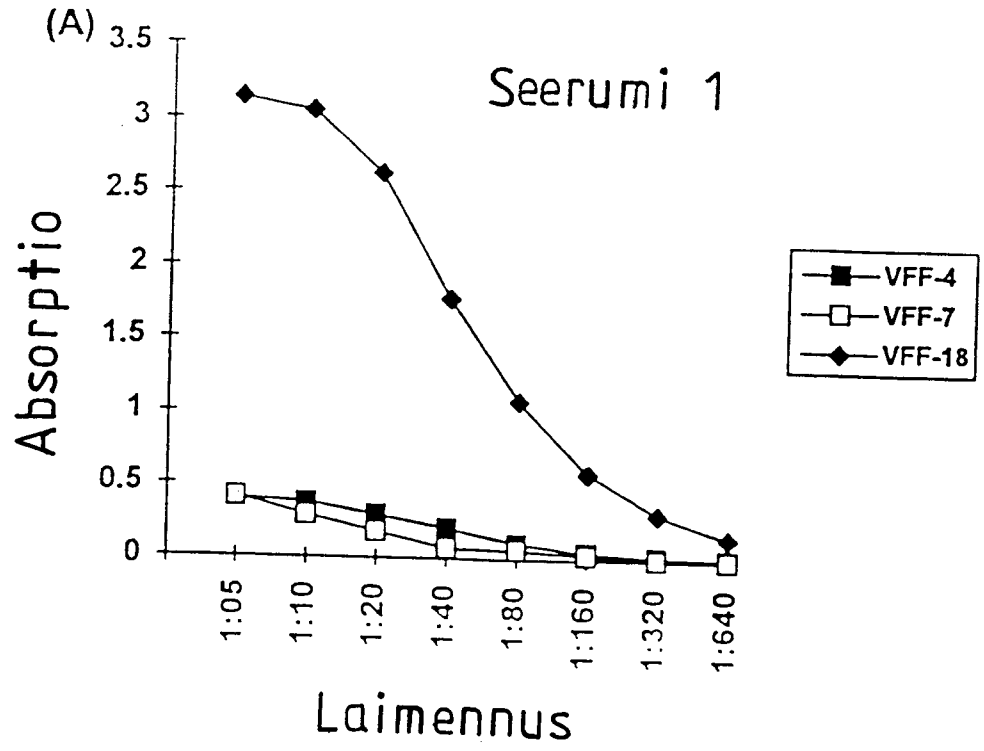

Ominaissitoutuminen (fmol/400000 solua)
70
60
50
40
30
20
10
0
CHO CD44var
HCT-116
CX-1
HT-29
CaCo
COLO 205
A 431
VFF-7
VFF-8
VFF-18
Solulinjat

Fig. 4


(A)
Seerumi 1
Absorptio
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1:05
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
1:640
Laimennus
VFF-4
VFF-7
VFF-18

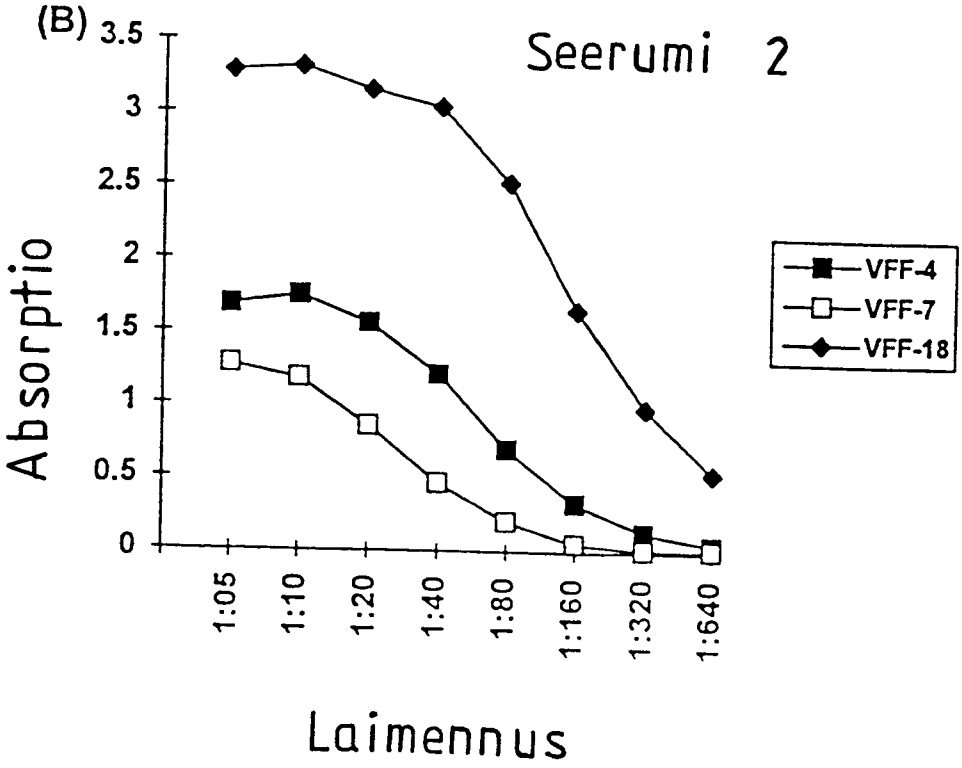

(B)
Seerumi 2
Absorptio
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1:05
1:10
1:20
1:40
1:80
1:160
1:320
1:640
Laimennus
VFF-4
VFF-7
VFF-18

Fig. 5

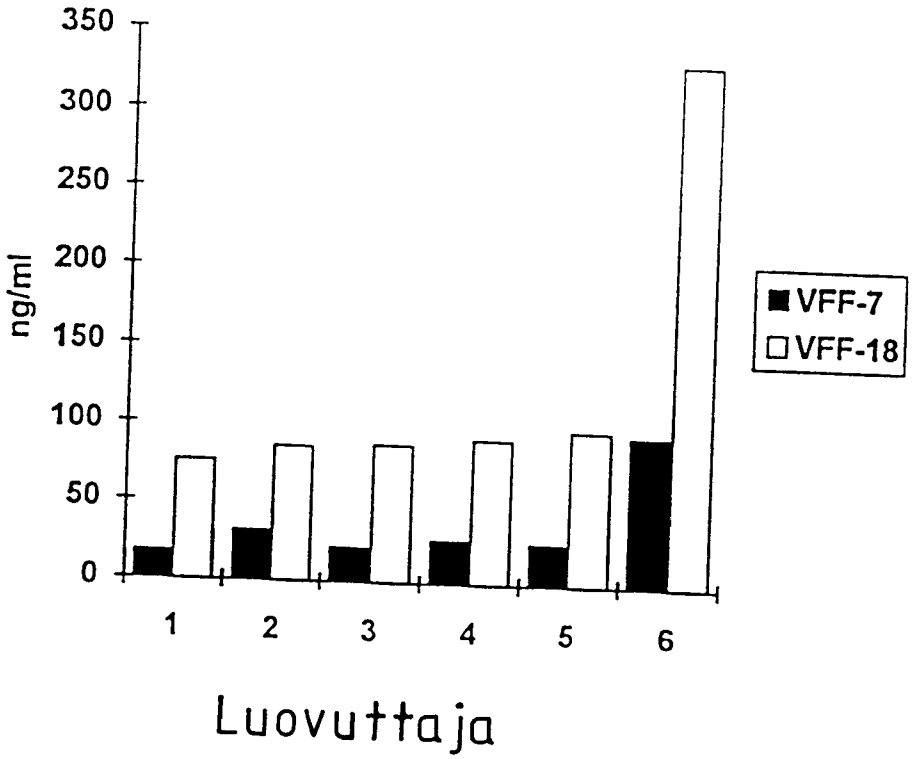

350
300
250
200
150
100
50
0
ng/ml
1
2
3
4
5
6
Luovuttaja
VFF-7
VFF-18

Fig. 6