

(19) **DANMARK**

(11)

DK 174459 B1



(12) **PATENTSKRIFT**

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: **C 12 N 15/48**

(21) Patentansøgning nr: **PA 2001 00933**

(22) Indleveringsdag: **2001-06-15**

(24) Løbedag: **1983-10-31**

(41) Alm. tilgængelig: **2001-06-15**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2003-03-24**

(30) Prioritet: **1982-11-04 US 439.252 1983-05-19 US 496.027**

(73) Patenthaver: **The Regents Of The University of California, 2199 Addison Street, Berkeley, California 94720, USA**

(72) Opfinder: **Martin J. Cline, 441 Alma Real Drive, Pacific Palisades, California 90272, USA**
Dennis J. Slamon, 23300 Victory Boulevard, Woodland Hills, California 91367, USA

(74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Fremgangsmåde til fremstilling af et antigenisk oligopeptid**

(57) Sammendrag:

Et antigenisk oligopeptid indeholdende indtil 20 aminosyrerester og omfattende en eller flere nærmere angivne aminosyresekvenser svarende til de antigeniske områder i peptid-ekspressionsprodukterne af det i retrovirus-oncogener tilstedeværende RNA, fremstilles ved, at der syntetiseres en dobbeltstrenget DNA-sekvens, som koder for oligopeptidets aminosyresekvens, at denne dobbeltstrengede DNA-sekvens indsættes et passende sted i et kloningsmedium eller en vektor til dannelse af et rekombinant DNA-molekyle, hvorefter en egnet værtsorganisme transformeres med det rekombinante DNA-molekyle til opnåelse af ekspresion af oligopeptidet.

Ansøgningen vedrørende dette patent er afdelt fra dansk patentansøgning nr. PA 1983 04980 indleveret den 31. oktober 1983.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et antigenisk oligopeptid indeholdende op til 20 aminosyrerester og indeholdende en eller flere specifikke aminosyresekvenser som er ekspressionsprodukter af re-
trovirale oncogener.

Mekanismen for pattedyrcellers malignitet har været og er fortsat genstand for intens undersøgelse. Et af de områder, som er anset for lovende ved opklaring af mekanismen er de såkaldte oncogener. Selv om forekomsten af oncogener først blev detekteret hos retrovira, synes det nu rimeligt fastslået at de virale oncogener har cellulære modparter. Betydningen eller virkningen af disse cellulære modparter er ikke opklaret. En udmærket oversigt over oncogener, deres egenskaber og især *src*-genet findes i en artikel af J. Michael Bishop, *Scientific American*, marts 1982: 81-93. Artiklen indeholder også en liste over forskellige virale oncogener, hvoraf det fremgår at et antal af dem er involveret i phosphorylering.

Det har vist sig, at *src*-genet ikke blot er aktivt i maligne celler hos kyllinger, men også i normale celler. Forskellen synes kun at bestå i en grads- og ikke en typeforskel, idet det enzym der udtrykkes af *src*-genet forekommer i meget højere koncentration i den maligne celle sammenlignet med den normale celle.

For at kunne påvise tilstedeværelsen af tumorceller er det nødvendigt at kunne skelne mellem normale celler og tumorceller. Den iagttagne egenskab, der skal benyttes ved diagnosticering af tumorcellen må derfor kunne differentieres fra en normal celle eller fra en fysiologisk væske fra en normal vært, hvis det er væsken og ikke cellen, der undersøges. Endvidere må egenskaben ikke være specifik for individet, men være fælles for cellens maligne natur.

Både ved diagnose og behandling er muligheden for specifik påvisning af maligne celler meget betydningsfuld. Enhver benyttet teknik må, når en høj grad af malignitet er under mistanke, være i stand til at skelne maligne celler fra normale celler. Endvidere bør den diagnostiske teknik være egnet for et stort antal medlemmer af befolkningen og ikke være specifik for en lille befolkningsgruppe.

Eftersom en cancercelle er afledt af en normal celle, vil de fleste egenskaber og bestanddele af den maligne celle være den samme som for den normale celle.

Der er endvidere en mere og mere udbredt opfattelse af, at maligniteten er et resultat af en naturlig proces, der i visse sammenhænge resulterer i malignitet.

- 5 Under hensyn til, at malignitet kan være baseret på normale processer, der på det pågældende tidspunkt får et afvigende resultat, er det ikke overraskende, at der har været store vanskeligheder med at påvise observerbare forskelle mellem normale celler og cancerceller for et bredt spektrum af allojeniske værter.

Følgende afhandlinger giver en generel beskrivelse af oncogener og virkningen

- 10 af retrovira ved tumorgenese: Bishop, *Scientific American*, ovenfor; Bishop, *New England J. of Med.* (1980) **303**: 675-681; *Lancet*, July 24, 1982, side 195-196; Cooper, *Science* (1982) **218**: 801-806; Varmus, *Science* (1982) **216**: 812-820. Artikler vedrørende specifikke oncogener inkluderer: Becker et al., *PNAS USA* (1982) **79**: 3315-3319; Tsuchida et al., *Science* (1982) **217**: 937-938 og
15 Dhar et al., *ibid.*, (1982) **217**: 934-936.

Man har nu fundet at DNA der kan transformere celler hos lavere hvirveldyr til malignitet, findes i humane celler og har et meget højere niveau af transcription og ekspression i maligne celler end i normale celler. Ved at man kan bestemme det højere niveau af mRNA eller ekspressionsproduktet af sådan mRNA, er det
20 således muligt at diagnosticere tilstedeværelsen af maligne celler. Desuden kan produktionen af det højere niveau af peptider i maligne celler danne grundlaget for behandling af maligniteten. Hvis polypeptid-ekspressionsproduktet kan findes i fysiologiske væsker, såsom blod, og niveauerne af ekspressionsproduktet er væsentligt forskellige i nærvær og fravær af malignitet, kan den fysiologiske
25 væske screenes som diagnosticum for tilstedeværelsen af en bestemt tumor.

I det følgende beskrives fremgangsmåder og præparater til evaluering af sandsynligheden for tilstedeværelse af maligne celler i en gruppe af celler, især humane celler in vivo eller frisk fjernet fra en human vært. Fremgangsmåden bygger på cellulære produkter, såsom mRNA eller dens ekspressionsprodukt som
30 diagnosticum for den mulige tilstedeværelse af maligne celler. Den mRNA der udvælges til detektion bliver sædvanligvis udvalgt som resultat af at der forekommer RNA i et retrovirus-genom, hvilket retrovirus er i stand til at transformere pattedyrceller til malignitet. Endvidere er den RNA i retroviruset som udvæl-

ges, en sekvens som ikke koder for en væsentlig funktion af retroviruset, men faktisk skal være hvilende.

Først defineres en DNA-sekvens, som er i stand til at forårsage malignitet af pattedyrceller. Når denne DNA-sekvens er defineret, kan der tilvejebringes polynucleotid-sekvens, der kan tjene som sonder til bestemmelse af forhøjede koncentrationer af mRNA som et mål for cellens malignitet. Sekvensen kan også anvendes til at definere polypeptidsekvenser, der kan definere komplementære receptorer med høj specificitet for peptidsekvensen. Receptorerne kan derefter anvendes til at bestemme tilstedeværelsen af eller koncentrationen af peptidet i cellerne eller de fysiologiske væsker og til behandling, hvis receptorerne kan rettes mod maligne celler. Når man kender peptidets natur og funktion, kan der også skaffes andre midler til at kontrollere den forøgede produktion af det særlige peptid.

Det første trin af fremgangsmåden er at definere DNA-sekvensen. Forskellige metoder kan anvendes til at definere DNA-sekvensen for et retroviralt oncogen. F.eks. er der fundet retrovira, der er i stand til at transformere celler fra lavere hvirveldyr til malignitet. De retrovira, som er karakteriseret, har vist sig at have DNA-sekvenser, der kan sammenlignes med vildtypegener i værten, og sådanne gener kaldes nu oncogener. I tilfælde af Rous sarcoma-virus er ekspressionsproduktet for genet isoleret og karakteriseret og har vist sig at være en kinase. I tilfælde af denne kinase er det også vist, at kinasen normalt produceres af cellen, men i en meget lavere mængde, når src-genet fra Rous sarcoma-virus indføres. Der er allerede bestemt et stort antal virale oncogener i forskellige arter af hvirveldyr, og efterfølgende tabel er en liste over oncogenerne og deres oprindelse.

TABEL 1

	<u>Oncogen</u>	<u>Oprindelsesart</u>
	v-src	Kylling
	v-fps	"
5	v-yes	"
	v-fos	"
	v-myc	"
	v-erb	"
	v-myb	"
10	v-rel	kalkun
	v-mos	mus
	v-bas	"
	v-abl	"
	v-ras	rotte
15	v-fes	kat
	v-fms	"
	v-sis	abe

Andre eksempler på kilder til DNA-sekvenser der kan indføre maligne transformationer i hvirveldyrceller, kan være isoleret DNA fra en malign celle eller celle-

20 linie, klonet DNA fra et genomisk bibliotek eller klonet DNA fra et mRNA-bibliotek hvor den totale mRNA fra den maligne celle er reverstranskriberet til DNA og klonet. Hvert af disse biblioteker kan undersøges for deres evne til at indføre malignitet. Et raffinement ved undersøgelsesteknikken kan opnås ved at tage den totale mRNA fra en normal celle og fremstille cDNA fra mRNA'en. Man

25 kan derefter anvende den enkeltstrengede DNA som sonde til at fjerne mRNA associeret med den normale celle fra den totale mRNA fra en malign celle. Den resterende mRNA vil derpå omfatte mRNA der udtrykkes af gener associeret med malignitet. Derefter kan man anvende mRNA'en til at screene et genomisk bibliotek og anvende den klonede DNA som hybridiserer med mRNA ved en

30 bioassay til bestemmelse af evnen til at transformere til malignitet. Med tiden vil også andre metoder blive tilgængelige til at detektere og definere DNA-sekvenser som er i stand til at transformere normale celler.

En yderligere analyse kan anvendes til at screene cDNA fra fostre med mRNA fra maligne celler. Især hvis oncogenet er et hvilende gen eller forholdsvis uvirksomt i modne hvirveldyr, men stærkt aktivt i fosteret, kan screeningen tjene til yderligere at indsnævre det område af sekvensen, der skal screenes.

- 5 Når man først har isoleret en DNA-sekvens der kan inducere malignitet, kan et klonet viralt oncogen eller korte polynucleotidsekvenser anvendes som sonder til bestemmelse af produktionsniveauet af mRNA i celler der mistænkes for at være maligne. Fremstillingen af både RNA- og DNA-nucleotidsekvenser, mærkningen af sekvenserne og den foretrukne størrelse af sekvenserne har
- 10 været genstand for omfattende beskrivelse og eksemplifikation i litteraturen. En sekvens bør normalt have mindst 14 nucleotider, sædvanligvis mindst 18 nucleotider, og polynucleotidsonderne kan være en eller flere kilobaser. Der kan anvendes forskellige mærker, sædvanligvis radionuclider, især ^{32}P . Der kan dog også anvendes andre teknikker, såsom anvendelse af biotinmodificerede
- 15 nucleotider til indførelse i et polynucleotid. Biotinet tjener derefter som site for binding til avidin eller antistoffer, der kan mærkes med forskellige mærker, såsom radionuclider, fluorescerende stoffer, enzymer eller lignende. I stedet kan anvendes antistoffer, som genkender specifikke duplexer, herunder DNA-protein-duplexer. Antistofferne kan på sin side mærkes, og undersøgelsen kan
- 20 udføres for at finde hvor duplexen er bundet til overfladen, således at man ved dannelsen af duplex på overfladen kan bestemme tilstedeværelsen af det til duplexen bundne antistof.

- Ved at isolere nucleotidsekvensen for hele oncogenet kan sekvensen af baser bestemmes på kendt måde, f.eks. ifølge Maxam and Gilbert, *PNAS USA* (1977)
- 25 **74:560**. Sekvensen kan anvendes til bestemmelse af aminosyre-sekvensen af det af oncogenet udtrykte protein. Ved at identificere codonerne for methionin efterfulgt af en sekvens der ikke har stopcodoner som forhindrer ekspression, kan man sædvanligvis finde en enkelt sekvens i ramme med en methionin-codon til definering af oncogenet.

- 30 I stedet kan anvendes hybrid DNA-teknologi til at opnå ekspression. DNA-sekvensen kan restriktionskortlægges, og de passende sites for spaltning defineres. På denne måde kan sekvensen udskæres og indføres i en vektor som har de passende reguleringssignaler. Efter at der er opnået ekspression af

DNA-sekvensen, kan der fremstilles antistoffer over for polypeptidet. Ved anvendelse af oocyter til ekspresion af mRNA'en som derefter translateres til fremstilling af det af oncogenet udtrykte peptid, kan det af mRNAen definerede protein produceres. Identiteten af peptidet fra oocytten som det peptid der produceres ved ekspresion af den hybride DNA, kan derefter bestemmes.

Når først proteinet er blevet identificeret og verificeret, kan man anvende proteinet eller peptid-underenheder heraf som antigen til fremstilling af antistoffer til diagnose og behandling. Antistofferne kan fremstilles på forskellige måder afhængigt af om man ønsker monoklonale eller polyklonale antistoffer. Til opnåelse af polyklonale antistoffer hyperimmuniseres et hvirveldyr, normalt et husdyr, med antigenet, og kort tid efter gentagne immuniseringer opsamles blod, og γ -globulinet isoleres. Til opnåelse af monoklonale antistoffer hyperimmuniseres et lille dyr, milten udtages, og lymphocytterne sammensmeltes med en passende fusionspartner. De danne hybridomer dyrkes derefter under begrænsende fortynding, og der udvælges kloner som giver de ønskede antistoffer.

I stedet for at fremstille hele peptidet kan man bestemme forskellige områder, der sandsynligvis er determinant-sites, og anvende disse oligopeptider med mindst 8 aminosyrer, sædvanligvis med mindst 10 og ikke over 20, sædvanligvis ikke over 18 aminosyrer, til at definere et haptent, der kan anvendes til at inducere antistofdannelsen. Oligopeptidet bindes til et passende immunogen og indføres i et hvirveldyr for at frembringe antistoffer, enten polyklonale eller monoklonale antistoffer som beskrevet ovenfor.

I overensstemmelse hermed er der fundet en serie oligopeptider, der svarer til antigeniske områder i peptid-ekspressionsprodukterne af RNA som er til stede i retrovirus-oncogener. Eksempler på arter af antigeniske oligopeptider, som er velegnede, fremgår af efterfølgende liste, ordnet i grupper efter det retrovirale oncogen (ekspressionsprodukt), som genkendes af antistoffer produceret ud fra oligopeptidet.

A. Myb

- pro-gln-glu-ser-ser-lys-ala-gly-pro-pro-ser-gly- thr-thr-gly
 met-ala-phe-ala-his-asn-pro-pro-ala-gly-pro-leu-pro-gly-ala
 pro-pro-val-asp-his-gly-cys-leu-pro-glu-glu-ser-ala-ser-pro-ala
 5 pro-phe-his-lys-asp-gln-thr-phe-thr-glu-tyr-arg-lys-met-his-gly-gly-ala-val
 pro-phe-his-lys-asp-gln-thr-phe-thr-glu-tyr-arg-lys-met
 asp-asn-thr-arg-thr-ser-gly-asp-asn-ala-pro-val-ser-cys-leu-gly-glu
 pro-ser-pro-pro-val-asp-his-gly-cys-leu-pro-glu-glu-ser-ala-ser-pro-ala-arg
 leu-gln-glu-ser-ser-lys-ala-ser-gln-pro-ala-val-ala-thr-ser
 10 asn-pro-glu-val-lys-lys-thr-ser-trp-thr-glu-glu-glu-asp-arg

B. Src

arg-leu-ileu-glu-asp-asn-glu-tyr-thr-ala-arg-gln-gly-ala-lys-phe-pro
 asn-arg-glu-val-leu-asp-gln-val-glu-arg-gly-tyr-arg-met-pro
 tyr-arg-arg-asp-pro-glu-glu-arg-pro-thr

15 C. Ras^{Ki}

arg-leu-lys-lys-ileu-ser-lys-glu-glu-lys-thr-pro-gly-cys-val-lys-ileu-lys-lys
 asp-leu-pro-ser-arg-thr-val-asp-thr-lys-gln-ala-gln-glu-leu-ala-arg
 met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-gly-ala-ser-gly-val-gly-lys-ser-ala

D. Ras^{Ha}

- 20 glu-asp-ileu-his-gln-tyr-arg-glu-gln-ileu-lys-arg-val-lys-asp-ser-asp-asp
 val-arg-glu-ileu-arg-gln-his-lys-leu-arg-lys-leu-asn-pro-pro-asp-glu-ser-gly-pro
 met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-val-gly-ala-arg-gly-val-gly-lys-ser-ala
 met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-val-gly-ala-val-gly-val-gly-lys-ser-ala
 met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-val-gly-ala-gly-gly-val-gly-lys-ser-ala
 25 val-asp-glu-tyr-asp-pro-thr-ileu-glu-asp-ser-tyr-arg-lys-gln-val

E. Fes

arg-his-ser-thr-ser-ser-ser-glu-gln-glu-arg-glu-gly-gly-arg

ser-arg-glu-ala-ala-asp-gly

asn-gln-gln-thr-arg-glu-phe-val-glu-lys-gly-gly-arg

5 pro-glu-val-gln-lys-pro-leu-his-glu-gln

phe-leu-arg-thr-glu-gly-ala-ala-ala-asp-glu-asp-ala-ala-ala

phe-leu-arg-thr-glu-gly-ala-arg-leu-arg-met-lys-thr-leu-leu

ser-ala-pro-arg-ser-ser-pro-ser-thr-ser-ser-trp-ser-ser

ala-ser-pro-tyr-pro-asn-leu-ser-asn-gln-thr-arg

10 F. Myc

asp-gln-gln-arg-leu-gly-arg-arg-thr-arg-arg-arg-val-arg-lys

glu-arg-gln-glu-ala-glu-arg-his-asn-val-leu-glu-arg-gln-arg-arg-asn-glu

arg-leu-ileu-ala-glu-lys-glu-gln-leu-arg-arg-arg-arg-glu-gln

arg-lys-lys-asn-lys-lys-lys-ser-glu-glu-ileu-asp

15 pro-pro-thr-thr-ser-ser-asp-ser-glu-glu-glu-gln-glu

arg-thr-leu-asp-ser-glu-glu-asn-asp-lys-arg-arg

glu-arg-gln-arg-arg-asn-glu-leu-lys-leu-arg

glu-gln-leu-arg-arg-arg-arg-glu-gln-leu-lys

asn-asn-glu-lys-ala-pro-lys-val-val

20 arg-arg-glu-gln-leu-lys-his

G. Fos

lys-glu-lys-glu-lys-leu-glu-phe-ileu-leu

pro-glu-glu-glu-glu-lys-arg-arg-ileu-arg-arg-glu-arg

- Flere aminosyregrupper kan kobles til begge ender af hver af de under afsnit A
- 25 – F ovenfor nævnte oligomere peptidsekvenser, uden at der sker nogen ændring af det dannede peptids antigeniske karakter, op til 50, fortrinsvis 25, ami-

nosyrerester, der indeholder i det mindste én af de i afsnit A – F nævnte aminosyresekvenser.

De ovenfor angivne antigeniske oligopeptider indeholdende en eller flere af de i afsnit A – F angivne aminosyresekvenser kan fremstilles syntetisk eller ved hybrid DNA-teknologi. For sådanne polypeptider og oligopeptider med op til 50 aminosyrerester egner sig især konventionel fastfase-peptidsyntese. Ved denne almindelige synteseprocedure til fremstilling af peptider, der f.eks. er beskrevet i US patentskrift nr. 4 341 761, benyttes kendte sidekædebeskyttende grupper og konventionelle bærere, f.eks. polystyrenharpiks, såsom chlormethyleret harpiks, hydroxymethylharpiks eller benzhydrylaminharpiks, til at opnå aminosyrekoblingen.

Ved udøvelse af rekombinant eller hybrid DNA-teknologi, kan sådanne oligopeptider indeholdende op til f.eks. 20 aminosyrerester benyttes til at udlede codon-sekvensen for det nucleotid (DNA), som koder for det omhandlede oligopeptid. Hvis man bruger denne codon-sekvens som skabelon, kan dobbeltstrenget DNA syntetiseres på kendt måde og indsættes i en vektor-DNA eller et kloningsmedium, såsom E. coli plasmid. Transformerings af en egnet vært, f.eks. en mikroorganisme, såsom E. coli eller f.eks. andre cellelinier, med rekombinante vektorer, giver et middel til at opnå ekspresion af det ønskede oligopeptid.

I overensstemmelse hermed tilvejebringer den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til fremstilling af et antigenisk oligopeptid indeholdende op til 20 aminosyrerester og indeholdende en eller flere af de ovenfor angivne aminosyresekvenser, hvilken fremgangsmåde er særegen ved at der syntetiseres en dobbeltstrenget DNA-sekvens, som koder for oligopeptidets aminosyresekvens, at denne dobbeltstrengede DNA indsættes i et passende site i et kloningsmedium eller en vektor til dannelse af et rekombinant DNA-molekyle, hvorefter en egnet værtsorganisme transformeres med det nævnte rekombinante DNA-molekyle til opnåelse af ekspresion af oligopeptidet.

I de situationer, hvor det humane gen er forskelligt fra v-onc, f.eks. human c-ras, kan den ovenfor beskrevne teknik anvendes til at isolere genet, mRNA'en eller pseudo-genet og opnå antistoffer over for det humane ekspressionsprodukt. Det humane oncogen forventes at have væsentlig komplementaritet over

for det beslægtede *v-onc*, idet det normalt afviger i mindre end 5 % af baserne, og almindeligvis afviger med mindre end 5% af aminosyrerne i ekspressionsproduktet.

Antistofferne kan anvendes på forskellige måder. Især kan de benyttes til diagnose. I de tilfælde, hvor antigenet kun kan forekomme i en fysiologisk væske ved en højere koncentration, når der forekommer malignitet, kan den fysiologiske væske, såsom serum, plasma, helblod eller cerebrospinalvæske, underkastes en undersøgelse. De ved undersøgelsen anvendte antistoffer kan være mærkede eller ikke-mærkede. Ikke-mærkede antistoffer kan anvendes til agglutinerings, de mærkede antistoffer kan anvendes i et stort antal undersøgelser, idet der anvendes vidt forskellige mærkninger, såsom radionuclider, enzymer, fluorescerende stoffer, enzym-substrater eller cofaktorer. Disse metoder er veldefinerede i litteraturen og eksempler på prøvningsprocedurer kan findes i US patentskrifterne nr. 3 817 834, 3 935 074, 4 233 402 og 4 318 980.

Ved nogle teknikker vil det være nyttigt at mærke antigenet eller et fragment deraf i stedet for antistoffet og have en konkurrence mellem det mærkede antigen og antigenet i prøven for antistof. I denne situation er det almindeligt at tilvejebringe kits, som omfatter en kombination af det mærkede antigen eller mærkede fragment og antistoffet i mængder, der giver optimal sensitivitet og nøjagtighed.

I andre situationer kan det være ønskeligt at have en fast bærer, som enten er bundet til et antigen eller et antistof. Et polyepitopisk antigen kan tjene som en bro imellem antistof bundet til en bærer og mærket antistof i prøvningsmediet. I stedet kan man konkurrere mellem mærket antigen og ethvert antigen i prøven for en begrænset mængde antistof.

Hvis antigenet ikke findes i en fysiologisk væske eller det, hvis det findes der, ikke diagnosticerer malignitet, må cellerne isoleres, og cellerne må undersøges for tilstedeværelse af mRNA eller antigen. Metoder til bestemmelse af mRNA er allerede blevet beskrevet. Til detektering af antigenet kan vævsprøven lyses på konventionel måde, f.eks. base, detergenter eller lignende, cellerester skilles fra ved filtrering eller centrifugering, og filtratet eller supernatanten isoleres og undersøges.

Ved terapeutiske behandlinger kan benyttes enten xenogene eller alloge-
nisme antistoffer i afhængighed af behandlingens art, og om de fremmede anti-
stoffer inducerer et immunrespons. I litteraturen er beskrevet mange metoder til
at fremstille humane antistoffer, for så vidt antistoffer fra mus eller andre patte-
5 dyr ikke er tilfredsstillende. Antistofferne kan anvendes på mange måder. Ved
anvendelse af den passende IgG (forskellig fra IgG₁) kan man inducere lyse via
den naturlige komplementproces. Alternativt kan den lyserende del af et toxin
knyttes til antistoffet, især et Fab-fragment. Antistofferne kan være bundet til li-
posomer for at dirigere liposomerne til de maligne celler for at blive optaget i
10 cellerne ved sammensmeltning af membranerne. Andre mærker kan også bin-
des til antistofferne, såsom radionuclider, fluorescerende stoffer eller enzymer.

Ved indførelse af antistofferne *in vivo* vil antistofferne dirigere mærket til den
maligne celle, hvor tilstedeværelsen af malignitet kan diagnosticeres eller be-
handles.

- 15 Sættningen af antistofferne vil variere bredt, afhængigt af mærkets art,
formålet med antistofferne, det site mod hvilket antistofferne er rettet, og lignen-
de. Antistofferne indføres sædvanligvis i en fysiologisk acceptabel bærer, f.eks.
saltopløsning eller en phosphatpufret saltopløsning, og injiceres i værten på det
ønskede sted, hvis det er muligt, og ellers i et cirkulerende system, såsom blod.
- 20 De beskrevne antistoffer kan også anvendes til at isolere celler der udtrykker
oncogenet, og til at fjerne celler *in vitro* fra en heterogen cellepopulation inde-
holdende celler der udtrykker oncogenet. Adskillelse kan opnås med en fluore-
scensaktiveret cellesortering (FACS). Den samme teknik kan anvendes til at
identificere og isolere celler der udtrykker oncogenet. Til fjernelse af celler der
25 udtrykker oncogenet fra en blanding af celler kan de omhandlede antistoffer
kombineres med komplement, sammenføjes med det lyserende fragment (A-
fragment) af et toxin (se EP patentansøgning nr. 17 507 og GB patentansøg-
ning nr. 2 034 324), eller cellerne agglutineres og separeres ved fysiske meto-
der.
- 30 De følgende eksempler tjener til at belyse opfindelsen.

Tumorer blev skaffet fra friske kirurgiske prøver på tidspunktet for resektion og
var ubehandlet med kemoterapi eller radioterapi. Man sørgede for udelukkende

at få levedygtige tumorer og at behandle vævet så hurtigt som muligt for at undgå nedbrydning af mRNA. Prøverne blev hurtigt frosset og opbevaret i flydende nitrogen indtil behandlingen for RNA blev udført. Hvis udopererede prøver omfattede større mængder normalt væv, blev noget af dette taget fra til analyse som en intern kontrol for mængden af *c-onc*-genekspression. *C-onc*-genekspressionen kunne således sammenlignes for normalt og malignt væv fra samme patient. Så lidt som 20 pg Maloney-murinsarcoma-virus, ækvivalent med tilnærmelsesvis én RNA transcript på 3 kilobaser (kb) pr. celle eller tilnærmelsesvis 2 mikrogram poly-A-RNA påført filteret kunne bestemmes ved denne metode (Kafatos et al., *Nucleic Acids Res.* (1979) **7**:1541). Ved at anvende passende kontroller, herunder ubeslægtede RNA'er, poly-A-negativ-fraktion-RNA, plasmid-DNA og muse og humant DNA, kunne man i rimelig grad undgå falsk-negative såvel som falsk-positive resultater. De afsatte pletter blev kvantitativt evalueret ved hjælp af et blødlaser-skanningsdensitometer. Hvis der var tilstrækkeligt materiale tilgængeligt, blev mRNA yderligere karakteriseret ved Northern-analyse for at bekræfte tilstedeværelsen af og omfanget af specifikke transcripter (Thomas, *PNAS USA* (1980) **77**:5201).

Ekspression af 13 cellulære oncogener i 14 tumorer blev undersøgt ved DNA-RNA hybridiseringsteknik. Disse data er sammenfattet i tabel 2.

TABEL 2

v-onc sonde	HUMAN MALIGNITET *									
	Gastrointestinale maligniteter				Renalcelle-carcinoma				Ovarie-carcinoma	
	Adenocarcinoma fra				Lunge-adeno- carcinoma				Lympho- sarcoma	
	Colon		Tyndtarm		Rectum					
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Myc**	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
Myb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Src	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abl***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fos	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+	++
Mos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ras ^{Ha}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Ras ^{Ki}	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Fes	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Fms	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Stigende antal plusser indikerer stigende hybridiseringsintensitet af vavsv-mRNA til v-onc sonde

** Avian

*** Murin

Der blev iagttaget 3 mønstre: 1) ekspresion af specifikke c-onc mRNA-sekvenser i alle eller næsten alle tumorprøver (f.eks. c-myc); 2) påvisning af c-onc-ekspresion i sporadiske tumorer (f.eks. c-fes); og 3) ingen påviselig ekspresion (f.eks. c-mos).

- 5 Der målttes ingen væsentlig ekspresion af mRNA-sekvenser, der var homologe til c-erb, c-yes, c-abl, c-mos, c-fms, eller c-sis. Dette var ikke resultat af manglende homologi mellem den virale gensonde og den humane mRNA, da det var muligt at påvise homologer af alle disse sonder i humant genomisk DNA. RNA fra mikroskopisk normalt væv indeholdt ikke nogen påviselige
10 transcripter ved denne analyse.

- Fire cellulære oncogener udviste et konsistent ekspresionsmønster i forskellige humane tumorer. Disse var c-myc, c-fos, c-ras^{Ha}, og c-ras^{Ki}. Der foretoges en sammenligning af intensiteten af hybridisering, hvilket var muligt, da alle sonder var mærket til tilnærmelsesvis samme specifikke aktivitet. v-myc
15 og v-fos viste den højeste intensitet af hybridisering til humane tumor-RNA'er, hvilket antyder tilstedeværelsen af et stort antal kopier af mRNA pr. celle. Ekspresion af begge disse gener blev iagttaget ved alle undersøgte maligniteter. c-ras^{Ha}- og c-ras^{Ki}-sekvenser blev også detekteret i de fleste af de humane tumorer, men med mindre intens hybridisering.

- 20 mRNA-sekvenser relateret til c-fes, blev kun detekteret i 2 af 14 undersøgte tumorer; begge disse var lungecancere.

C-myb-ekspresion blev kun detekteret i én af 14 tumorer; denne var også en lungecancer.

- 25 C-src mRNA-sekvenser blev kun iagttaget i cirkulerende tumorceller hos en patient med lymphosarcoma.

- For at undersøge, hvorvidt ekspresion af cellulære oncogen-sekvenser var relateret til neoplasie, blev der gjort en anstrengelse for at opnå både stort set normalt udseende væv og åbenbart malignt væv fra samme område af patienten på samme tidspunkt. Hybridiseringsundersøgelser blev derefter udført
30 på RNA-prøver fra tumoren og fra tæt beliggende ikke-involverede væv. I 6 af de 14 patienter var det muligt at gennemføre denne analyse. I ét af disse 6

tilfælde blev det senere ved histologisk analyse vist, at det formodede normale væv var infiltreret med tumor. I 4 af de resterende 5 tilfælde var der differentiell ekspression mellem tumoren og det normale væv idet der blev iagttaget lave eller ikke-detekterbare niveauer i de normale væv og forhøjede niveauer i maligniteten. Tre af renal-celle-carcinomerne og ét colon-carcinom viste dette fænomen.

Afdupnings-analyse af RNA fra celler i områderne af tumorprøven og kontrolprøven udviste en korrelation mellem tilstedeværelsen eller fraværelsen af tumor og c-onc-genekspression. I én tumor, et adenocarcinom fra tyndtarmen, blev fundet c-onc-beslægtede sekvenser i histologisk normalt tilliggende væv. Analyser af poly-A-RNA fra tumorer og kontrolvæv blev gennemført ved Northern-teknikken. To c-mys-relaterede transcripter på 4,0 og 2,0 kb blev fundet i alle de undersøgte tumorer. Foruden disse transcripter var der åbenlys nedbrydning af noget af mRNA'en ved disse hybridiseringsanalyser, højst sandsynlig stammende fra nedbrydning under vævs-anoxia i perioden efter kirurgisk fjernelse af vævet. Under anvendelse af de ovenfor anførte procedurer blev adskillige andre tumor typer, opnået fra friske kirurgiske prøver, undersøgt for c-onc-genekspression. I denne serie af prøvninger benyttes DNA-RNA-hybridisering til at lede efter ekspression af 10 forskellige cellulære oncogener i 9 tumorer. De opnåede data er sammenfattet i tabel 3 nedenfor.

TABEL 3

v-onc sonde	HUMAN MALIGNITET *									
	Bryst-carcinoma			Uterus- carcinoma		Thymoma	Hodgkin's	Non-Hodgkin's lyhhoma	Kronisk myelocytisk leukæmi	
	1	2	3	1	1	1	1	1	1	2
Myc**	++	+++	+++	-	+	++	++	+	++	-
Myb	+	++	-	-	-	+	+	-	+	-
Src	+	+	-	-	-	++	++	+	+++	-
Rel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abl***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fos	++	++	++	-	+	++	++	+	++++	++++
Ras ^{Ha}	+++	+++	+++	-	+	++	++	+	++	+
Ras ^{Ki}	+	+	++	-	-	+	+	-	+	+
Fes	+	++	+++	-	-	+	+	+	+++	++
Sis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Stigende antal plusser indikerer stigende hybridiseringsintensitet af vav-s-mRNA til v-onc sonde

** Avian

*** Murin

De i tabel 3 angivne resultater korrelerer temmelig godt med de resultater der tidligere er rapporteret i tabel 2 derved at de cellulære oncogener c-myc, c-fos, c-ras^{Ha} og c-ras^{Ki} viser et konsistent ekspressionsmønster i de yderligere undersøgte tumor typer. Yderligere blev c-myb, c-src og c-fes også detekteret i flere yderligere tumor typer, mens c-rel, c-abl og c-sis ekspression ikke blev iagttaget i nogen af de yderligere undersøgte tumor typer. Det er interessant at ingen af de cellulære oncogener som der blev søgt efter viste sig at blive udtrykt i noget væsentligt niveau i det eneste evaluerede uterus carcinom.

- 10 For at bestemme om den mRNA som blev vist at være til stede i maligne celler i forhøjede mængder var knyttet til gener som er involveret i embryogenese, blev der udført forsøg generelt som angivet i det følgende. Total RNA blev isoleret fra embryoer/føtuser af tilfældigt opdrættede schweizer-mus ved daglige intervaller begyndende med svangerskabets 6 dag (dagen for be-
- 15 frugtning blev angivet som dag 0 for prænatal udvikling). Begyndende ved dag 10 af prænatal udvikling blev selve embryoet adskilt fra de ekstraembryonale membraner og placenta. Den lille størrelse forud for dag 10 forhindrede adskillelse, og derfor repræsenterer embryoerne fra dagene 6 - 9 hele conceptus som dissekeret fra uterusvæggen.
- 20 Aliquoter af poly(A)-indeholdende RNA (poly(A⁺)-RNA) blev isoleret ved affinitetskromatografi på oligo(dT)-cellulose-kolonner og anbragt som pletter på nitrocellulosepapir (dot blots) (Kafatos et al., *Nucl. Acids Res.* (1979) **7**:1541-1552). Prøverne blev hybridiseret til [³²P]-mærkede molekylært klonede oncogen-specifikke sonder. Dot blots blev kontinuerligt evalueret ved hjælp af
- 25 et blød-laser-skanningsdensitometer. Transkriptionsaktivitet af c-onc'er blev yderligere studeret mere detaljeret i forskellige væv fra nyfødte og 10 dage gamle mus. Agarosegel-elektroforese efterfulgt af afdupning på nitrocellulosepapir (Northern blotting), (Thomas, *PNAS USA* (1980) **77**:5201-5205) blev anvendt til at bekræfte de opnåede resultater fra dot-blot-analyse og yderligere
- 30 re at bestemme størrelsen af de forskellige c-onc-relaterede transkripter.

Mere specifikt blev RNA isoleret fra Swiss-Webster museembryoer på forskellige udviklingstrin under anvendelse af guanidin-thiocyanot-metoden

(Cox, *Methods Enzymol.* (1967) **12**:120-129; Adams et al., *PNAS USA* (1980) **74**:3399-3043).

Som ovenfor angivet repræsenterer Swiss-Webster- museembryoer fra da-
gene 6 - 9 hele concepti indbefattet alle ekstraembryonale væv, såsom
5 membraner og de celler der giver anledning til placenta på senere udviklings-
trin. I alle senere stadier blev selve embryoet dissekeret frit fra ekstraembry-
onale væv. RNA blev selekteret for poly(A⁺)-RNA ved en cyklus af kromato-
grafi på oligo-(dT)-cellulose-kolonne (Aviv and Leder, *PNAS USA* (1972)
69:1408-1412). Poly(A⁺)-RNA blev opløst i vand, kogt, hurtigt afkølet på is,
10 og 3 µg (1,5 µl) blev påført ark af nitrocellulosepapir som tidligere var blevet
ækvilibreret med 20 x SSC (1 x SSC er 0,15 NaCl, 0,015 M natriumcitrat) og
lufttørret. Efter bagning i 18 timer ved 80 °C blev afdupningerne (blots) præ-
hybridiseret i mindst 4 timer ved 45 °C i en puffer indeholdende 0,75 M NaCl,
0,05 M natriumphosphat (pH 7,5), 0,005 M EDTA, 0,2 % SDS, 10 mg gly-
15 cin/ml, 5 x Denhardt's reagens (1 x Denhardt's reagens er 0,02 % hver af fi-
coll, okseserumalbumin og polyvinylpyrrolidon), 0,25 mg denatureret silde-
DNA/ml og 50 % formamid.

Afdupningerne (blots) blev hybridiseret i ca. 20 timer ved 45 °C med 1×10^6
tællinger/min nick-translateret sonde/ml hybridiseringspuffer (præhybrise-
20 rings-puffer med Denhardt's reagens ved 1x). De klonende oncogen-frag-
menter oprenset fra vektor-sekvenser ved præparativ agarosegel-
elektroforese blev nick-translateret (Rigby et al., *J. Mol. Biol.* (1977) **113**:
237-251) i nærvær af [³²P]-dCTP (3200 Ci/mmol) til specifikke radioaktiviteter
på ca. $1 - 2 \times 10^9$ tællinger/min/µg DNA. Efter hybridisering blev klatterne va-
25 sket 3 gange i 1 x SSC ved 50 °C i ialt ca. 2 timer og eksponeret på
foreksponerede røntgenfilm med intensiveringsskærme ved -70 °C i 72 timer.

Under anvendelse af ovennævnte procedure blev et antal kendte oncogener
screenet for at bestemme om de var udtrykt i embryoerne. Den følgende ta-
bel 4 angiver de enkelte oncogener og observationerne vedrørende deres
30 ekspression i embryoniske celler.

TABEL 4

<u>Oncogen</u>	<u>Virus</u>	<u>Sygdom</u>	<u>mRNA-produktion embryoner</u>		
			<u>dage 6 – 9</u>	<u>10 – 18</u>	<u>føtus</u>
fos ¹⁾	FBJ-osteosarcoma	osteosarcoma	+	-	+
abl ²⁾	Abelson leukæmia	lymphoma	+	+	+
ras ³⁾	Harvey sarcoma	erythroleukæmia, sarcoma	+	+	+
mos ⁴⁾	Maloney sarcoma	sarcoma	-	-	-
myc ⁵⁾	Avian myelocytomatosis	carcinoma sarcoma leukæmia	+	+	
erb ⁶⁾	Avian erythroblastosis	leukæmia, sarcoma sarcoma	-	+	
src ⁷⁾	Rous sarcoma virus	sarcoma	+	+	
myb ⁸⁾	Avian myeloblastosis	leukæmia	-	-	
fes ⁹⁾	Snyder-Theillin felin sarcoma	sarcoma	-	-	
sis ¹⁰⁾	Simian sarcoma	sarcoma	+	+	

1) Curran et al., *J. Virol.* (1982)2) Goff et al., *Cell* (1980) **22**:777-7853) Ellis et al., *J. Virol.* (1980) **36**:408-4204) Oskarsson et al., *Science* (1980) **207**:1222-1227;Jones et al., *PNAS USA* (1980) **77**:2651-26555) Eva et al., *Nature* (1982) **295**:1166) Gonda et al., *Mol. Cell. Biol.* (1982) **2**:6177) Wang et al., *J. Virol.* (1977) **24**: 648) Vister et al., *DNAS USA* (1982) **79**:3677-36819) Fedele et al., *PNAS* (1982), in press10) Devare et al., *PNAS* (1982) **79**:3179-3182

Relativt høje niveauer af *c-fos*-relaterede sekvenser blev detekteret i poly(A⁺)-RNA præpareret fra 6, 7, 8 og 9 dages concepti indeholdende selve embryoet og ekstraembryonale væv. Mere end 10 gange lavere *fos*-ekspression blev iagttaget i embryoer på senere udviklingsstadier dissekeret fri fra ekstraembryonale væv. Data fra placentaen og ekstraembryonale membraner for føti fra dagene 10 - 18 viste at ekspressionen primært var i disse væv. I postnalt væv kunne *c-fos*-ekspression iagttages i alle undersøgte væv med kraftigere hybridisering til *fos*-specifikke sonder fra knogler.

Hybridisering viste, at for *c-abl* iagttages ca. tre gange højere niveauer i selve embryoet end i ekstraembryonale membraner og placenta efter den tiende dag fra befrugtningen sammenlignet med den koncentration der iagttages i de 6, 7 og 9 dage gamle concepti. Ekspression af *c-abl* i føtuset viser sig at formindskes efter den 11. dag af prænatal udvikling. Oncogenet *c-abl* er transkriptionelt aktivt i alle undersøgte postnatale musevæv, idet milt- og thymus-poly(A⁺)-RNA udviser en lidt stærkere hybridisering end fra andre væv.

Oncogenet *c-ras*^{Ha} viste sig at blive udtrykt i betydelige, men lignende niveauer i alle stadier af prænatal udvikling, både i selve embryoet og i ekstraembryonale væv. Høje niveauer af *c-ras*^{Ha}-ekspression blev også observeret i forskelligt væv fra nyfødte eller 10 dage gamle mus, især i knogle, hjerne, nyre, hud og milt.

Oncogenet *c-myc* var detekterbart ved dagene 7 og 8, men meget højere niveauer blev observeret i sen embryonisk udvikling (dagene 17 og 18).

Oncogenet *c-erb* havde maksimal hybridisering ved dag 13, mens der ikke blev iagttaget hybridisering ved dag 6

Oncogenet *c-src* blev detekteret i dets højeste niveauer i den sidste halvdel af museembryonisk udvikling med en forøgelse begyndende ved dag 14, maksimum ved dag 15 og gradvist dalende derefter. For oncogenet *c-sis* blev maksimal ekspression observeret ved dag 7 og 16, hvor dag 7-maksimet var 1,5 til 3 gange højere end alle andre dage, og dag 16-maksimet var 1,5 til 2 gange højere end ved dagene 9 - 13 og dagene 17 og 18.

Ved den næste undersøgelse anvendtes nucleotidsekvensen fra det formodede oncogen-område af Avian myeloblastosis virus *myb* (Vister et al. (1982) ovenfor). Under anvendelse af den offentliggjorte nucleotidsekvens blev et antal antigeniske oligopeptidsekvenser afledt, og 7 af de således afledte polypeptider blev syntetiseret og evalueret som værende potentielt antigeniske. Disse 7 oligopeptider, der også er anført ovenfor som antigeniske oligopeptider, har følgende formler:

- (1) pro-phe-his-lys-asp-gln-thr-phe-glu-tyr-arg-lys-met
- (2) pro-ser-pro-pro-val-asp-his-gly-cys-leu-pro-glu-glu-ser-ala-ser-pro-ala-arg
- (3) asp-asn-thr-arg-thr-ser-gly-asp-asn-ala-pro-val-ser-cys-leu-gly-glu
- (4) pro-gln-glu-ser-ser-lys-ala-gly-pro-pro-ser-gly-thr-thr-gly
- (5) met-ala-phe-ala-his-asn-pro-pro-ala-gly-pro-leu-pro-gly-ala
- (6) pro-pro-val-asp-his-gly-cys-leu-pro-glu-glu-ser-ala-ser-pro-ala
- (7) pro-phe-his-lys-asp-gln-thr-phe-thr-glu-tyr-arg-lys-met-his-gly-gly-ala-val

Polypeptiderne blev knyttet til albueskæl-hæmocyannin i overensstemmelse med konventionel teknik (Dockray, *Regulatory Peptides* (1980) 1:169), og det dannede immunogen blev anvendt til at immunisere kaniner ved en første injektion med Freund's complete adjuvant, efterfulgt af injektioner med Freund's incomplete adjuvant i perioder på 3 - 4 uger for at hyperimmunisere kaninerne. Kaninerne blev blodtappet gentagne gange i en periode på 6 måneder. Af de 7 oligopeptider som resulterede i produktion af antistoffer, blev der udvalgt antistoffer over for to peptider (5 og 7) til detaljeret analyse. Antistofferne blev omsat med radioaktivt mærkede cellelysater fra en cellelinie indeholdende multiple kopier af Avian myeloblastosis virus og med lysater fra passende ikke-inficerede cellelinier. Antistof nr. 5 identificerer et specifikt protein på tilnærmelsesvis 58 000 dalton som er tilstede i den virus-inficerede cellelinie, men ikke i kontrollerne.

Antistof over for polypeptid 5 blev også omsat med plasma fra kyllinger, som havde tumorer induceret af *amv*. Et bånd mage til det der blev observeret med de ovennævnte lysater på tilnærmelsesvis 48 000 dalton, blev identificeret.

Antisera over for polypeptid nr. 5 blev også omsat med lysater af en myeloid human leukæmi-cellelinie (HL-60), der vides at udtrykke mRNA transkripter af *c-myb*-genet (Gallo and Wong-Staal, *Blood* (1982) **60**: 545). Dette antistof reagerede med et protein på ca. 90 000 dalton. I frisk isolerede myeloid leukæmi-celler identificerer antistofferne en serie proteiner, 14 kd til 70 kd, som ikke findes i normale hvide blodceller.

De polyklonale antistoffer over for fragmentet nr. 5 af *myb*-proteinet blev prøvet for deres evne til at dræbe normale og leukæmiske celler. Den anvendte procedure er beskrevet i Tarasaki and McClelland, nedenfor. Dataene er anført i den følgende tabel 5.

TABEL 5

CYTOTOXICITET* AF ANTI-MYB2 ANTISTOF OVER FOR HOMANE CELLER

Antiserum	Fortynding	Celler**					
		Normal B	Normal T	Molt 4 (T)	HL-60 (AML)	Fælles ALL	T-ALL
Medium alene							
(- kontrol)		1	1	1	1	1	1
ALS ⁺							
(+ kontrol)	-	8	8	8	8	8	8
Anti-myb	-	1	1	8	6	1	6
	1:2	1	1	6	1	1	6
	1:4	1	1	6	1	1	4
Præ-immun	-	1	1	4	1	1	2
	1:2	1	1	2	1	1	2
	1:4	1	1	2	1	1	2

*8 = 80-100% dræbt
 Fremgangsmåden ifølge Teraski og McClelland, *Nature* (1964) 204:998, blev anvendt til komplement-lyse

*** 3 af 5 er dræbt; en repræsentativ celle er vist

+ ALS – antileukocyt-serum

** Molt 4 er en non-malign human T lymphoid-cellelinie, der vides at udtrykke myb-mRNA

HL-60 – human myeloid leukæmicelllinie

AML – akut myeloid-leukæmia

ALL – akut lymphocyt-leukæmia

T-ALL – T-celle akut lymphoblastisk leukæmia

1 = 0-10% dræbt

De ovenstående resultater viser at ekspressionsproduktet af *myb*-genet kan reagere med antistoffer til at frembringe lyse med komplement. Det må således antages, at *myb*-proteinet er et overflademembranprotein som er til rådighed for binding til antistoffer. Ved at identificere proteiner, hvortil specifikke antistoffer vil binde, hvilke proteiner har diagnostisk værdi som indikative for malignitet, kan de maligne celler identificeres og behandles. I det her beskrevne arbejde er der ikke foretaget nogen bestemmelse mht. specificiteten eller krydsreaktiviteten af antistoffer. Da der kun blev anvendt et fragment til fremstilling af antistofferne, må man forvente, at antistoffer med større bindingsspecificitet og større bindingsevne kunne fremstilles med hele proteinet, især med hele proteinet i en membran. Antistofferne kan anvendes til at selekttere for antistoffer der binder til det samme eller et andet determinant-site.

De angivne data demonstrerer at der kan fremstilles antistoffer som ikke påvirker normale B- og T-celler, men er cytotoxiske i kombination med komplement for et antal forskellige maligne celler. Derfor kan antistofferne anvendes til cancer-terapi uden risiko for i væsentlig grad at inaktivere immunsystemet.

Det er indlysende på basis af de ovennævnte resultater, at man kan påvise tilstedeværelsen af malignitet i humane værter ved at bestemme transkriptions- og/eller ekspressionsprodukterne af oncogenet. Man kan screene retrovira eller en anden kilde til nucleinsyrer for transformering af hvirveldyr til malignitet. Man kan derpå anvende disse nucleinsyrer til at udlede peptidsammensætningen og screene maligne celler for transkripter eller peptider ved hybridisering i førstnævnte tilfælde og med passende receptorer i sidstnævnte tilfælde, idet der anvendes enhver af en lang række forskellige diagnostiske assays. Der kan fremstilles antistoffer over for peptiderne, hvilke antistoffer kan mærkes og derpå anvendes til diagnosticering af tilstedeværelsen af et peptid som er diagnostisk for malignitet. De oncogene proteiner har vist sig at være tilgængelige for binding til antistoffer som overflademembranproteiner. Antistofferne kan tjene som diagnostiske reagenser til bestemmelse af tilstedeværelsen af malignitet og bestemmelse af positionen af maligne celler. Antistofferne kan også tjene til behandling af tumorer in vivo ved anvendelse af radionuclider, toxiner, i kombination med værtens komplementsystem eller opsoniner, eller andet antistofafhængigt lytisk system eller lignende. Antistofferne finder anvendelse i præ- og postoperative sy-

stemer, i de sidstnævnte til bestemmelse af om fuldstændig fjernelse er sket eller om der forekommer metastaser. Antistofferne kan anvendes postoperativt til at destruere alle rester af tumoren som eventuelt ikke er blevet udskåret.

PATENTKRAV

Fremgangsmåde til fremstilling af et antigenisk oligopeptid indeholdende op til ca. 20 aminosyrerester og indeholdende en eller flere af de følgende aminosyresekvenser:

- 5 (a) pro-gln-glu-ser-ser-lys-ala-gly-pro-pro-ser-gly-thr-thr-gly,
- (b) met-ala-phe-ala-his-asn-pro-pro-ala-gly-pro-leu-pro-gly-ala,
- (c) pro-pro-val-asp-his-gly-cys-leu-pro-glu-glu-ser-ala-ser-pro-ala,
- (d) pro-phe-his-lys-asp-gln-thr-phe-thr-glu-tyr-arg-lys-met-his-gly-gly-ala-val,
- (e) pro-phe-his-lys-asp-gln-thr-phe-thr-glu-tyr-arg-lys-met,
- 10 (f) asp-asn-thr-arg-thr-ser-gly-asp-asn-ala-pro-val-ser-cys-leu-gly-glu,
- (g) pro-ser-pro-pro-val-asp-his-gly-cys-leu-pro-glu-glu-ser-ala-ser-pro-ala-arg,
- (h) arg-leu-ileu-glu-asp-asn-glu-tyr-thr-ala-arg-gln-gly-ala-lys-phe-pro,
- (i) asn-arg-glu-val-leu-asp-gln-val-glu-arg-gly-tyr-arg-met-pro,
- (j) arg-leu-lys-lys-ileu-ser-lys-glu-glu-lys-thr-pro-gly-cys-val-lys-ileu-lys-lys,
- 15 (k) asp-leu-pro-ser-arg-thr-val-asp-thr-lys-gln-ala-gln-glu-leu-ala-arg,
- (l) met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-gly-ala-ser-gly-val-gly-lys-ser-ala,
- (m) glu-asp-ileu-his-gln-tyr-arg-glu-gln-ileu-lys-arg-val-lys-asp-ser-asp-asp,
- (n) val-arg-glu-ileu-arg-gln-his-lys-leu-arg-lys-leu-asn-pro-pro-asp-glu-ser-gly-pro,
- 20 (o) met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-val-gly-ala-arg-gly-val-gly-lys-ser-ala,
- (p) met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-val-gly-ala-val-gly-val-gly-lys-ser-ala,
- (q) met-thr-glu-tyr-lys-leu-val-val-val-gly-ala-gly-gly-val-gly-lys-ser-ala,
- (r) val-asp-glu-tyr-asp-pro-thr-ileu-glu-asp-ser-tyr-arg-lys-gln-val,
- (s) arg-his-ser-thr-ser-ser-ser-glu-gln-glu-arg-glu-gly-gly-arg,
- 25 (t) ser-arg-glu-ala-ala-asp-gly,
- (u) asn-gln-thr-arg-glu-phe-val-glu-lys-gly-gly-arg,
- (v) pro-glu-val-gln-lys-pro-leu-his-glu-gln,
- (w) phe-leu-arg-thr-glu-gly-ala-ala-ala-asp-glu-asp-ala-ala-ala,

- (x) phe-leu-arg-thr-gly-ala-arg-leu-arg-met-lys-thr-leu-leu,
- (y) ser-ala-pro-arg-ser-ser-pro-ser-thr-ser-ser-trp-ser-ser,
- (z) asp-gln-gln-arg-leu-gly-arg-arg-thr-arg-arg-arg-val-arg-lys,
- (aa) glu-arg-gln-glu-ala-glu-arg-his-asn-val-leu-glu-arg-gln-arg-arg-asn-glu,
- 5 (bb) arg-leu-ileu-ala-glu-lys-glu-gln-leu-arg-arg-arg-arg-glu-gln,
- (cc) arg-lys-lys-asn-lys-lys-lys-ser-glu-glu-ileu-asp,
- (dd) pro-pro-thr-thr-ser-ser-asp-ser-glu-glu-glu-gln-glu,
- (ee) arg-thr-leu-asp-ser-glu-glu-asn-asp-lys-arg-arg,
- (ff) glu-arg-gln-arg-arg-asn-glu-leu-lys-leu-arg,
- 10 (gg) glu-gln-leu-arg-arg-arg-arg-glu-gln-leu-lys,
- (hh) asn-asn-glu-lys-ala-pro-lys-val-val,
- (ii) arg-arg-glu-gln-leu-lys-his,
- (jj) lys-glu-lys-glu-lys-leu-glu-phe-ileu-leu,
- (kk) pro-glu-glu-glu-lys-arg-arg-ileu-arg-arg-glu-arg,
- 15 (ll) leu-gln-glu-ser-ser-lys-ala-ser-gln-pro-ala-val-ala-thr-ser,
- (mm) asn-pro-glu-val-lys-lys-thr-ser-trp-thr-glu-glu-glu-asp-arg,
- (nn) try-arg-arg-asp-pro-glu-glu-arg-pro-thr, og
- (oo) ala-ser-pro-tyr-pro-asn-leu-ser-asn-gln-thr-arg,

kendetegnet ved, at der syntetiseres en dobbeltstrenget DNA-sekvens, som

20 koder for oligopeptidets aminosyresekvens, at denne dobbeltstrengede DNA indsættes i et passende site i et kloningsmedium eller en vektor til dannelse af et rekombinant DNA-molekyle, hvorefter en egnet værtsorganisme transformeres med det nævnte rekombinante DNA-molekyle til opnåelse af ekspresion af oligopeptidet.