



F1000098373B



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 06 1977

98373

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

C 07K 14/52, 16/24, G 01N 33/68, 33/574

(21) Patentihakemus - Patentansökning	911853
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	17.04.91
(24) Alkupäivä - Löpdag	17.12.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	17.04.91
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.02.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	

20.12.85 US 811235 P

26.11.86 US 935283 P

(71) Hakija - Sökande

1. Oncogen, 3005 First Avenue, Seattle, WA 98121, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Zarling, Joyce M., 1400 25th Avenue, E. Seattle, WA 98112, USA, (US)
2. Shoyab, Mohammed, 2405 Westmont Way W, Seattle, WA 98199, USA, (US)
3. Marquardt, Hans, 9222 SE 46th Street, Mercer Island, WA 98041, USA, (US)
4. Hanson, Marcia B., 2531 NE 97th Street, Seattle, WA 98115, USA, (US)
5. Lioubin, Mario N., 4130 156th Avenue SE, Bellevue, WA 98006, USA, (US)
6. Brown, Thomas Joseph, 6121 36th Avenue, NW Seattle, WA, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Uusi diagnostisesti käyttökelpoinen polypeptidi, onkostatini M
My diagnostiskt användbar polypeptid, onkostatini M

(62) Jakamalla erotettu hakemuksesta - Avdelad från ansökan: 865156 (patentti - patent 91484)

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

The Journal of Biological Chemistry, vol. 259, nro 1, 1984, pp 686-691

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee uutta, diagnostisesti käyttökelpoista, solujätteistä ja muista leukosyyttiproteiineista suurin piirtein vapaata polypeptidiä, jolla on kyky in vitro estää kasvainsolujen proliferaatiota ja stimuloida ihmisen normaalien fibroblastien proliferaatiota ja joka ei inhiboi ihmisen proliferaatiivisia eikä sytotoksisia T-soluvasteita eikä granulosyyttisten/myelosyyttisten luuydinpesäkesolujen muodostumista, jonka molekyylipaino on suunnilleen alueella 17 - 19 kD määritettynä geelieksklusiokromatografialla ja noin 28 kD määritettynä SDS-PAGE:lla, joka on suhteellisen epäherkkä kohtuullisen happamille ja emäksisille olosuhteille ja kohtuullisesti korotetuilla

le lämpötiloille, jonka puhtausaste on sellainen, että ominaisaktiivisuus on vähintään noin 10 GIA-yksikköä/ng proteiinia ja joka sisältää aminohapposekvenssejä, jotka vastaavat kuviossa 1 esitettyjä sekvenssejä sillä tavalla, että esitetty sekvenssi ja polypeptidiä vastaava sekvenssi eroavat toisistaan korkeintaan kolmen aminohapon suhteen, tai tällaisen polypeptidin kanssa immunologisesti ristireaktiivista, vähintään kahdeksasta aminohaposta koostuvaa poly(aminohappo)fragmenttia. Keksintö koskee myös tällaista polypeptidiä vastaan muodostettuja vasta-aineita sekä diagnostista menetelmää tällaisen polypeptidin toteamiseksi ja menetelmässä käyttökelpoista välineistöä.

Uppfinningen avser en ny, diagnostiskt användbar polypeptid, som är väsentligen fri av celldebris och andra leukocytproteiner och som har förmåga att förhindra in vitro proliferation av tumörceller och stimulera proliferation av människans normala fibroblaster och som ej inhiberar människans proliferativa eller cytotoxiska T-cellresponser eller bildande av granulocytiska/myelocytiska benmärgkolonier, vars molekylvikt är ungefär i området 17 - 19 kD bestämt med gelexklusionskromatografi och ca 28 kD bestämt med SDS-PAGE, vilken är relativt okänslig för moderat syra och basista förhållanden och för relativt förhöjda temperaturer, vars renhetsgrad är sådan, att speciell aktivitet är åtminstone ca 10 GIA-enheter/ng protein och vilken innehåller aminosyrasekvenser, som motsvarar sekvenser i figur 1 på så sätt, att den givna sekvensen och sekvensen som motsvarar polypeptiden skiljer sig från varandra i förhållande till högst tre aminosyror, eller en poly-(aminosyra)fragment, som bildas av åtminstone åtta aminosyror och som är immunologiskt korsreagerande med en dylik polypeptid. Uppfinningen avser också antikroppar, som bildats mot denna polypeptid, samt ett diagnostiskt förfarande för detektion av denna polypeptid och en utrustning användbar i detta förfarande.

```

1       5       10       15       20
A-A-I-G-S-C-S-K-E-Y-R-Y-L-L-G-Q-L-Q-K-Q
25       30       35
T-D-L-M-Q-D-T-S-T-L-L-T-P-Y-I

```

```

1       5       10       15       20
Q-R-L-P-K-A-Q-D-L-E-R-S-G-L-N-I-E-D-L-E-K

```

```

1       5       10       15       20
L-R-E-H-C-R-E-R-P-G-A-E-P-S-E-Q-Q-L-I-G

```

Uusi diagnostisesti käyttökelpoinen polypeptidi, onkosta-
tiini M

Jakamalla erotettu patenttihakemuksesta 865156

5

Leukosyytit, sekä lymfosyytit että monosyytit, on
liitetty kasvainten kasvun estoon muutamissa eläinkasvain-
malleissa. Pahanlaatuisten kasvainten kohonnut esiintymis-
tiheys ihmisissä, joiden immunitetti on alentunut, tukee
10 sitä väitettä, että valkoiset verisolut osallistuvat kas-
vainten kasvun säätelyyn. Näiden valkosolujen tuottamiin,
jo eristettyihin ja karakterisoituihin proteiinitekijöi-
hin, jotka estävät kasvainten kasvua tai säätelevät immu-
nitoimintoja, kuuluvat interferonit α - ja β -, tuumorin
15 nekroositekijä, lymfotoksiini, interleukiini 2 ja muut
lymfokiinit. Koska kullakin näistä eristetyistä tekijöistä
on erilainen vaikutusspektri ja ne voivat olla eri tavalla
vuorovaikutuksessa muiden tekijöiden kanssa, tunnetaan
edelleen voimakasta kiinnostusta kaikkien tekijöiden, joi-
20 ta valkosolut tuottavat säädellössään solujen kasvua ja
immuunitoimintoja, eristämiseen ja karakterisointiin.

Luonnossa esiintyvien tekijöiden löytämisessä,
eristämisessä, puhdistuksessa tai karakterisoinnissa voi-
daan kohdata monia vaikeuksia. Täytyy kehittää menetelmiä
25 kiinnostuksen kohteena olevan tekijän erottamiseksi ja
puhdistamiseksi epäpuhtaassa lähtöaineessa esiintyvistä
muista tekijöistä denaturoimatta halutun tekijän aktiivi-
suutta; täytyy kehittää biologisia määrittäyksiä, jotka mah-
dollistavat fraktioiden identifioinnin erotusten aikana,
30 joissa konsentroidaan tiettyä tekijää; uusi tekijä täytyy
erottaa jo tunnetuista tekijöistä tai muista tuntematto-
mista tekijöistä, joita voi olla läsnä ja jotka voivat

vaikuttaa, joko negatiivisesti tai positiivisesti, halutun tekijän aktiivisuuteen; ja puhdistettua tekijää täytyy konsentroida riittävässä määrin tekijän identifioinnin ja karakterisoinnin mahdollistamiseksi. Siksi eristettyjen tekijöiden lukumäärän kasvaessa jokainen uusi tekijä käy vaikeammaksi identifioida, sillä sen roolia ja toimintaa voivat peittää läsnä olevat lukuisat muut tekijät.

Bealin et al.'n [Cancer Biochem. Biophys. 3 (1979) 93 - 96] mukaan ihmisen virtsassa esiintyy peptidejä, jotka estävät kasvua ja DNA-synteesiä voimakkaammin muuttuneissa kuin normaaleissa soluissa. Holley et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. 77 (1980) 5 989 - 5 992] kuvaavat epiteelisolujen kasvun inhibiittoreiden puhdistusta. Letanskyn [Biosci. Rep. 2 (1982) 39 - 45] mukaan naudan istukasta puhdistetut peptidit estävät kasvainten kasvua ja tymidiinin sisällyttämistä DNA:han suuremmassa määrin kasvaimissa kuin normaalisolukossa. Chen [Trends Biochem. Sci 7 (1982) 364 - 365] kuvaa syöpää tukahduttavan peptidin eristämistä vesivatsanesteestä. Redding ja Schally [Proc. Natl. Acad. Sci. 79 (1982) 7 014 -7 018] kuvaavat yhden tai useamman peptidin, joilla on antimitogeeninen vaikutus useita normaali- ja kasvainsolulinjoja vastaan, eristämistä sikojen hypotalamuksista. Sone et al. [Gann. 75 (1984) 920 - 928] kuvaavat ihmisen makrofagien tuottamien yhden tai useamman tekijän valmistamista, jotka estävät tiettyjen kasvainsolujen kasvua in vitro. Ransom et al. [Cancer Res. 45 (1985) 851 - 862] kuvaavat leukoreguliiniksi kutsutun tekijän eristämistä, joka estää tiettyjen kasvainsolulinjojen replikoitumista ja näyttää olevan eri aine kuin lymfotoksiini, interferoni ja interleukiini 1 ja 2. Useimpia näistä tekijöistä ei ole karakterisoitu täydellisesti, eikä niiden primaarirakennetta tunneta.

Aggarwal et al. [J. Biol. Chem. 259 (1984) 686 - 691] ovat puhdistaneet ja karakterisoineet lymfoblastoidi-solulinjan tuottaman ihmislymfotoksiinin (LT) ja sekven-soineet sen myöhemmin [Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 260
 5 (1985) 2 334]. Gammainterferonia (γ -IF), jota tuottavat lymfoidisolut ja jolla on immuunijärjestelmää säätelevä ja kasvaimia estävä vaikutus, on tuotettu kloonauksen ja il-mentämisen kautta [Gray et al., Nature 295 (1982) 503 - 508]. Tuumorin nekroositekijä (TNF), joka estää joidenkin
 10 kasvainten kasvua ja jota tuottavat makrofagit ja tietyt leukemiasolulinjat, on karakterisoitu, ja TNF-cDNA on kloonattu ja saatettu ilmentymään E. colissa [Pennica et al., Nature 312 (1984) 724].

Keksintö koskee uutta, leukosyyteistä saatavissa
 15 olevaa peptiditekiötä, onkostatini M -polypeptidiä, jolle on tunnusomaista, että se on oleellisesti vapaa solujät-teistä ja muista leukosyyttiproteiineista, sillä on kyky estää kasvainsolujen proliferaatiota ja stimuloida ihmisen normaali-fibroblastien proliferaatiota, se ei inhiboi
 20 ihmisen proliferaatiivisia eikä sytotoksisia T-soluvasteita eikä granulocyte/monocyte luuydinpesäkesolu-jen muodostumista, sen molekyylipaino on 17 - 19 kD määri-tettynä geeliekskluusiokromatografiolla ja noin 28 kD mää-ritettynä SDS-PAGE:lla, se kestää käsittelyn 1 N etikkaha-
 25 polla ja 1 N ammoniumhydroksidilla ja 56 °C:n lämpötilaa yhden tunnin ajan ja se voidaan valmistaa menetelmällä, jossa a) eristetään leukosyytit, kuten histiosyyttiset lymfoomasolut tai normaalit ihmisen perifeerisen veren lymfosyytit, imettäväissoluviljelmästä tai imettäväisestä;
 30 b) aktivoidaan leukosyytit indusoivalla aineella, kuten ingenolilla, forbolilla tai mitogeenillä; ja
 c) eristetään kromatografisesti aktivoiduista leukosyyteistä onkostatini M puhtaana muusta solumateri-aalista.

35 Keksintö koskee myös onkostatini M -polypeptidiä tai sen fragmentteja vastaan muodostettuja vasta-aineita,

diagnostista menetelmää onkostatini M -polypeptidin läsnäolon toteamiseksi näytteestä sekä dianostista välineistöä, joka sisältää onkostatini M -polypeptidiä ja edellä määritettyä vasta-ainetta.

5 Kuvio 1 esittää onkostatini M:n fragmenttien aminohapposekvenssejä,

kuvio 2 on sarja mikroskooppivalokuvia onkostatini M:llä käsitellyistä soluista, jossa (A-C) ovat A375-melanoomasoluja, jotka on käsitelty 0, 5 ja vastaavasti 100
10 GIA-yksiköllä, ja (D-F) ovat W138-fibroblasteja, jotka on käsitelty 0, 5 ja vastaavasti 100 GIA-yksiköllä; ja

kuvio 3 on valokuva onkostatini M:n SDS-PAGE-analyysistä.

Leukosyyttejä, joista onkostatini M:ää voidaan
15 saada, ovat esimerkiksi stimuloitujen U937-solut tai stimuloidut normaalit ihmisen ääreisverilymfosyytit (PBL), joiden kasvualustoihin tekijä erittyy.

Polypeptidifragmentit ovat vähintään 8 aminohappoa käsittäviä uusia polypeptidejä, jotka ovat biologisesti
20 aktiivisia ainakin siinä mielessä, että ne reagoivat immunologisesti ristiin luonnossa esiintyvän onkostatini M:n kanssa. Immunologisesti ristireagoivalla tarkoitetaan sitä, että tämän keksinnön mukaisen uuden polypeptidin indusoima vasta-aine reagoi ristiin alkuperäisen kokonaisen onkostatini M:n kanssa ainakin onkostatini M:n ollessa denaturoituneessa tilassa. Nämä polypeptidit ovat
25 siksi käyttökelpoisia vasta-aineiden indusointiin onkostatini M:lle, jotta vasta-aineita voidaan käyttää onkostatini M:n pitoisuuden määrittämiseen elimistön nesteestä, onkostatini M:n sitomiseen ja siten sen aktiivisuuden
30 säätelyyn ja onkostatini M:n puhdistamiseen, esimerkiksi affiniteettikolonissa käyttämällä. Osassa polypeptidejä voi säilyä myös alkuperäisen kokonaisen onkostatini M:n solujen kasvua säätelevä vaikutus, tosin tämä aktiivisuus
35 voi olla säädelty, tavallisesti alentunut alkuperäiseen kokonaiseen onkostatini M:ään verrattuna.

Kuvio 1 esittää onkostatini M:n kanssa ristireagoivien poly(aminohappojen) aminohapposekvenssejä; ensimmäinen sekvenssi edustaa onkostatini M:n N-päätä.

Poly(aminohapot) sisältävät yleensä vähintään 8 peräkkäisestä aminohaposta koostuvan aminohapposekvenssin, joka vastaa kuviossa 1 esitettyä aminohapposekvenssiä ja eroaa siitä korkeintaan 3, tavallisesti korkeintaan 1 aminohapon suhteen. Tämä ero voi olla aminohapon insertio, aminohapon deletio tai jonkin aminohapon korvautuminen toisella, erityisesti säilyttävä korvautuminen. Poly(aminohapot) sisältävät tavallisesti vähintään 10, tavallisemmin vähintään 12, peräkkäistä aminohappoa, jotka vastaavat kuvassa esitettyjä sekvenssejä ja eroavat siitä korkeintaan yhden aminohapon suhteen.

Tämän keksinnön tarkoituksia varten erilaiset aminohapot jaetaan joukoksi alaryhmiä. Alaryhmät osoitetaan seuraavalla taulukolla:

	alifaattiset	
	neutraalit	
20	polaarittomat	G A P V L I
	polaariset	S T C M N Q
	happamat	D E
	emäksiset	K R
	aromaattiset	F H Y W

Säilyttävällä korvauksella tarkoitetaan sitä että aminohappojen korvaamiseen käytetään saman alaryhmän (ts. joko neutraaleja alifaattisia, happamia alifaattisia, emäksisiä tai aromaattisia), tarkemmin ilmaistuna polaarisuudeltaan samanlaisia aminohappoja. On toivottavaa, että 2 - 4 hiiliatomia tai 5 - 6 hiiliatomia sisältävät aminohapot määräävät monomeerien ryhmittymisen kussakin alifaattisessa alaryhmässä.

Poly(aminohappojen) pituus on korkeintaan noin 1000 aminohappoa. Tavallisesti niissä on vähemmän kuin 100 aminohappoa, tavallisemmin alle 50 aminohappoa. Poly(amino-

happoja) on siten helppo syntetisoida. Kun poly(aminohappojen) pituus ylittää 100 aminohappoa, ne voivat olla onkostatini M -fragmenttien, joista kukin sisältää alle 100 aminohappoa, polymeerejä tai fuusioproteiineja, joissa
5 fragmentti on fuusioituna antigeeniin, entsyymiin, entsyymifragmentteihin jne. Suurehkomolekyylliset poly(aminohapot) voivat erityisesti koostua vähintään yhdestä polypeptidifragmentista, jossa on alle noin 100 aminohappoa ja joka on liitetty kovalenttisesti suureen immunogeeniseen
10 polypeptidikantajaan, jolloin saadaan aikaan immunogeenisyys. Esimerkkejä tällaisista proteiinikantajista ovat naudan seerumialbumiini, tulivuorikotilon hemosyaniini (KLH) tms. Nämä konjugoidut polypeptidit ovat käyttökel-

15 poisia vasta-aineiden indusoimiseen sopivassa isäntäorganismissa.

U937-solut ovat histiosyyttisestä lymfoomasolulinjasta johdettu solulinja [Sundström ja Nilsson, Int. J. Cancer 17 (1976) 565 - 577], joka voidaan indusoida erilaistumaan soluiksi, joilla on makrofagien ominaispiirteitä, käsittelemällä erilaisilla aineilla [Harris et al.,
20 Cancer Res. 45 (1985) 9 - 13]. Onkostatini M:n tuottamiseksi U937-soluja voidaan kasvattaa tavanomaisessa, seerumia sisältävässä ravintoalustassa ja käsitellä asianmukaisella indusoijalla. On kätevää käyttää forboleja tai ingenoleja, erityisesti 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asettaattia (TPA). Tavallisesti voidaan käyttää noin 5 -
25 20 ng/ml indusoijaa. Solujen alkulukumäärä on noin 10^5 - 10^6 solua/ml.

Kun soluja on käsitelty indusoijalla riittävä aika, yleensä 3 - 6 vrk, supernatantti poistetaan, solut pestään seerumittomalla kasvualustalla, pestään kiinnittyneet solut uudelleen seerumittomalla kasvualustalla ja solujen annetaan inkuboitua vähintään 12 tuntia, yleensä korkeintaan noin 48 tuntia, seerumittomassa ravintoalustassa,
35 esimerkiksi RPMI-1640-alustassa. Sitten otetaan talteen supernatantit, ja poistetaan solut sentrifugoimalla. So-

luttomista supernatanteista tutkittiin solujen kasvua es-
tävä aktiivisuus (GIA) kokeellisessa osassa kuvattavalla
tavalla. Supernatantti sisältää noin 50 - 500 GIA-yksik-
kää/ml (GIA-yksikön määritelmä esitetään kokeellisessa
5 osassa).

Onkostatini M:ää voidaan saada myös mitogeenilla
stimuloiduista normaaleista ihmisen ääreisverilymfosyy-
teistä (PBL). PBL:t voidaan eristää leukofraktioista lai-
mentamalla fraktiot ja sentrifugoimalla ne Ficoll-gradien-
10 teilla. Gradientin rajapinnalta talteenotetut solut pes-
tään ja iskuhajoitetaan punaisten verisolujen poistamiseksi.
Jäljelle jääneet solut otetaan talteen liuoksesta sen-
trifugoimalla, suspendoidaan takaisin seerumia ja trombiini-
15 sisältävään puskuriin, sekoitetaan, ja annetaan veri-
hiutaleaggregaatin laskeutua vähän aikaa. Suspendoituneet
solut siirretään pois, otetaan talteen sentrifugoimalla,
suspendoidaan takaisin seerumiin ja siirretään nailonvil-
laa sisältävään kolonniin. Kolonnia inkuboidaan monosyytti-
20 tien ja B-lymfosyyttien kiinnittymisten mahdollistamiseksi
ja pestään sitten. Useimmat ääreisveren T-lymfosyytit ei-
vät kiinnity ja huuhtoutuvat siten pois. Näitä soluja vil-
jeltiin lämpötilassa 37 °C kasvualustassa, esimerkiksi
RPMI-1640-alustassa, ja käsiteltiin asianmukaisella indu-
soijalla, esimerkiksi fytohemagglutiinilla (noin 1 -
25 5 mg/l) noin 100 tuntia, ja sitten otettiin talteen super-
natantit. Supernatantit sentrifugoitiin solujen poistami-
seksi ja konsentroitiin esimerkiksi ultrasuodattamalla tai
dialysoimalla.

Kun soluvapaa supernatantti on eristetty joko U937-
30 soluista tai normaaleista PBL:istä, käsitelty alusta kon-
sentroidaan, kätevästi ontelokuitujärjestelmää tai ultra-
suodatuskalvoa käyttämällä, minkä jälkeen se laimennetaan
etikkahapolla (etikkahappopitoisuuteen 0,1 N), konsentroi-
daan noin 10-kertaiseen pitoisuuteen ja toistetaan laimen-
35 nus ja konsentroidi. Konsentraatti voidaan kylmäkuivata

ja käyttää suoraan, tai kylmäkuivattu tuote voidaan puhdistaa edelleen.

Keksinnön mukainen onkostatiini M voidaan puhdistaa geelipermeaatiokromatografiamenettelyllä käyttämällä vesiliuosta, joka sisältää 40 % asetonitriiliä ja 0,1 % trifluorietikkahappoa, isokraattisena liikkuvana faasina Bio-sil TSK250 -kolonnissa ja seuraamalla kunkin fraktion aktiivisuutta. Puhdistamalla saadaan koostumus, joka sisältää vähintään noin $0,5 - 5 \times 10^4$ GIA-yksikköä/ml aktiivisissa fraktioissa.

Geelipermeaatiokromatografiasta saatu osittain puhdistettu tuote voidaan puhdistaa edelleen käyttämällä RP-HPLC:tä (käänteisfaasikorkeapainenestekromatografiaa), jossa käytetään lineaarista gradienttia, jossa primaariliuottimena on 0,1-%:inen trifluorietikkahappo vedessä ja sekundaarisena liuottimena asetonitriili, joka sisältää 0,1 % trifluorietikkahappoa. Ohjelma voi olla vaihteleva; yleensä kromatografia vie noin 3 - 4 tuntia, suurimman osan ajasta, yli 50 % ja korkeintaan noin 80 % ajasta, sekundaarisen liuottimen osuus on 30 - 45 %; aktiiviset fraktiot eluoituvat näissä olosuhteissa asetonitriilipitoisuuden ollessa noin 41 - 42 %.

Yhdistetyt aktiiviset fraktiot voidaan puhdistaa edelleen toistamalla RP-HPLC muuttaen nopeammin gradienttiolosuhteita ja käyttäen pienempää virtausnopeutta. Näissä olosuhteissa aktiivisuus eluoituu asetonitriilipitoisuuden ollessa noin 40,5 - 41,5 %.

RP-HPLC voidaan sitten toistaa muuttamalla liuotinsysteemi sellaiseksi, että sekundaarisena liuottimena on 0,1 % trifluorietikkahappoa sisältävä n-propanoli. Käytetään lineaarista gradienttia, jossa n-propanolin pitoisuus muuttuu hitaasti 23 %:sta 35 %:iin. Pääosa aktiivisuudesta eluoituu propanolipitoisuudessa 25,5 - 27,5 %, jolloin saadaan suurin piirtein homogeeninen tuote, jonka ominaisaktiivisuus on yli 10 GIA-yksikköä/ng proteiinia. Tuote

puhdistetaan tavallisesti sillä tavalla, että ominaisaktiivisuudeksi saadaan vähintään noin 100 GIA-yksikköä/ng proteiinia, tavallisemmin 150 GIA-yksikköä/ng.

Puhdistetun onkostatiini M:n fragmenttien aminohapposekvenssit analysoitiin. Onkostatiinin aminohapposekvenssit ovat suurin piirtein kuviossa 1 esitetyn kaltaiset. Kuviossa 1 ensimmäinen sekvenssi esittää onkostatiini M:n N-päätä, kun taas muut sekvenssit esittävät polypeptidin sisäisiä fragmentteja. Myöhemmin suoritettussa tarkemmassa analyysissä cDNA-klooneja sekvenssoimalla saadut aminohapposekvenssit, jotka tulivat Suomessa julkisiksi 15. huhtikuuta 1993, eroavat jonkin verran kuvion 1 sekvensseistä, mikä ei ole mitenkään hämmästyttävää, sillä eri menetelmillä saadut sekvenssit usein eroavat toisistaan jonkin verran. cDNA-klooneja sekvenssoimalla saadut aminohapposekvenssit esitetään seuraavassa, jolloin aminohapoista käytetään kolmikirjaimisia lyhenteitä. Kuten kuviossa 1, ensimmäinen sekvenssi valaisee onkostatiini M:n N-päätä, kun taas muut sekvenssit valaisevat polypeptidin sisäisiä fragmentteja.

	1	5	10
	Ala-Ala-Ile-Gly-Ser-Cys-Ser-Lys-Glu-Tyr-Arg-Val-Leu-Leu-		
	15	20	25
25	Gly-Gln-Leu-Gln-Lys-Gln-Thr-Asp-Leu-Met-Gln-Asp-Thr-Ser-		
	30	35	
	Arg-Leu-Leu-Asp-Pro-Tyr-Ile,		
	1	5	10
	Gln-Arg-Leu-Pro-Lys-Ala-Gln-Asp-Leu-Glu-Arg-Ser-Gly-Leu-		
30	15	20	
	Asn-Ile-Glu-Asp-Leu-Glu-Lys		ja
	1	5	10
	Leu-Arg-Glu-His-Cys-Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Ala-Phe-Pro-Ser-		
	15	20	
35	Glu Glu-Thr-Leu-Arg-Gly		

joissa Ala on alaniini, Cys on kysteini, Asp on aspara-
giinihappo, Glu on glutamiinihappo, Gly on glysiini, His
10 on histidiini, Ile on isoleusiini, Lys on lysiini, Leu
on leusiini, Met on metioniini, Asn on asparagiini, Pro on
5 proliini, Gln on glutamiini, Arg on arginiini, Ser on se-
riini, Thr on treoniini, Val on valiini ja Tyr on tyrosii-
ni.

Eristettyä onkostatini M:ää sisältävät aktiiviset
valmisteet sisälsivät seosta, jossa oli runsasmannoosista
10 ja monimutkaista N-sidottua oligosakkaridia. Glykosyloit-
umattomat onkostatini M-valmisteet olivat kuitenkin myös
solujen kasvua säätelevästi vaikuttavia.

Onkostatini M:lle on, kuten aikaisemmin on mainit-
tu, lisäksi luonteenomaista aktiivisuus tiettyjä solukan-
15 toja vastaan. Keksinnön kohteena olevalta polypeptidiltä
puuttuu sytotoksinen vaikutus WI26- ja WI38-ihmisfibro-
blasteja, tuumorin nektroositekijälle herkkiä hiiren L929-
soluja ja γ -interferonille herkkää ihmisen kasvainsolu-
linjaa vastaan. On myös havaittu, ettei se estä normaalien
20 ihmisen T-lymfosyyttien proliferaatiota eikä granulosityt-
ti/myelosyyttipesäkkeiden muodostumista luuydinsoluista
pitoisuuksiin 100 GIA-yksikköä/ml asti. Onkostatini M
stimuloi lisäksi normaalien ihmisen fibroblastien, joista
esimerkkeinä ovat WI38- ja WI26-solut, proliferaatiota ja
25 estää kasvainsolujen, kuten A375-, HBT10-, A549- ja SK-
MEL28-solujen, proliferaatiota ja saattaa edistää pesäk-
keitä muodostavien solujen kasvua normaalista luuytimestä.
Onkostatini M ei vaimentanut ihmisen proliferatiivisten
tai sytotoksisten T-solujen reaktioita leukosyyttiseosvil-
30 jelmäreaktioissa (MLC) pitoisuuksina 500 GIA-yksikköä/ml.

Keksinnön mukaisen polypeptidin aminohapposekvenssi
voidaan määrittää kokonaan käyttämällä myynnissä olevia
sekvenssoijia. Polypeptidi voidaan sitten syntetisoida tun-
netuin menetelmin, käyttämällä samoin myynnissä olevia
35 automaattisia syntetisointilaitteita.

- Keksinnön mukainen polypeptidi voitaisiin vaihtoehtoisesti valmistaa yhdistelmä-DNA-menetelmin. Osittaisesta aminohapposekvenssistä voidaan päätellä koettimia, joita voidaan sitten käyttää ihmisgenomikirjaston seulomiseen.
- 5 Kirjasto voi olla cDNA- tai kromosomikirjasto. Kun koettimen kanssa pariutuvat yksi tai useampi kloon on identifioitu, voidaan kiinnostuksen kohteena olevan geenin sisältävät fragmentit identifioida erilaisin tavoin ja niitä voidaan käsitellä lukuisin tavoin. Fragmentin kokoa voidaan pienentää endonukleasipilkonnalla ja kloonata tuloksena olevat fragmentit ja tutkia niistä halutun geenin läsnäolo. Soluja, jotka tuottavat haluttua peptidiä tai tuottavat sitä kohonneina määrinä, voidaan käyttää mRNA:n tuotantoon. mRNA:sta voidaan valmistaa yksisäikeinen cDNA.
- 10 Tämä cDNA voidaan sitten pariuttaa kokonais-mRNA:n kanssa, joka on peräisin solusta, joka tuottaa vähän, mikäli ol- lenkaan, polypeptidiä. Pariutumaton cDNA voidaan sitten eristää ja käyttää kaksisäikeisen cDNA:n valmistukseen, joka voidaan tutkia koettimien avulla.
- 15 DNA-fragmentit voidaan vaihtoehtoisesti insertoida λ gt11:een, niin että koodaavat fragmentit voivat olla β -galaktosidaasigeenin perässä ja samassa kehyksessä sen kanssa. Onkostatini M-polypeptidille voidaan valmistaa vasta-aineita ja käyttää niitä tuloksena olevien fuusioi- tujen proteiinien ristireaktiivisuuden tutkimiseen. Tällä tavalla voidaan keksinnön mukaista polypeptidiä tai sen fragmenttia koodaavia fragmentteja tunnistaa ja käyttää halutun geenin identifisointiin.
- 25 Kun koko geeni on identifioitu, joko cDNA:na tai kromosomi-DNA:na, sitä voidaan käsitellä eri tavoin ilmen- tymisen aikaansaamiseksi. Kun geeni on määrä saattaa il- mentymään isännässä, joka on tunnistanut villiä tyyppiä olevat onkostatini M:n kopiointia ja luentaa säätelevät alueet, voidaan koko geeni villin tyypin 5'- ja 3'-säate- lyalueineen viedä sopivaan ilmentymisvektoriin. On ole-
- 30
- 35

massa erilaisia ilmentymisvektoreita, jotka käyttävät nisäkkäiden virusten, kuten Simianvirus 40:n, adenoviruksen, naudan papilloomaviruksen, vaksiniaviruksen, hyönteisten bakuloviruksen jne., replikoitumisjärjestelmiä. Näitä replikoitumisjärjestelmiä on kehitetty, jotta saataisiin markkereita, jotka mahdollistavat transfektanttien valikoinnin samoin kuin kätevien restriktiokohtien, joihin geeni voidaan lisätä, aikaansaannin.

Kun geeni on määrä saattaa ilmentymään isännässä, joka ei tunnista luonnossa esiintyviä villin tyypin kopioita ja luentaa sääteleviä alueita, tarvitaan lisäkäsitelyä. Tunnetaan erilaisia käteviä 3'-pään kopioinnin säätelyalueita, joita voidaan sijoittaa lopetuskodonien jälkeen. Koodaamaton 5'-pään alue voidaan poistaa rakennegeenin edeltä endonukleaasirestriktiolla, Bal31-resekoinnilla tms. Kun rakennegeenin 5'-pään lähellä on kätevä restriktiokohta, voidaan vaihtoehtoisesti irrottaa rakennegeeni ja käyttää adaptoria rakennegeenin kytkemiseksi promootorialueeseen, jolloin adaptor tuo mukanaan rakennegeenin menetetyt nukleotidit. Voidaan käyttää erilaisia strategioita ilmentymisvektorin aikaansaamiseksi, jossa on kopiointisuunnassa 5':stä 3':een kopioinnin ja luennan aloitusalue, johon voi sisältyä myös säätelysekvenssejä, jotka mahdollistavat säätelyn induktion, rakennegeeni, jonka luenta ja kopiointi on initiaatioalueen ohjauksessa, ja kopioinnin ja luennan lopetusalue.

Tyypillisiin kopioinnin aloitusalueisiin tai promootoreihin kuuluvat β -gal-promoottori, TAC-promoottori, lambdafaagin vasen ja oikea promoottori jne. bakteereja varten; glykolyyttisten entsyymien promoottorit, kuten ADH-I ja -II-promoottorit, GPK-promoottori, PGI-promoottori, TRP-promoottori jne. hiivoja varten; SV40:n varhainen ja myöhäinen promoottori, adenoviruksen myöhäinen pääpromoottori jne. nisäkässoluja varten. Kuten jo mainittiin, ilmentymisyksikkö voidaan sisällyttää replikoitumis-

järjestelmään episomin ylläpitämiseksi sopivassa soluisännässä, tai se voi olla ilman replikoitumisjärjestelmää, jolloin se voi integroitua isännän genomiin. DNA voidaan tuoda isäntään tunnetuin menetelmin, kuten transformatiolla, jossa käytetään kalsiumfosfaatilla saostettua DNA:ta, transfektiolla, jossa solut saatetaan kosketukseen viruksen kanssa, mikroinjektoimalla DNA soluihin tms. tavalla.

Kun rakennegeeni on viety sopivaan isäntään, isäntää voidaan viljellä, ja saada aikaan rakennegeenin ilmentyminen. Joissakin tapauksissa voi olla toivottavaa sijoittaa signaalisekvenssi (erittymisesijakso) rakennegeenin edelle ja samaan lukukehykseen sen kanssa, joka sekvenssi saa aikaan rakennegeenin erittymisen ja erittymisesijakson irtoamisen, niin että saadaan aikaan valmiin polypeptidin erittyminen supernatanttiin. Ellei aiheuteta erittymistä, isäntäsolut voidaan kerätä talteen, hajottaa tavanomaisella tavalla ja puhdistaa tavanomaisin menetelmin, kuten kromatografisesti, elektroforeettisesti, liuotinuutolla tms. tavalla.

Keksinnön mukaista polypeptidiä voidaan käyttää hyvin monella tavalla in vitro. Keksinnön mukaista polypeptidiä voidaan käyttää vasta-aineidensa valmistukseen, jotka myös ovat esillä olevan keksinnön kohteena. Vasta-aineita voidaan valmistaa tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi käyttämällä keksinnön mukaista polypeptidiä immuunigeeninä ja injektoimalla sitä nisäkäsistä, esimerkiksi hiireen, lehmään, vuoheen, lampaaseen, kaniin jne., erityisesti apuaineen, esimerkiksi täydellisen Freundin apuaineen, alumiinihydroksidigeelin tms., kanssa. Isännästä voidaan sitten ottaa verta ja käyttää se polyklonaalisten vasta-aineiden eristämiseen tai hiiren ollessa kyseessä, fuusioida ääreisveren lymfosyytit tai pernan lymfosyytit (B-solut) sopivan myeloomasolun kanssa kromosomien tekemiseksi kuolemattomiksi keksinnön mukaiselle polypeptidille

spesifisten monokloonaalisten vasta-aineiden tuottamiseksi.

5 Voidaan valmistaa joko polyklonaalisia tai monoklonaalisia vasta-aineita, joita voidaan sitten käyttää diagnosointiin in vitro tai kyseessä olevan polypeptidin detektointiin näytteestä, kuten soluista tai fysiologisesta nesteestä, kuten verestä. Vasta-aineita voidaan käyttää myös affiniteettikromatografiassa esillä olevan polypeptidin puhdistamiseksi ja sen eristämiseksi luonnon tai syn-

10 teettisestä lähteestä. Vasta-aineita voidaan käyttää myös säätämään soluihin liittyvän kyseessä olevan polypeptidin määrää viljelmässä.

Keksinnön mukaista polypeptidiä voidaan käyttää li-

15 gandina tämän yhdisteen reseptorien läsnäolon havaitsemiseen. Tällä tavalla reseptorit voidaan erottaa toisistaan polypeptidin reseptorien läsnäolon ja niiden tiheyden suhteen seuraamalla erilaisten yhdisteiden vaikutusta tällaisten reseptorien läsnäoloon.

Keksinnön mukaista polypeptidiä voidaan käyttää in

20 vitro -viljelmissä estämään tällä polypeptidille herkkien solujen tai solulinjojen, jotka reagoivat eri tavalla kuin epäherkät solut, kasvua. Heterogeenisista soluseoksista tai solulinjoista voidaan tällä tavalla poistaa epätoivottavat solut, kun epätoivottavat solut ovat herkkiä keksinnön mukaiselle polypeptidille.

Seuraavat esimerkit annetaan keksinnön valaisemiseksi eikä niillä ole tarkoitus rajoittaa sitä.

Kokeellinen osa

Materiaalit ja menetelmät

30 U937-soluista eristetty onkostiini M: kasvainsolujen kasvun inhibiittorin tuottaminen histiolyyttisestä lymfoomasolulinjasta

U937-soluja, histiolyyttistä lymfoomasolulinjaa [Sundström ja Nilsson, Int. J. Cancer 17 (1976) 565 - 577]

35 viljeltiin 850 cm²:n pyörityspulloissa (Corning C2540) pi-

toisuuteena 4×10^5 solua/ml kaikkiaan 300 ml:ssa RPMI 1640 -alustaa, joka oli täydennetty 10 %:lla naudan sikiöseerumia (FCS), penisilliini/streptomysiinillä (PS), L-glutaamiinilla ja 12-0-tetradekanoyyliforboli-13-asetaatilla (TPA, 10 ng/ml). Neljän vuorokauden kuluttua FCS:ää ja TPA:ta sisältävät supernatantit poistettiin, pyörityspul-
lot pestiin viidesti seerumittomalla RPMI 1640:llä, ja irronneet solut (1×10^5 solua/ml) pestiin kolmesti seerumittomalla alustalla ja lisättiin takaisin pulloihin, jolloin lopputilavuudeksi tuli 125 ml seerumitonta RPMI 1640 -alustaa pyörityspulloa kohden. Vuorokauden kuluttua otettiin talteen supernatantit, sentrifugoitiin ne solujen poistamiseksi, suodatettiin 0,45 μ m:n Nalgene-suodattimen läpi ja konsentroitiin käyttämällä ontelokuitujärjestelmää (Amicon-patruuna HIP10-20), jolloin lopputilavuudeksi tuli 150 ml (alkutilavuus 1500 ml). Onkostatiini M:ää eristettiin myös 150 cm^2 :n kudosisiljelypulloissa olevien, seerumittomalla TPA:lla käsiteltyjen U937-solujen supernatanteista. Supernatantti konsentroitiin Amicon Diaflo -kalvolla PM-10 (läpäisyraja 10 kD) ja dialysoitiin. Dialyysin jälkeen konsentraatti laimennettiin etikkahapolla siten, että tuloksena oli etikkahappopitoisuus 0,1 N 500 ml:n tilavuudessa, ja konsentroitiin Amicon PM 10 -suodatinta käyttämällä 50 ml:ksi. Tämä konsentraatti (50 ml) laimennettiin 400 ml:ksi 0,1 N etikkahapolla ja konsentroitiin 40 ml:ksi samalla suodattimella. Konsentraatti laimennettiin 1 N etikkahapolla, ja syntyvä sakka poistettiin sentrifugoimalla. Saatu konsentraatti pakastettiin ja kylmäkuivattiin. Kylmäkuivattua materiaalia käytettiin puhdistusvaiheisiin.

Geelipermeaatiokromatografia

Bio-sil TSK-250 -kolonnin (600 x 21,5 mm) (BioRad) liitettiin suurpainenestekromatografiajärjestelmään. Raakafraktio (10 mg/ml) liuotettiin vesiliuokseen, joka sisälsi 40 % asetonitriiliä ja 0,1 % trifluorietikkahappoa

(0,1-%:inen TFA). Injektoitiin 2 ml:n annos seosta, ja eluoitiin isokraattisesti käyttäen liikkuvana faasina liuosta, joka sisälsi 40 % asetonitriiliä ja 0,1 % TFA:ta vedessä. Virtausnopeus oli 2,5 ml/min ja piirturipaperin liikkumisnopeus 0,25 cm/min. Kerättiin 5 ml:n fraktioita. Kromatografia tehtiin huoneen lämpötilassa. Kustakin fraktiosta otettu näyte haihdutettiin ja siitä tutkittiin kolmena rinnakkaismäärityksenä A375-solujen kasvua estävä aktiivisuus (GIA, growth inhibitory activity).

Kuudesta ajosta saadut aktiiviset fraktiot (21 ja 22) yhdistettiin. Yhdistetty materiaali sisälsi kaikkiaan noin $4,8 \times 10^5$ GIA-yksikköä. Tekijän näennäisen molekyylipainon havaittiin olevan 18 kD määritettynä koon mukaan erottelevalla kromatografialla (Bio-sil TSK-250 -kolonni).

TSK-250-fraktioiden RP-HPLC (käänteisfaasisuurpainekromatografia)

Edellä kuvatut yhdistetyt TSK-250-fraktiot 21 ja 22 laimennettiin kaksinkertaiseen tilavuuteen 0,1-%:isella TFA:lla. Tämä seos injektoitiin isokraattisesti μ -Bondapak-C18-kolonnille (7,8 x 300 mm) (josta käytetään nimitystä C18¹) huoneen lämpötilassa. Virtausnopeus säädettiin arvoon 2,0 ml/min ja piirturin nopeus oli 0,25 cm/min. Käytettiin lineaarista gradienttia primaariliuottimesta (0,1 % TFA:ta) sekundaariseen liuottimeen (asetonitriili, 0,1 % TFA:ta). Gradienttiolosuhteet olivat 0 → 30 % 10 min:ssa, sitten 30 → 45 % 150 min:ssa; 45 → 55 % 20 min:ssa, ja 55 → 100 % 10 min:ssa. Kaikki liuottimet olivat HPLC-laatua. Kerättiin 4 ml:n fraktioita, ja kustakin fraktiosta otetusta näytteestä tutkittiin kasvua estävä aktiivisuus. Fraktioiden 72 - 75 havaittiin sisältävän pääosan aktiivisuudesta. Aktiiviset fraktiot eluoituivat asetonitriilipitoisuuden ollessa 41 - 52 %.

Fraktiot 72 - 75 yhdistettiin. Yhdistettyihin fraktioihin lisättiin 16 ml 0,1-%:ista TFA:ta. Seos injektoitiin μ -Bondapak-C18-kolonniin (3,9 x 300 mm) (josta käy-

tään nimitystä C18²) huoneen lämpötilassa. Virtausnopeus säädettiin arvoon 1 ml/min, ja piirturin nopeus oli 0,25 cm/min. Gradienttiolosuhteet olivat 0 → 35 % 10 min:ssa; 35 → 45 % 100 min:ssa; ja 45 → 100 % 10 min:ssa. Kerättiin fraktiot, otettiin niistä näytteet, ja tutkittiin näytteistä GIA. Suurin osa aktiivisuudesta eluoitui kolonnista asetonitriilipitoisuuden ollessa 40,7 - 41,3 % (retentioaika 83 - 86 min).

- 5 Aktiiviset fraktiot yhdistettiin, laimennettiin
- 10 kaksinkertaiseen tilavuuteen 0,1-%:isella TFA:lla ja injektointiin isokraattisesti μ -Bondapak-C18-kolonnille (3,9 x 300 mm) (josta käytetään nimitystä C18³) huoneen lämpötilassa. Virtausnopeus oli 1 ml/min ja piirturipaperin nopeus 0,25 cm/min. Käytettiin lineaarista gradienttia
- 15 primaariliuottimessa (0,1-%:inen TFA) sekundaariseen liuottimeen (n-propanoli, 0,1 % TFA:ta). Gradienttiolosuhteet olivat 0 → 23 % 20 min:ssa ja 23 → 120 min:ssa. Kerättiin fraktiot ja tutkittiin kustakin fraktiosta otetusta näytteestä GIA. Suurin osa aktiivisuudesta eluoitui
- 20 propanolipitoisuuden ollessa 25 - 26,5 % (retentioaika 59 min). Tämä ilmeisesti homogeeninen fraktio sisälsi noin 300 ng proteiinia ja noin 40 000 GIA-yksikköä.

Määrittäminen, jossa tutkitaan solujen kasvun säätelyä käyttämällä ³H-tymidiinin sisällyttämistä DNA:han (GIA)

- 25 Kokeet tehtiin levyillä, joissa oli 96 tasapohjaista kuoppaa (Costar 3596). Herkkänä indikaattorisolulinjana käytettiin ihmisen melanoomasoluja (A375). Kuhunkin kuoppaan laitettiin soluja (3×10^3) 1,1 ml:ssa Dulbeccon muunnattua Eagles-alustaa (DMEM), joka oli täydennetty
- 30 10 %:lla FCS:ää ja PS:llä. Kolmen tunnin kuluttua lisättiin kuhunkin kuoppaan 0,1 ml tutkittavaa näytettä. Levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa 3 vrk. Sitten kuhunkin kuoppaan lisättiin 0,025 ml (0,5 μ Ci) ³H-tymidiiniliuosta (ominaisaktiivisuus 27 μ Ci/ μ g) ja inkuboitiin vielä 6 tuntia. Solut
- 35 siirrettiin sitten lasisuodatinliuskoille käyttämällä monikuoppakerääjää (PHD Cell Harvester, Cambridge Technology,

Inc). Suodattimet siirrettiin tuikelaskentapulloihin, joihin lisättiin 2 ml tuikelaskentaliuosta (ScientiVerse II, Fisher Scientific Co.), ja tehtiin sitten tuikelaskenta ^3H -tymidiinin sisällytyksen määrittämiseksi kvantitatiivisesti.

Pehmytagarilla tehtävä pesäkkeiden eston määrittäminen (TGI)

0,5 ml:n pohjakerros, joka sisälsi 0,5 % agaria (Agar Noble; Difco Laboratories, Detroit, Michigan) DMEM:ssä, joka sisälsi 10 % naudan sikiöseerumia (FCS), lisättiin 24-kuoppaisille Costar-kudosviljelylevyille. Agarpohjakerroksen päälle levitettiin 0,5 ml samaa alustaa-FCS-seosta, joka sisälsi 0,3 % agaria, $1 - 2,5 \times 10^3$ A375solua ja tutkittavaa tekijää erilaisina pitoisuuksina. Levyjä inkuboitiin 37°C :n lämpötilassa kostutetussa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 % CO_2 ilmassa, ja lisättiin 7 vrk:n kuluttua vielä 0,5 ml samaan alustaan tehtyä 0,3-%:ista agaria, jossa tekijän pitoisuus oli sama. Pesäkkeet laskettiin kiinnittämättöminä ja värjäämättöminä ja laskennassa otettiin huomioon pesäkkeet, jotka päivien 7 ja 14 välissä sisälsivät yli 6 solua.

Tulokset

U937-soluista eristetyn onkostiini M:n sekvenssit

Onkostiini M:n N-terminaalinen sekvenssi ja sisäiset fragmentit määritettiin tekemällä mikrosekvenssi-analyysi pelkistetystä ja S-pyridiinietyloidusta polypeptistä ja peptideistä, jotka saatiin pilkkomalla pelkistetty ja S-pyridiinietyloitu onkostiini M entsyymaattisesti endoproteinaasilla Lys-C ja Staphylococcus aureus V8 -proteinaasilla. Peptidifragmentti puhdistettiin RP-HPLC:llä käyttäen haihtuvia liuottimia. Peptideille tehtiin automaattinen toistuva Edman-hajotus Model 470A -proteiinisekvenssaattorissa (Applied Biosystems, Inc.). Fenyyliitiohydantoiiniaminohapot analysoitiin RP-HPLC:llä (Applied Biosystems, Inc.) käyttämällä PTH-C18 -kolonnia ($2,1 \times$

220 mm, ABI) ja eluoitiin käyttäen natriumasetaattipuskuri-tetrahydrofuraani-asetonitriiligradienttia.

Tuloksena olevat aminohapposekvenssit ovat suurin piirtein kuviossa 1 esitetyn kaltaiset.

- 5 Verrattaessa näitä sekvenssejä ajan tasalla olevaan proteiinitietokantaan (PIR Release 9,0, toukokuu 1986) talletettuihin sekvensseihin ei havaittu merkittävää sekvenssihomologiaa minkään tunnetun sekvenssin kanssa. Homologiaa ei ole myöskään tuumorin nekroositekijän, lymfotoksiinin, pesäkkeitä stimuloivan tekijän, interleukiini 1:n eikä 2:n eikä β -transformoivan kasvutekijän kanssa.

Kasvainsolujen proliferaation esto ja ihmisen normaalifibroblastien proliferaation stimulointi

- 15 Käyttämällä edellä kuvattua pehmytagarpesäkeinhibitiokoetta saatiin seuraavia tuloksia:

Taulukko 1

U937-soluista eristetyt, puhdistetun onkostatini M:n aikaansaama A375-melanoomasolujen pesäkkeenmuodostuksen esto*

20	GIA-yksikköä/ kuoppa	Pesäkkeiden lukumäärä	Pesäkkeen muodostuk- sen esto (%)
	250	4	96
	83	6	94
	27	11	89
25	45	32	69
	0	106	-

- 30 *A375-solut siirrostettiin edellä kuvatulla tavalla pehmytagariin tekijän kera tai sitä ilman lopputilavuuden ollessa 2 ml. Käytetty faktori oli C18-propanolikolonnista saatu fraktio, jossa kasvainten kasvua estävä aktiivisuus (GIA) oli korkeimmillaan. Pesäkkeiden lukumäärä laskettiin 11 vrk:n kuluttua. Pesäkkeeksi määriteltiin vähintään 6 solua sisältävä rykelmä. Yksi GIA-yksikkö määriteltiin
- 35 siksi määräksi, joka aiheuttaa ^3H -tymidiinin sisällytyk-

sen mikrokuopassa oleviin A375-soluihin 50-%:isen eston edellä kuvatussa kokeessa.

Seuraavassa kokeessa määriteltiin erilaisten, joko kemiallisten tai fysikaalisten, käsittelyjen vaikutus kyseessä olevaan polypeptidiin. Tulokset annetaan seuraavassa taulukossa.

Taulukko 2

TPA-indusoitujen U937-solujen supernatanttien erilaisten käsittelyjen vaikutus kasvainten kasvua estävään aktiivisuuteen*

Supernatantin lopullinen laimennussuhde				
	1:4	1:8	1:16	
Alusta, vertailunäyte	-	-	-	39,780
Käsittelemätön supern.	7,206**	13,896	16,000	
15 1 N etikkahappo	6,670	17,073	18,783	
1 N NH ₄ OH	6,956	15,016	13,923	

*U937-soluja käsiteltiin TPA:lla (10 ng/ml) 3 vrk, sitten solut pestiin alustalla, inkuboitiin 24 tuntia serumittomassa alustassa ja supernatantit otettiin talteen. Supernatantit käsiteltiin 1 N etikkahapolla tai 1 N ammoniumhydroksidilla (NH₄OH). Ne dialysoitiin alustaa vastaan ja tutkittiin niiden kyky estää ³H-tymidiinin sisällytys A375-soluihin. A375-soluja leimattiin ³H-tymidiinillä (³H-TdR) viimeiset 6 tuntia 3 vrk:n inkubointiajasta.

** Tulokset esittävät ³H-TdR:n sisällytystä pulsseina minuutissa.

Edellä esitetyt tulokset osoittavat, ettei dialysoidussa supernatantissa oleva onkostatini M juurikaan inaktivoidu 1 N etikkahapon eikä 1 N ammoniumhydroksidin vaikutuksesta. Keksinnön mukaiset yhdisteet ovat siten suhteellisen epäherkkiä sekä kohtalaisen vahvalle hapolle että kohtalaisen vahvalle emäkselle. Keksinnön mukainen yhdiste kestää 1 tunnin lämpökäsittelyn 56 °C:ssa, muttei 30 min:n käsittelyä 90 °C:ssa.

Tutkittiin myös keksinnön mukaisen yhdisteen lämpö-stabiilisuus ja havaittiin, että yhdisteen aktiivisuus säilyi pidettäessä sitä 1 tunti 56 °C:ssa, mutta hävisi suurin piirtein kokonaan pidettäessä sitä 30 min 90 °C:ssa.

Seuraavassa kokeessa tutkittiin keksinnön mukaisten polypeptidien kykyä estää erilaisten kasvainsolulinjoja replikoitumista. Tulokset esitetään seuraavassa taulukossa.

Taulukko 3

Kasvainsolujen replikoitumisen estyminen U937-soluista saadun, puhdistetun onkostiini M:n vaikutuksesta

30-%:isen inhibition aiheuttava GIA-yksikkömäärä

<u>Kasvainsolut</u>	<u>³H-TdR:n otto soluihin</u>
15 A549 (keuhkosityöpä)	21
HTB10 (neuroblastooma)	81
A375 (melanooma)	0,3

Kasvainsolut siirrostettiin mikrokuoppiin 3 tuntia ennen RP-HPLC:llä edellä kuvatulla tavalla puhdistetun onkostiini M:n lisäämistä erilaisissa suhteissa laimennettuna. Viimeisten 6 tunnin ajan 3 vrk:n inkuboinnista soluja, jotka olivat 0,2 ml:ssa alustaa, leimattiin ³H-tymidiinillä (³H-TdR) (0,5 µCi/kuoppa). Yksi yksikkö kasvainten kasvua estävää aktiivisuutta (GIA) määriteltiin taulukon 1 selityksessä määräksi, joka vähentää 50 %:lla ³H-TdR:n sisällytystä A375-melanoomasoluihin. Yhden yksikön määritettiin olevan noin 10 pg puhdistettua proteiinia; siten pitoisuus (ng/ml), joka aiheuttaa 30-%:isen inhibition ³H-TdR:n sisällytyksessä A549-, HTB10- ja A375-soluihin oli noin 1,4, 4,0 ja vastaavasti 0,015 ng/ml. U937-tekijä ei vähentänyt ³H-TdR:n sisällytystä ihmisen normaaleihin WI16-fibroblasteihin missään kokeessa.

Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että onkostiini M:n kyky estää replikoitumista on selektiivinen;

vaikutus vaihtelee suuresti solun luonteen mukaan. Keksinnön mukainen yhdiste on tehokas melanoomasoluja, kuten A375-melanoomasoluja, suomukeuhkosyöpäsoluja, kuten A549-soluja, ja neuroblastoomasoluja, kuten HTB10-soluja, vastaan.

Kasvainsoluja siirrostettiin tiheydeksi 3×10^3 solua/kuoppa ja normaaleja fibroblasteja tiheydeksi $1,5 \times 10^3$ solua/kuoppa 96-kuoppaisille levyille 3 tunnin ajaksi. Lisättiin puhdistettua onkostatini M:ää, joka saatiin C18³-kolonnin siitä fraktiosta, jossa oli suurin antiproliferatiivinen aktiivisuus A375-soluja vastaan, erilaisina pitoisuuksina, ja mitattiin kolmesta rinnakkaisesta kuopasta ³H-tymidiinin sisällytys kussakin pitoisuudessa. Tulokset esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4

Kasvainsolujen proliferaation estyminen ja normaalien fibroblastien proliferaation edistyminen onkostatini M:n vaikutuksesta

		GIA-yksikköä/ kuoppa	inhibitio (%)		stimulaatio (%)
			A375		WI38
	Koe 1	16	83		25
		4	62		30
		1	46		46
			A375	HTB10	WI26
	Koe 2	27	NT	28	46
		9	87	22	36
		3	76	11	52
			A375	A549	
	Koe 3	75	89	30	
		25	85	22	
		8	71	16	
			A375	SK-MEL28	
	Koe 4	20	87	44	
		5	75	25	
		1	59	11	

Tulokset osoittavat ³H-tymidiinin sisällytyksen kasvainsoluihin (A375, HTB10, A549 ja SK-MEL28) ja normaaleihin fibroblasteihin (WI26 ja WI38) inhibition (%) ja

vastaavasti stimulaation (%). Yksi GIA-yksikkö määritellään taulukon 1 selityksessä siksi määräksi onkostatini M:ää, joka aiheuttaa ^3H -tymidiinin sisällytyksen A375-soluihin estymisen 50 %:lla.

5 Sen lisäksi, että vaikutus ^3H -tymidiinin sisällytykseen kasvainsoluihin on erilainen kuin ihmisen normaaleihin fibroblasteihin, havaitaan myös erilainen vaikutus morfologiaan ja solulukumäärään, kun näitä kahta solutyyppejä on käsitelty 3 vrk onkostatini M:llä, kuten kuvioista 10 2 ilmenee.

Käytetty onkostatini M saatiin HPLC- C_{18}^3 -kolonnin siitä fraktiosta, jossa A375-solujen proliferaatiota estävä aktiivisuus oli suurimmillaan. Kuvio 2 on sarja mikroskooppivalokuvia A375-melanoomasoluista, jotka olivat 15 käsittelemättömiä (A), joita oli käsitelty 5 GIA-yksiköllä (kasvua estävä aktiivisuus -yksiköllä) onkostatini M:ää (B) ja joita oli käsitelty 100 yksiköllä (C), sekä mikroskooppivalokuvia WI38-fibroblasteista, jotka olivat 20 käsittelemättömiä (D), käsiteltyjä 5 GIA-yksiköllä (E) tai 100 yksiköllä (F). Solut värjättiin 0,5-%:isella kristallivioletin metanoliliuoksella. Suurenus on 63-kertainen.

Onkostatini M:n NaDodSO₄/PAGE

Puhdistetun onkostatini M:n, jolle tehtiin NaDodSO₄, pelkistävässä olosuhteissa, näennäisen molekyylipainon 25 havaittiin olevan noin 28 kD, kuten kuvioista 3 ilmenee. Standardeina (kaista A) käytettiin seuraavia proteiineja: ovalbumiini, $M_p = 43$ kD; kymotrypsinogeeni α , $M_p = 25,7$ kD; laktoglobuliini B, $M_p = 18,4$ kD; lysotsyymi, $M_p = 14,2$ kD, naudan trypsiinin inhibiittori $M_p = 6,2$ kD; insuliinin A- ja B-ketju, $M_p = 2,3$ kD ja vastaavasti 3,4 kD. 30 onkostatini M laitettiin kaistalle B.

Onkostatini M:n, jolle tehtiin PAGE pelkistämättömissä olosuhteissa, näennäinen molekyylipaino oli myös 28 kD, ja proteiinin, joka elektroeloitui vyöhykkeestä, 35 havaittiin estävän A375-solujen proliferaatiota.

Synteettisen onkostatini M-peptidin vasta-aine reagoi ¹²⁵I-leimatun onkostatini M:n kanssa radioimmuunisaostuksissa

5 a) Peptidisynteesi: Peptidi vastaa onkostatini M-proteiinin ryhmiä 6 - 19, ja se syntetisoitiin kiinteäfaasimenetelmällä automaattisella Beckman-laitteella kirjallisuudessa kuvatulla tavalla [Gentry et al., J. Biol. Chem. 258 (1983) 11219]. Peptidi irrotettiin hartsista käyttämällä "matala-korkea"-HF-menettelyä [Tam et al., J. Amer. Chem. Soc. 105 (1983) 6442-6445].

10 b) Vasta-aineiden tuotanto: Peptidi liitettiin nautan gammaglobuliiniin kirjallisuudessa kuvatulla tavalla [Gentry ja Lawton, Virology 152 (1985) 421 - 431]. Valkeille New Zealand-kaniineille annettiin peptidiä perusanoksena ja viitenä tehosteannoksena 4 kohtaan ihonalaisesti kirjallisuudessa kuvatulla tavalla [Gentry ja Lawton, Virology 152 (1986) 421 - 431]. Antiseerumit otettiin 2 viikon kuluttua viidennestä tehoste-annoksesta.

20 c) Onkostatini M:n jodaus: Näyte osittain puhdistettua onkostatini M:ää radioleimattiin jodi-125:llä käyttämällä julkaistuja menettelyjä [Linsley et al., PNAS 82 (1985) 356 - 360]. Annos leimattua preparaattia, joka sisälsi 100 000 pulssia/min, sekoitettiin kaniinin anti-seerumiin, joka oli muodostunut onkostatini M:n 17 N-terminaalista aminohappoa vastaan (lopullinen laimennussuhde 1:20), N-terminaalisen peptidin (onkostatini M:n 17 N-terminaalista aminohappoa, 2 µg) läsnä tai poissa ollessa, ja tehtiin immuunisaostusanalyysi kirjallisuudessa kuvatulla tavalla [Linsley et al., Biochemistry 25 (1986) 2978 - 2986].

30 Tarkemmin ilmaistuna yhtä putkea, joka sisältää 5 µl näytettä, esi-inkuboitiin 2 µg:n kanssa N-terminaalista peptidiä 10 ml:ssa TNEN-liuosta (20 mM Tris, pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,05 % Nonidet P-40:ä), joka sisälsi 0,1 % BSA, 30 min 4 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin

35

¹²⁵I-onkostatiini M 85 µl:ssa TNEN-liuosta, joka sisälsi 0,1 % BSA ja 40 mmol/l ditiotreitolia (DTT). Seitsemää putkea, jotka sisälsivät 5 µl antiseerumia, inkuboitiin ¹²⁵I-onkostatiini M:n kanssa, joka oli 85 µl:ssa TNEN-liuosta, joka sisälsi 0,1 % BSA ja 40 mmol/l DDT, 30 min 4 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 50 µl 10-%:isella formaliinilla kiinnitettyä *Staphylococcus aureus* (Pansorbin, Calbio-chem).

Kun oli inkuboitu vielä 30 min 4 °C:ssa, putket sentrifugoitiin mikrosentrifugissa, ja pelletit pestiin neljästi 1 ml:lla TNEN-liuosta, minkä jälkeen tehtiin PAGE-analyysi. Havaittiin diffuusivyöhyke, joka vastasi Mp 32 kD, immuunisakkojen SDS/PAGE-analyysin jälkeen. Tämän vyöhykkeen saostumista esti ylimäärä leimaamatonta peptidiä, joka vastasi onkostatiini M:n 17 N-terminaalista aminohappoa, mikä osoittaa, että saostuminen oli spesifinen tämän peptidin suhteen.

Onkostatiini M:n hiilihydraattikoostumusta tutkittiin testaamalla glykosidaasiherkkyys. Edellä kohdassa c) kuvatulla tavalla valmistetut immuunisakat käsiteltiin puskurilla, endoglykosidaasi H:lla tai neutramidaasilla Linsleyn et al. (1986) kuvaamalla tavalla. Käsittely endoglykosidaasi H:lla, N-kytkeytyneille, paljon mannoosia sisältäville oligosakkarideille spesifisellä entsyymillä, johti pienimolekyyliemmän vyöhykkeen (Mp = 24 kD) ilmaantumiseen. Vain osa radioleimatusta materiaalista oli herkkää tälle entsyymille, mikä osoittaa, etteivät kaikki molekyylit sisältäneet runsasmannoosisia oligosakkarideja. Käsittely neutramidaasilla johti yhden vyöhykkeen (Mp = 27 kD) ilmaantumiseen, mikä osoittaa, että käsittelemättömän ¹²⁵I-leimatun onkostatiini M:n koon heterogeenisyys aiheutui heterogeenisyydestä glykoproteiiniytimen sialyloitumisessa. Tulokset osoittivat, että aktiiviset onkostatiini M-valmisteet sisälsivät runsasmannoosisten ja monimutkaisten N-sidottujen oligosakkaridisivuketjujen seoksen.

Ihmisen normaaleista ääreisverilymfosyyteistä (PBL) eristetty onkostatini M

Kasvainsolujen kasvun estäjän tuottaminen PBL:istä

Veripankista saadut PBL:iä sisältävät leukofraktiot
 5 laimennettiin suhteessa 1:1 fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella, 10 ml liuosta, joka sisälsi 9 % Ficollia ja 20 til-% 50-%:ista natriumdiatritsoaattia (lopullinen ominaispaino 1,080). Gradientteja sentrifugoitiin huoneen lämpötilassa 20 min kiihtyvyydellä 850 x g. Solut
 10 kerättiin gradientin rajapinnalta ja pestiin PBS:llä. Punaiset verisolut hajoitettiin käsittelemällä 3 - 4 min 10 - 20 ml:lla liuosta, joka sisälsi 0,8 % ammoniumkloridia ja 0,1 % Na₄-EDTA.

Solut otettiin talteen punasolujen hajoitusliuoksesta sentrifugoimalla tätä kiihtyvyydellä 600 x g 10 min
 15 ja suspendoitiin takaisin 10 ml:aan RPMI 1640 -alustaa (GIBCO), joka sisälsi 5 % naudan sikiöseerumia. Lisättiin trombiinia loppupitoisuudeksi 0,5 yksikköä/ml. Solususpensiota sekoitettiin 5 min 37 °C:ssa ja verihiutaleaggregaatin annettiin laskeutua 5 min. Suspendoituneet solut siirrettiin uusiin putkiin, otettiin talteen sentrifugoimalla,
 20 suspendoitiin takaisin 1 ml:aan naudan sikiöseerumia ja siirrettiin kolonniin, joka sisälsi 0,5 g harjattua, esikostutettua nailonvillaa (tyyppi 200, Fenwal).

25 Nailonvillakolonnia inkuboitiin 37 °C:ssa 60 min, jotta monosyytit ja B-lymfosyytit pääsivät kiinnittymään. Sitten kolonni huuhdottiin kolminkertaisella tilavuudella RPMI 1640-alustaa (37 °C), joka sisälsi 5 % naudan sikiöseerumia, ja otettiin talteen eluoituneet tarttumattomat
 30 solut (PBL:t).

PBL:iä (2×10^6 solua/ml) viljeltiin 37 °C:ssa atmosfäärissä, joka sisälsi 5 % CO₂ ja 95 % ilmaa, 96 tuntia RPMI 1640 -alustassa (10,4 g/l), joka sisälsi FeSO₄·7H₂O (1 mg/l), ZnSO₄·7H₂O (2 mg/l), Na₂SeO₃·5H₂O (0,017 mg/l),
 35 1-aminoetanolia (1 mg/l), ihmisen transferriinia (5 mg/l), naudan seerumialbumiinia-linoleiinihappokonjugaattia

(Sigma) (200 mg/l), L-glutamiinia (300 mg/l), penisillii-
ni/streptomysiiniä (100 000 yksikköä/l) ja fytohemagglu-
tiniini-P:tä (Wellcome) (2 mg/l). Kerättiin supernatantit,
5 sentrifugoitiin solujen poistamiseksi, konsentroitiin ult-
rasuodattamalla (Amicon Diaflo-kalvo YM-10, läpäisyraja
10 kD) ja dialysoitiin 0,1 M etikkahappoa vastaan
(Spectrapore 3-dialyysiletku). Selkeytetty retentaatti
kylmäkuivattiin.

Geelipermeaatiokromatografia

10 Raakafraktio sekoitettiin 20 ml:aan 1 M etikkahap-
poa (50 mg/ml) ja laitettiin BioGel P-100-kolonnin (2,6 x
88 cm), joka oli tasapainotettu 1 M etikkahapolla, vir-
tausnopeudella 0,5 ml/min. Kerättiin 20 ml:n fraktioita.
Kustakin fraktiosta otettu näyte haihdutettiin ja siitä
15 tutkittiin kolmena rinnakkaismäärityksenä A375-solujen
kasvua estävä aktiivisuus (GIA). Aktiiviset fraktiot yh-
distettiin, kylmäkuivattiin ja käsiteltiin uudelleen kro-
matografisesti Bio-sil TSK-250 -kolonnilla (600 x 21,5 mm)
edellä kuvatulla tavalla.

20 TSK-250-fraktioiden RP-HPLC

Yhdistettyjen TSK-250-fraktioiden lopullinen puh-
distus tehtiin RP-HPLC:llä suurin piirtein edellä kuvatul-
la tavalla. PBL:istä peräisin oleva kasvainsoluihinhiitto-
ri eluoitui Bonda-pak C18 -kolonnista asetonitriilipitoi-
suudessa 40 - 41 % ja n-propanolipitoisuudessa 26,5 %.

25 Solujen kasvun säätelyn tutkiminen käyttämällä ¹²⁵I- jodideoksiuridiinin sisällyttämistä DNA:han (GIA)

Nämä kokeet tehtiin tasapohjaisilla 96-kuoppaisilla
kudosviljelylevyillä (Costar 3596). Kuhunkin kuoppaan li-
sättiin ihmisen melanoomasoluja (A375, 4×10^3) 50 µl:ssa
30 tutkittavaa näytettä ja inkuboitiin 3 vrk 37 °C:ssa. Solu-
ja leimattiin 24 tuntia ¹²⁵I-IdU:lla (0,05 µCi/kuoppa), ja
inkuboitiin vielä 24 tuntia. Solut pestiin kolmesti, ke-
rättiin moninäytekerjällä, ja määritettiin radioaktiivi-
suus gammalaskurissa.

Tulokset:

Yhdelle PBL-peräiselle kasvainsoluinhibiittorivalmisteelle tehtiin automaattinen toistuva Edman-hajotus. Aminotermiinaalinen aminohapposekvenssi on seuraava:

5 1 5 10 15
A-A-I-G-X-X-X-K-E-Y-X-V-L-X-X-Q-L-Q-K
X edustaa identifioimatonta aminohappoa.

Tämän sekvenssin vertaaminen U937-tekijän sekvenssiin osoittaa selvästi identtisyyden PBL-peräisen tekijän N-pään kanssa.

PBL-tekijä A-A-I-G-X-X-X-K-E-Y-X-V-L-X-X-Q-L-Q-K
U937-tekijä A-A-I-G-S-C-S-K-E-Y-R-V-L-L-G-Q-L-Q-K

15 Seuraavassa tutkimuksessa tutkittiin PBL-peräisen onkostatiini M:n kykyä vaikuttaa erilaisten solujen replikoitumiseen. Havaittiin, että hiiren L929-solut eivät olleet herkkiä PBL-peräiselle onkostatiini M:lle, kun tätä käytettiin korkeintaan pitoisuutena 1000 GIA-yksikköä/ml.

20 Ihmisen WI26-fibroblastien kasvua stimuloi käsittely 1000 GIA-yksiköllä/ml. Korkeintaan 500 GIA-yksikköä/ml ei vaikuttanut ihmisen normaalien T-lymfosyyttien proliferaatioon 72 tunnin kuluttua mitogeneesistä.

Edellä esitettyjen tulosten perusteella on ilmeistä, että on saatu aikaan uusi polypeptidi, jolla on kyky säädellä solujen kasvua. Yhdisteellä on kyseessä olevan solulinjan luonteen mukaan vaihteleva aktiivisuus, niin että sitä voidaan käyttää yksinään tai yhdistettynä muihin yhdisteisiin solujen kasvun säätelyyn in vitro. Keksinnön mukaiset polypeptidit merkitsevät siten uutta polypeptidiä, jota voidaan käyttää soluseoksissa in vitro vähentämään tai edistämään selektiivisesti tietyn solutyypin proliferaatiota. Kokonaista polypeptidiä tai sen fragmentteja voidaan käyttää lisäksi immunogeeneinä vasta-ainetuotannon indusointiin. Indusoituja vasta-aineita voidaan käyttää

määritettäessä elimistön nesteessä esiintyvä onkostatiini M tai säätelemään tekijän aktiivisuutta sitoutumisen kautta in vitro. Lisäksi tämä vasta-aine yhdessä puhdistetun onkostatiini M:n tai sen fragmenttien kanssa toimivat komponentteina diagnostisissa välineistöissä yhdessä muiden reagenssien, erityisesti onkostatiini M:n detektointiin ja kvantitatiiviseen määrittämiseen tarkoitettujen vasta-aineiden kanssa.

10 Vaikka keksintöä on kuvattu melko yksityiskohtaisesti valaisevassa ja esimerkinomaisessa mielessä sen ymmärtämisen helpottamiseksi, lienee ilmeistä, että siihen voidaan tehdä tiettyjä muutoksia ja muunnoksia poikkeamatta liitteenä olevien patenttivaatimusten piiristä.

Patenttivaatimukset

1. Onkostatiini M -polypeptidi, t u n n e t t u
siitä, että se on oleellisesti vapaa solujätteistä ja
5 muista leukosyyttiproteiineista, sillä on kyky estää kas-
vainsolujen proliferaatiota ja stimuloida ihmisen normaali-
lien fibroblastien proliferaatiota, se ei inhiboi ihmisen
proliferatiivisia eikä sytotoksisia T-soluvasteita eikä
granulosyyttisten/myelosyyttisten luuydinpesäkesolujen
10 muodostumista, sen molekyylipaino on 17 - 19 kD määritet-
tynä geielekskluusiokromatografialla ja noin 28 kD määri-
tettynä SDS-PAGE:lla, se kestää käsittelyn 1 N etikkaha-
polla ja 1 N ammoniumhydroksidilla ja 56 °C:n lämpötilaa
yhden tunnin ajan ja se voidaan valmistaa menetelmällä,
15 jossa a) eristetään leukosyytit, kuten histiosyyttiset
lymfoomasolut tai normaalit ihmisen perifeerisen veren
lymfosyytit, imettäväissoluviljelmästä tai imettäväisestä;
b) aktivoidaan leukosyytit indusoivalla aineella,
kuten ingenolilla, forbolilla tai mitogeenilla; ja
20 c) eristetään kromatografisesti aktivoiduista
leukosyyteistä onkostatiini M puhtaana muusta solumateri-
aalista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi,
t u n n e t t u siitä, että polypeptidin puhtausaste on
25 sellainen, että ominaisaktiivisuus on vähintään 100 GIA-
yksikköä/ng proteiinia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi,
t u n n e t t u siitä, että leukosyytit ovat forbolidies-
terillä indusoituja ihmisen histiolyyttisiä lymfoomasolu-
ja.
30

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polypeptidi,
t u n n e t t u siitä, että leukosyytit ovat mitogeeniak-
tivoituja ihmisen normaaleja perifeerisen veren lymfosyyt-
tejä.

5. Vasta-aineet, t u n n e t u t siitä, että ne ovat spesifisiä patenttivaatimuksen 1 mukaiselle polypeptidille tai poly(aminohappo)fragmentille.

5 6. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen polypeptidin läsnäolon detektoimiseksi, t u n n e t t u siitä, että yhdistetään näyte, jonka epäillänsä sisältävän mainittua polypeptidiä, patenttivaatimuksen 5 mukaisen vasta-aineen kanssa ja määritetään kvantitatiivisesti kompleksin muodostuminen vasta-aineen kanssa.

10 7. Diagnostinen välineistö, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 5 mukaista vastaainetta ja patenttivaatimuksen 1 mukaista polypeptidiä.

Patentkrav

1. Onkostatin M-polypeptid, k ä n n e t e c k -
n a d av, att den är väsentligen fri från celldebris och
5 andra leukocytpoteiner, den har förmåga att förhindra
profleration av tumörceller och stimulera profleration
av människans normala fibroplaster, den inhiberar inte
människans proflerativa eller cytotoxiska T-cellresponser
eller bildande av granulocytiska/myelocytiska benmärgkolo-
10 niceller, dess molekyylvikt är 17 - 19 kD bestämt med gel-
exklusionskromatografi och cirka 28 kD bestämt med SPS-
PAGE, den tål behandling med 1 N ättiksyra och 1 N ammo-
niumhydroxid och en temperatur av 56 °C i en timme och den
kan framställas med ett förfarande, där

15 a) leukocyter såsom histiocytiska lymfomaceller el-
ler normala lymfocyter från humant periferiskt blod isole-
ras från en däggdjurcellkultur eller från ett däggdjur;

b) leukocyterna aktiveras med ett inducerande ämne
såsom ingenol, forbol eller en mitogen; och

20 c) onkostatin M isoleras från de kromatografiskt
aktiverade leukocyterna ren från övrigt cellmaterial.

2. Polypeptid enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d av, att renhetsgraden av polypeptiden är
sådan att dess specifika aktivitet är minst 100 GIA-enhe-
25 ter/ng protein.

3. Polypeptid enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d av, att leukocyterna är med forbolidiester
inducerade människans histiocytiska lymfomaceller.

4. Polypeptid enligt patentkrav 1, k ä n n e -
30 t e c k n a d av, att leukocyterna är med mitogener akti-
verade normala lymfocyter från humant periferiskt blod.

5. Antikroppar, k ä n n e t e c k n a d e av, att
de är specifika för polypeptiden eller poly(aminosyra)-
fragmentet enligt patentkrav 1.

6. Förfarande för detektering av närvaro av polypeptiden enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av, att man förenar ett prov, som misstänks innehålla nämnda polypeptid med en antikropp enligt patentkrav 5 och bildandet av ett komplex med antikroppen bestäms kvantitativiskt .

7. Diagnosticeringsmedel, k ä n n e t e c k n a t av, att det innehåller antikropp enligt patentkrav 5 och polypeptiden enligt patentkrav 1.

KUVIO 1

1 5 10 15 20
A-A-I-G-S-C-S-K-E-Y-R-V-L-L-G-Q-L-Q-K-Q

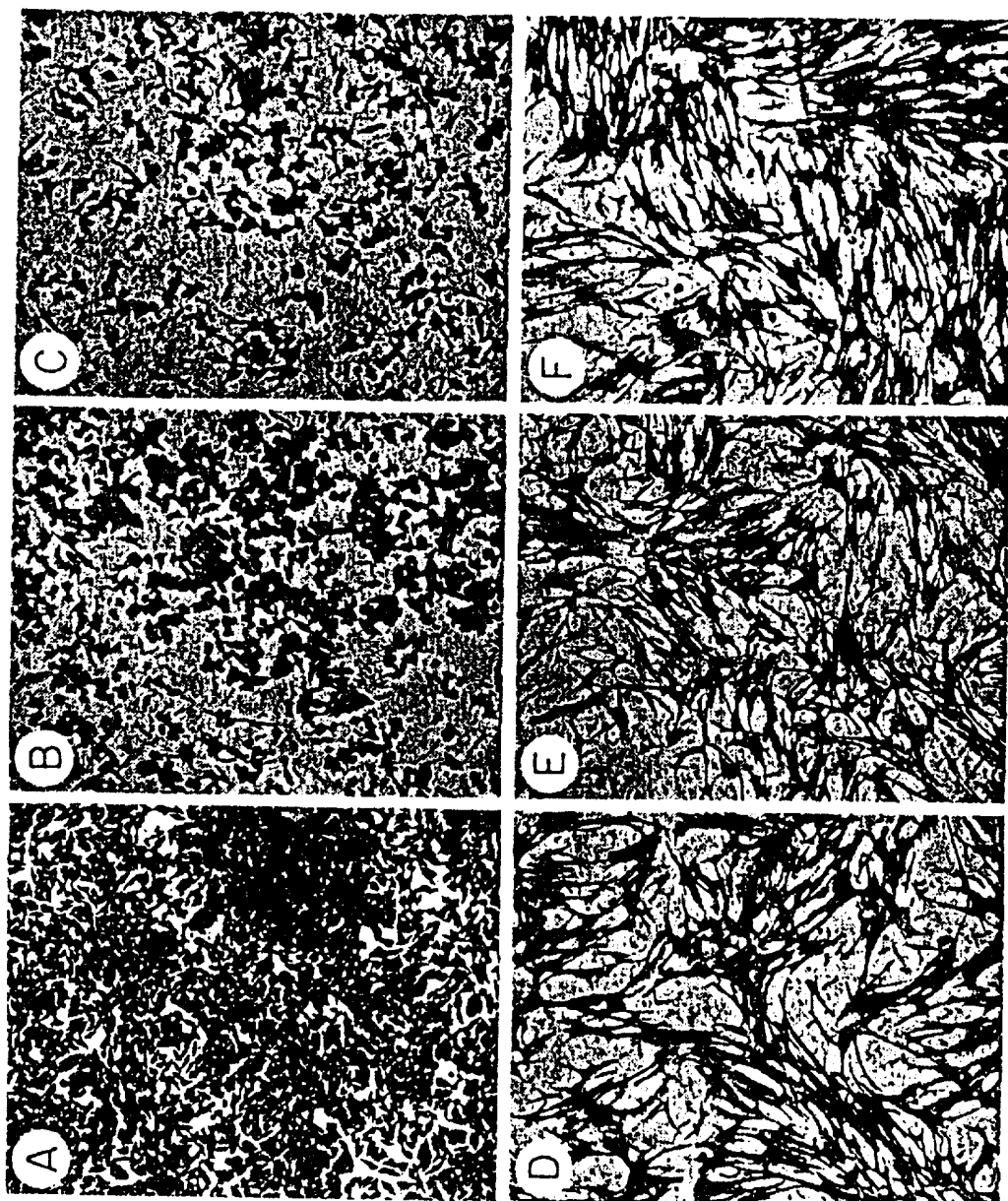
 25 30 35
T-D-L-M-Q-D-T-S-T-L-L-T-P-Y-I

1 5 10 15 20
Q-R-L-P-K-A-Q-D-L-E-R-S-G-L-N-I-E-D-L-E-K

1 5 10 15 20
L-R-E-H-C-R-E-R-P-G-A-E-P-S-E-Q-Q-L-I-G



KUVIO 2



KUVIO 3