



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314191**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 15/33

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19943344	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.03.08, PCT/US93/02024
(22) Inng. dag	1994.09.09	(85) Videreføringsdag	1994.09.09
(24) Løpedag	1993.03.08	(30) Prioritet	1992.03.11, CS, 709/92
(41) Alm. tilg.	1994.09.09		1992.10.21, US, 964589
(45) Meddelt dato	2003.02.10		
(83) Mikroorganisme deponert:	ATTCC 11128		

(71) Patenthaver	Bayer Corp, 333 Coney Street, East Walpole, MA 02032, US
(72) Oppfinner	Institute of Virology - Slovak Academy of Sciences, Dubravská Cesta 9, 842 46 Bratislava, SK
	Jan Zavada, Praha, CZ
	Silvia Pastorekova, Bratislava, SK
	Jaromir Pastorek, Bratislava, SK
(74) Fullmektig	Bryn Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Sammensetning omfattende en nukleinsyresekvens som koder for MN-protein samt fremgangsmåte for fremstilling av disse, og anvendelse derav i vaksine og diagnostikk**

(56) Anførte publikasjoner Zavada og Zavado (1991), Archives of Virology, 118:189-197
Pastorekova et al (1992), Virology, 187:620-626

(57) Sammendrag

Et nytt gen -- MN -- og proteiner/polypeptider som kodes av dette, beskrives. Det tilveiebringes rekombinante nuklein- syremolekyler for å uttrykke MN-proteiner/polypeptider og fusjonsproteiner. Ekspresjon av MN-genet beskrives å være assosiert med tumorgenitet, og oppfinnelsen vedrører fremgangsmåter og sammensetninger for påvisning og/eller kvantitering av MN-antigen og/eller MN-spesifikke antistoff i prøver fra hvirveldyr og som er diagnostiske/prognostiske for neoplastisk og pre-neoplastisk sykdom. Undersøkellesett hvor immunoassays ifølge oppfinnelsen inngår, tilveiebringes. Det beskrives MN-spesifikke antistoff som kan benyttes diagnostisk/prognostisk, terapeutisk, for avbildning og for affinitetsrensning av MN-proteiner/polypeptider. Det tilveiebringes også nukleinsyreprober for MN-genet, samt undersøkelsessett som omfatter probene. Oppfinnelsen vedrører dessuten vaksiner som omfatter MN-proteiner/polypeptider som effektivt immuniserer et hvirveldyr mot neoplastiske sykdommer assosiert med ekspresjonen av MN-proteiner. Oppfinnelsen vedrører ytterligere antisens-nukleinsyresekvenser som kan benyttes for å inhibere MN-gen-ekspresjon.

Foreliggende oppfinnelse vedrører det generelle området medisinsk genetikk og feltene biokjemisk modellering og immunkjemi. Oppfinnelsen omhandler en sammensetning omfattende en nukleinsyresekvens som koder for MN-protein eller MN-polypeptid, encellet vert inneholdende sammensetningen, sammensetning som omfatter MN-protein eller MN-polypeptid, eventuelt MN-fusjonsprotein eller MN-fusjonspolypeptid, sammensetning omfattende en hybridoma, samt fremgangsmåter for fremstilling av et MN-protein eller MN-polypeptid, eventuelt for å påvise eller kvantifisere MN-antigen eller MN-spesifikke antistoff, vaksine som omfatter en sammensetning og en sammensetning som omfatter en antisense nukleinsyre. Nærmere bestemt, vedrører den identifikasjonen av et nytt gen -- MN-genet -- et cellulært gen som koder for MN-proteinet. Oppfinnerne har oppdaget at MN-proteiner er assosiert med tumorigenitet. Påvisning av MN-antigen så vel som spesifikke antistoff for dette i prøver fra pasienter, danner grunnlaget for diagnostiske/prognostiske kreftundersøkelser.

MaTu er et nytt kvasi-viralt middel med relativt uvanlige egenskaper [Zavada, J., Arch. Virol, 50: 1-10 (1976)]. Det antas å være avledet fra en human brystsvulst. I enkelte henseende ligner det klassiske virus mens det i andre henseende ligner "slow" virus (prioner) og i ytterligere andre henseende er det forskjellig fra begge disse virusklasser.

MaTu ble først påvist gjennom dets evne til å komplettere mutanter av vesikulært stomatittvirus (VSV) med varme-labilt overflate-G-protein i HeLa-celler (cellelinje oppnådd fra humant cervikalt adenokarsinom) som var blitt dyrket sammen med humane brystkarsinomceller. Kompletteringen resulterte i dannelse av fenotypiske blandede virioner -- VSV(MaTu) pseudotypene [Zavada et al., Nature New Biol, 240: 124-125 (1972)]. Virionene inneholder VSV-genomet som er ansvarlig for deres evne til å danne plakk (så vel som interne VSV-proteiner), men overflateproteinet som tilsvarer MaTu, bestemmer deres vertsområde og nøytraliseringsspesifisitet.

Et av de paradoksale trekk ved MaTu-midlet er dets vertsområde. VSV(MaTu) er bare infeksiøs overfor humane fibroblaster, men ikke for HeLa. MaTu-midlet oppdaget gjennom dets evne til å gi overflateprotein for VSV(MaTu)

pseudotypene, lar seg derimot kun overføre til HeLa men ikke til fibroblaster [Zavada et al., J. Gen. Virol., 24: 327-337 (1974)].

Gjennom dens komplettering av VSV-mutanter og dens dannelse av pseudotyper ligner MaTu kjente virus med kappe. MaTu er imidlertid bare
5 overførbart ved direkte celle til celle kontakt og ikke gjennom cellefrie filtrater, hvorved det adskiller seg både fra klassiske og "langsomme" virus. Dets eneste tillatte vert synes å være HeLa-celler. I slike celler sprer MaTu seg ekstremt langsomt og danner ikke morfologisk distinkte virioner og ligner således de "langsomme" virus [Zavada et al., (1974); Zavada & Zavadova, Arch. Virol, 118:
10 189-197 (1991)]. Ingen kjente virus har HeLa-celler som en eksklusiv vert.

Siden de ovenfor beskrevne egenskaper tyder på at MaTu kan være en helt ny type av molekyllær parasitt på levende celler, og siden det sannsynligvis skriver seg fra en menneskelig svulst, har det betydelig medisinsk forskningsinteresse å karakterisere det mer utførlig. Her er den biologiske og molekyllære natur av MaTu
15 utredet. MaTu viste seg å være et tokomponentsystem som har en eksogen overførbart komponent, MX, og en endogen cellulær komponent, MN. MN-genet ble videre funnet å forekomme i det kromosomale DNA hos alle undersøkte hvirveldyr, og ekspresjonen av dette ble funnet å være sterkt korrelert med tumorigenitet.

Her beskrives kloningen og sekvenseringen av MN-genet og dannelsen av
20 et MN-kodet protein i en bakterievektor. Det genetisk modellerte MN-protein, så vel som andre MN-proteiner/polypeptider, kan i henhold til denne oppfinnelse benyttes i serologiske undersøkelser for å påvise MN-spesifikke antistoff. Slike MN-proteiner/polypeptider og antistoff som er reaktive med MN-antigen, kan
25 dessuten i henhold til denne oppfinnelse, benyttes ved immunoassay for å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen. Slike forsøk kan være diagnostiske og/eller prognostiske for neoplastisk og/eller pre-neoplastisk sykdom.

Her beskrives MN-genet, et cellulært gen som er den endogene komponent av MaTu-midlet. Tilnærmet hele cDNA-sekvensen for det tilsynelatende intronløse
30 gen er vist i Figurene 1A-1B [Sekv. ID NO.: 1].

I ett aspekt av foreliggende oppfinnelse omfattes en sammensetning omfattende en nukleinsyresekvens som koder for MN-protein eller et MN-polypeptid som er serologisk aktivt, immunogent og/eller antigen, kjennetegnet ved at nukleotidsekvensen for nevnte nukleinsyre er valgt fra gruppen bestående

av; (a) SEKV ID NO:1, (b) nukleotidsekvens som hybridiserer under stringente betingelser med komplementet til SEKV ID NO:1, (c) nukleotidsekvenser som skiller seg fra SEKV ID NO:1, eller fra nukleotidsekvensene i (b) i kodonsekvens forårsaket av degenerasjon av den genetiske koden.

5 Foreliggende oppfinnelse er rettet mot en sammensetning omfattende nevnte MN-gen, fragmenter derav og det tilhørende cDNA, som for eksempel er anvendelige til: 1) å fremstille MN-proteiner/polypeptider ved biokjemisk modellering; 2) til å fremstille nukleinsyre-prober for å teste på nærvær av MN-genet i celler i et individ; 3) å fremstille passende PCR-primere (polymerasekjede-reaksjon), for eksempel til anvendelse i PCR-baserte bestemmelser eller for å
10 fremstille nukleinsyre-prober; 4) å identifisere MN-proteiner og polypeptider så vel som homologer eller tilnærmede homologer av disse; 5) å identifisere forskjellige mRNA transkribert fra MN-gener i forskjellig vev og cellerlinjer, fortrinnsvis humane; og 6) å identifisere mutasjoner i MN-gener. Oppfinnelsen vedrører dessuten
15 rensede og isolerte DNA-molekyler som omfatter MN-genet eller fragmenter eller de tilhørende cDNA eller fragmenter derav.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også en encellet vert, prokaryot eller enkaryot som er transformert eller transfektert med ovennevnte sammensetning i hvilken nukleinsyren er operativt forbundet med en ekspresjonskontrollsekvens i
20 vektoren.

Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører en sammensetning som omfatter et MN-protein eller et MN- polypeptid som er serologisk aktivt, immunogent og/eller antigen, kjennetegnet ved at nevnte MN-protein eller MN-polypeptid er kodet for av nukleotidsekvensen som er valgt fra gruppen bestående
25 av; (a) SEKV ID NO:1, (b) nukleotidsekvensen som hybridiserer under stringente betingelser til komplementet av SEKV ID NO:1, (c) nukleotidsekvensen som skiller seg fra SEKV ID NO:1, eller nukleotidsekvensen i (b) i kodonsekvens forårsaket av degenerasjon av den genetiske kode. Foretrukket kjennetegnes nevnte sammensetning av at MN-proteinet eller MN-polypeptidet har en aminosyre-sekvens fra SEKV ID NO:2, eller har aminosyresekvensen til SEKV ID NO:2.
30 Ekspresjonen av MN-proteiner lar seg indusere ved å dyrke celler i tette kulturer, og det ble fastslått at slik ekspresjon var assosiert med tumorogene celler.

Det viste seg at MN-proteiner ble dannet av enkelte humane tumor-cellerlinjer in vitro, for eksempel av HeLa- (cervikalt karsinom), T24- (blære-

karsinom) og T47D- (mammakarsinom) og SK-Mel 1477- (melanom) cellelinjer, med tumorogene hybridceller og med celler av enkelte humancancere in vivo, for eksempel av karsinomceller i livmorhalsen, ovarier og endometriet og av celler av enkelte benigne neoplasier, så som mammapapillomer. Det ble ikke funnet MN-proteiner i ikke-tumorogene hybridceller eller i cellene av normalt vev. MN-proteiner anses derfor å være tumorspesifikke.

I HeLa og tumorogene HeLa x fibroblast-hybrid- (H/F/T) celler manifesterer MN-protein seg som et "tvilling"-protein p54/58N, som er glykosylert og danner disulfid-koblede oligomerer. Ifølge elektroforese på reduserende gel, har MN-proteiner molekyllvekter i området fra ca. 40 kd til ca. 70 kd, fortrinnsvis fra ca. 45 kd til ca. 65 kd og helst fra ca. 48 kd til ca. 58 kd. På ikke-reduserende gel har MN-proteiner i form av oligomerer, molekyllvekter i området fra ca. 145 kd til ca. 160 kd, fortrinnsvis fra ca. 150 til ca. 155 kd og helst fra ca. 152 til ca. 154 kd. Den predikerte aminosyresekvens for et foretrukket MN-protein i henhold til foreliggende oppfinnelse, er vist i Figur 1A-1B, SEKV ID NO:2.

Oppdagelsen av MN-genet og -proteinet og dermed av i det vesentlige komplementære MN-gener og -proteiner som det derved kodes for, ledet til det funn at ekspresjonen av MN-proteiner var assosiert med tumorogenitet. Dette funn resulterte i utvikling av metoder som er diagnostiske/prognostiske for cancer- og pre-cancerøse tilstander. Det tilveiebringes derfor metodikk og sammensetninger for å påvise utbrudd og forekomst av neoplastisk sykdom ved å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen i prøver fra pasienter, innbefattet celle- og vevsekstrakter fra hvirveldyr, fortrinnsvis pattedyr, og spesielt mennesket. Dette MN-antigen vil også kunne finnes i vevsvæsker.

MN-proteiner og -gener kan benyttes forskningsmessig i forbindelse med molekyllære mekanismer for onkogenese, innen cancerdiagnostikk/prognostikk, og kan ha betydning ved cancerimmunterapi.

Foreliggende oppfinnelse er egnet for påvisning av en rekke neoplastiske og/eller pre-neoplastiske sykdommer. Eksempler på neoplastiske sykdommer innbefatter karsinomer, så som bryst-, blære-, ovarie-, uterus-, cervix-, endometrie-, plateepitel- og adenoskvamøse-karsinomer; hode- og hals-cancer; mesodermale svulster, så som neuroblastomer og retinoblastomer; sarkomer, så som osteosarkomer og Ewing's sarkom, samt melanomer. Av særlig interesse er hode- og hals-cancer, gynekologiske kreftformer innbefattet ovarie-, cervix-,

vaginal-, endometrie- og vulva-cancer; gastrointestinale kreftformer som mave-, tykktarm- og spiserørskreft; urinveiskreft, så som blære- og nyrekreft; hudkreft; leverkreft; prostatakreft; lungekreft og brystkreft. Av ytterligere særlig interesse er gynekologiske kreftformer; brystkreft; urinveiskreft, spesielt blærekreft; lungekreft; 5 gastrointestinal kreft, så som mave-, tykktarm- og spiserørs-kreft, samt leverkreft. Enda mer av særlig interesse er gynekologiske kreftformer og brystkreft. Gynekologiske kreftformer av særlig interesse er karsinomer i livmorslimhinne, endometriet og ovariene; særlig slike gynekologiske kreftformer som plate-epitelkarsinomer i cervix, adenoskvamøse karsinomer, adenokarsinomer så vel 10 som gynekologiske pre-cancerøse tilstander, så som metaplastisk cervikalt vev og kondylomer.

Det beskrives biokjemiske modellering av MN-genet, fragmenter av dette eller tilhørende cDNA. I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse, omfattes en fremgangsmåte for ved rekombinant teknikk å danne et MN-protein eller 15 MN-polypeptid, kjennetegnet ved at den omfatter trinnene: a) transformering av en encellet vert med en sammensetning ifølge krav 4, b) dyrking av nevnte encellede vert slik at MN-proteinet og/eller MN-polypeptidet uttrykkes, c) ekstrahering og isolering av nevnte MN-protein og/eller MN-polypeptid. Et slikt rekombinant protein eller polypeptid kan glykosyleres eller ikke, fortrinnsvis glykosyleres, og 20 kan renses til betydelig renhet. Oppfinnelsen vedrører dessuten MN-proteiner/-polypeptider som fremstilles på annen biologisk måte eller syntetisk.

De nevnte MN-proteiner/polypeptider kan benyttes i undersøkelsesmetoder for å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen i en prøve av et virveldyr som omfatter trinnene: (a) bringe nevnte prøve i kontakt med et antistoff ifølge krav 10, 25 og (b) påvise og/eller kvantifisere binding av nevnte antistoff til antigen i nevnte prøve.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for i en prøve av et virveldyr å påvise og/eller kvantifisere MN-spesifikke antistoff, kjennetegnet ved at den omfatter trinnene: a) kontakte og inkubere hvirveldyrprøven med MN- 30 protein eller MN-polypeptid, ifølge krav 6, og b) påvise og/eller kvantifisere binding av nevnte MN-protein eller MN-polypeptid til antistoff i prøven.

MN-proteiner/polypeptider ifølge oppfinnelsen er serologisk aktive, immunogene og/eller antigene. De kan dessuten benyttes som immunogener for å

danne MN-spesifikke antistoff, polyklonale og/eller monoklonale, og til å gi en T-celle immunrespons.

Oppfinnelsen er videre rettet mot sammensetninger som omfatter MN-spesifikke antistoff som kan benyttes diagnostisk/prognostisk og eventuelt terapeutisk. MN-spesifikke antistoff kan for eksempel benyttes innen laboratorie-

5 diagnostikken, ved bruk av immunfluorescens-mikroskopi eller immunhistokjemisk farving; som en komponent i immunoassay for påvisning og/eller kvantifisering av MN-antigen for eksempel i kliniske prøver; som prober ved immunblotting for å påvise MN-antigen; i immunelektron-mikroskopi med kuleformede gullkolloider for

10 lokalisering av MN-proteiner og/eller polypeptider i celler, og ved genetisk modellering for kloning av MN-genet eller fragmenter av dette eller tilhørende cDNA. Slike MN-spesifikke antistoff kan benyttes som komponenter i diagnostiske/prognostiske undersøkelses-sett, for eksempel for in vitro anvendelse på histologiske snitt. Slike antistoff kan også benyttes i in vivo diagnostika/-

15 prognostika og kan for eksempel merkes på en passende måte, f.eks. med en egnet radioaktiv isotop og benyttes in vivo for ved scintigrafi å lokalisere metastaser. Dessuten kan slike antistoff benyttes in vivo for terapeutisk å behandle kreftpasienter med eller uten toksiske og/eller cytostatiske midler i tilknytning til disse. Dessuten kan slike antistoff benyttes in vivo for å påvise

20 forekomst av neoplastisk og/eller pre-neoplastisk sykdom. Endelig, kan slike stoff benyttes for affinitetsrensing av MN-proteiner og -polypeptider.

Et hybridom som danner et representativt MN-spesifikt antistoff, det monoklonale antistoffet M75, ble deponert ved the American Type Culture Collection [ATCC; Rockville, MD (USA)] den 17. september, 1992, under ATCC-

25 nummer HB 11128. M75-antistoffet ble benyttet ved oppdagelsen og identifiseringen av MN-proteinet og kan benyttes for lett å identifisere MN-antigen ved western blotting, innen radioimmunoassay samt immunhistokjemisk, for eksempel i formalinfikserte vevsprøver.

Denne oppfinnelse vedrører også rekombinante DNA-molekyler som

30 omfatter en DNA-sekvens som koder for et MN-protein eller -polypeptid, samt rekombinante DNA-molekyler som ikke bare koder for et MN-protein eller -polypeptid, men også for en aminosyresekvens av et ikke-MN-protein/polypeptid, fortrinnsvis som ikke er immunogent overfor mennesker og som ikke er typisk reaktivt overfor antistoff i humane kroppsvæsker. Eksempler på en slik DNA-

sekvens er det alfa-peptid-kodende området av beta-galaktosidase og en sekvens som koder for glutathion-S-transferase, eller et fragment derav. Det kreves dessuten her beskyttelse for sammensetninger omfattende slike rekombinante fusjonsproteiner/polypeptider som er tilnærmet rene og som ikke opptrer naturlig.

5 Et eksempel på et fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen er pGEX-3X-MN.

Det beskrives også fremgangsmåter for behandling av neoplastisk sykdom og/eller pre-neoplastisk sykdom og som omfatter at ekspresjonen av MN-gener inhiberes ved å administrere antisense-nukleinsyresekvenser som er tilnærmet komplementære til mRNA transkribert fra MN-gener.

10 Foreliggende oppfinnelse omhandler en sammensetning som omfatter en antisense-nukleinsyre som hybridiserer under stringente betingelser til mRNA transkribert fra en nukleinsyre som koder for et MN-protein eller et MN-polypeptid som er serologisk aktivt, immunogent og/eller antigen, kjennetegnet ved at nukleotid-sekvensen for nevnte antisense nukleinsyre er valgt fra gruppen bestående av; (a)
 15 nukleotidsekvensen som er komplementet til SEKV ID NO:1, (b) nukleotid-sekvensen som hybridiserer under stringente betingelser til SEKV ID NO:1, og (c) nukleotidsekvensen som er ulik fra komplementet til SEKV ID NO:1, eller nukleotidsekvensen i (b) i kodon-sekvens forårsaket av degenerasjon av den genetiske koden. Antisense-nukleinsyresekvenser som er tilnærmet
 20 komplementære til sekvensen i 5'-enden av MN cDNA-sekvensen er vist i Figur 1A-1B, foretrekkes. Fortrinnsvis er slike antisense-nukleinsyresekvenser oligo-nukleotider.

Denne oppfinnelse vedrører også vaksiner som omfatter en immunogen mengde av en sammensetning av ett eller flere tilnærmet rene MN-proteiner
 25 og/eller polypeptider dispergert i en fysiologisk akseptabel, ugiftig bærer, hvor mengden er effektiv til å immunisere et hvirveldyr, fortrinnsvis et pattedyr, særlig mennesket, mot en neoplastisk sykdom som er assosiert med ekspresjonen av MN-proteiner. Disse proteinene kan være fremstillet syntetisk, ved rekombinant teknikk eller annen biologisk teknikk. Rekombinante MN-proteiner innbefatter
 30 fusjonsproteiner som for eksempel pGEX-3X-MN. En særlig anvendelse av vaksinen kan være til forhindring av residiv og/eller metastase. Den kan for eksempel administreres til en pasient som kirurgisk har fått fjernet en MN-bærende svulst for å forhindre at svulsten kommer igjen.

Oppfinnelsen vedrører videre sammensetninger som omfatter nukleinsyre-prober som er tilnærmet komplementære til nukleinsyresekvenser i MN-genet. Foretrukne sammensetninger omfatter nukleinsyre-prober som har sekvenser tilnærmet komplementære til sekvenser fra det MN cDNA som er vist i Figur

5 1A-1B. Undersøkelses-sett kan omfatte slike prober som er diagnostisk/-prognostisk egnet for neoplastisk og/eller pre-neoplastisk sykdom. Foretrukne undersøkelses-sett omfatter anordninger for å påvise eller måle hybridiseringen av de nevnte prober til MN-genet eller til mRNA-produktet av MN-genet, så som anordninger for synliggjøring.

10 Immunoassay kan oppnås gjennom undersøkelses-sett som omfatter MN-proteiner/polypeptider og/eller MN-spesifikke antistoff. Slike undersøkelses-sett kan være av fastfase-type, men er ikke begrenset til dette og kan også være av væskefasetype, og kan være basert på ELISA-teknikk, partikkelbestemmelse, radiometrisk eller fluorimetrisk bestemmelse, med eller uten amplifisering, ved for
15 eksempel å benytte avidin/biotin-teknologi.

Forkortelser

Følgende forkortelser er her benyttet:

	AA	- aminosyre
20	ATCC	- American Type Culture Collection
	bp	- basepar
	BSA	- bovint serumalbumin
	Ci	- curie
	cm	- centimeter
25	cpm	- tellinger per minutt
	C-terminus	- karboksyl-terminal
	C	- grader Celcius
	DMEM	- Dulbecco's modifiserte Eagle medium
	EDTA	- etylendiamintetraeddiksyre
30	EIA	- enzym immunoassay
	ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay
	F	- fibroblaster
	FCS	- føtalt kalveserum
	FIBR	- fibroblaster

	FITC	- fluorescein-isotiocyanat
	H	- HeLa-celler
	HEF	- humane embryo fibroblaster
	HeLa K	- standard type av HeLa-celler
5	HeLa S	- Stanbridge's mutant HeLa D98/AH.2
	H/F-T	- hybrid HeLa fibroblastceller som er tumorogene; oppnådd fra HeLa D98/AH.2
	H/F-N	- hybrid HeLa fibroblastceller som er ikke-tumorogene; oppnådd fra HeLa D98/AH.2
10	HGPRT	- mangler hypoksantin-guanin-fosforibosyl-transferase
	HRP	- pepperrot-peroksydase
	IPTG	- isopropyl-beta-D-tiogalakto-pyranosid
	kb	- kilobase
	kd	- kilodalton
15	M	- molar
	mA	- milliampere
	MAb	- monoklonalt antistoff
	ME	- merkaptoetanol
	MEM	- minimalt essensielt medium
20	mg	- milligram
	mL	- milliliter
	mM	- millimolar
	MTV	- mammatumor-virus
	N	- normal konsentrasjon
25	ng	- nanogram
	N-terminus	- amino-terminal
	ODN	- oligodeoksynukleotid
	PAGE	- polyakrylamidgel-elektroforese
	PBS	- fosfat-bufret saltoppløsning
30	PEST	- kombinasjon av en-bokstavs forkortelse for prolin, glutaminsyre, serin, treonin
	pI	- isoelektrisk punkt
	RIP	- radioimmunpresipitasjon
	RIPA	- radioimmunpresipitasjonsbestemmelse

	SAC	- protein A- <u>Staphylococcus aureus</u> celler
	SDS	- natrium-dodekylsulfat
	SDS-PAGE	- natrium-dodekylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese
	SSPE	- NaCl (0,18M), natriumfosfat (0,01M), EDTA (0,001M)
5	TCA	- trikloreddiksyre
	TC media	- vevskulturmedier
	μCi	- mikrocurie
	μg	- mikrogram
	μL	- mikroliter
10	μM	- mikromolar
	VSV	- vesikulært stomatittvirus
	X-MLV	- xenotropt museleukemivirus

Cellelinjer

15	Følgende cellelinjer ble benyttet i de her beskrevne eksperimenter:	
	HeLa K	-- standardtype av HeLa-celler; aneuploid, epitellignede cellelinje isolert fra et humant cervikalt adenokarsinom [Gey et al., <u>Cancer Res.</u> , 12: 264 (1952); Jones et al., <u>Obstet. Gynecol.</u> , 38: 945-949 (1971)] tilgjengelig fra professor B. Korych, [Institute of Medical Microbiology and Immunology, Charles University; Prag, Tsjekkoslovakia]
20		
	HeLa D98/AH.2	-- Mutant HeLa-klon som mangler hypoksantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HGPRT ⁻) vennlig stillet til rådighet av Eric J. Stanbridge [Department of Microbiology, College of Medicine, University of California, Irvine, CA (USA)] og omtalt av Stanbridge et al., <u>Science</u> , 215: 252-259 (15. januar, 1982); opphav til hybridcelle H/F-N og H/F-T, også levert av E.J. Stanbridge.
25		
30	NIH-3T3	-- musefibroblast-cellelinjen omtalt i Aaronson, <u>Science</u> , 237: 178 (1987).

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- T47D -- cellelinje som skriver seg fra et humant mamma-karsinom [Keydar et al., Eur. J. Cancer, **15**: 659-670 (1979)]; vennlig stillet til rådighet av J. Keydar [Haddasah Medical School; Jerusalem, Israel]
 - T24 -- cellelinje fra urinblærekarsinom [Bubenik et al., Int. J. Cancer, **11**: 765-773 (1973)] vennlig stillet til rådighet av J. Bubenik [Institute of Molecular Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences; Prag, Tsjekkoslovakia]
 - HMB2 -- cellelinje fra melanom [Svec et al., Neoplasma, **35**: 665-681 (1988)]
 - HEF -- humane embryofibroblaster [Zavada et al., Nature New Biology, **240**: 124-125 (1972)]
 - SIRC -- cellelinje fra kaninkornea (kontroll og X-MLV-infisert) [Zavada et al., Virology, **82**: 221-231 (1977)]
 - Vero-celler -- cellelinje fra grønn marekatt (African green monkey) [Zavada et al., (1977)]
 - myelomcelle --- myelomcellelinje benyttet som linje NS-0 fusjonsopphav ved fremstilling av monoklonalt antistoff [Galfre & Milstein, Methods Enzymol., **73**: 3-46 (1981)]
 - SK-Mel 1477 -- human melanomcellelinje vennlig stillet til rådighet av K.E. Hellstrom [Division of Tumor Immunology, Fred Hutchins Cancer Research Center; Seattle, Washington (USA)]
 - XC -- celler oppnådd fra et rhabdomyosarkom fra rotte induisert med Rous sarkomvirus-indusert rottesarkom [Svoboda, J., Natl. Cancer Center Institute Monograph NO. 17: i: "International Conference on Avian Tumor Viruses" (J.W.

Beard red.), s. 277-298 (1964)], vennlig stillet til rådighet av Jan Svoboda [Institute of Molecular Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences; Prag, Tsjekkoslovakia]; og

- 5 Rotte 2-TK⁻ -- en tymidin-kinase-manglende cellelinje, vennlig stillet til rådighet av L. Kutinova [Institute of Sera and Vaccines; Prag, Tsjekkoslovakia]
- CGL1 -- H/F-N hybridceller (HeLa D98/AH.2- derivat)
- 10 CGL2 -- H/F-T hybridceller (HeLa D98/AH.2-derivat)
- CGL3 -- H/F-T hybridceller (HeLa D98/AH.2-derivat)
- 15 CGL4 -- H/F-T hybridceller (HeLa D98/AH.2-derivat)

Nukleotid- og aminosyresekvens-symboler

Følgende symboler er her benyttet for angivelse av nukleotider:

20	<u>Base</u>	<u>Symbol</u>
	adenin	A
	cytosin	C
	guanin	G
	tymin	T
25	uracil	U

Det finnes tyve hoved-aminosyrer som hver spesifiseres gjennom en forskjellig anordning av tre nabo-nukleotider (triplettkode eller kodon) og som kobles sammen i en bestemt rekkefølge for å danne et karakteristisk protein. En

30 tre-bokstavs konvensjon benyttes herunder for å angi de nevnte aminosyrer, som for eksempel i Figur 1A-1B, på følgende måte:

	<u>Aminosyrenavn</u>	<u>Symbol</u>
	Alanin	Ala
	Arginin	Arg
	Asparagin	Asn
5	Asparaginsyre	Asp
	Cystein	Cys
	Glutaminsyre	Glu
	Glutamin	Gln
	Glycin	Gly
10	Histidin	His
	Isoleucin	Ile
	Leucin	Leu
	Lysin	Lys
	Metionin	Met
15	Fenylalanin	Phe
	Prolin	Pro
	Serin	Ser
	Treonin	Thr
	Tryptofan	Trp
20	Tyrosin	Tyr
	Valin	Val

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1A-1B angir nukleotidsekvensen av MN cDNA-klonen isolert som beskrevet senere, og den predikerte aminosyresekvens som kodes av dette cDNA [henholdsvis SEKV ID NO:1 og SEKV ID NO:2]. Disse sekvensdata er sendt til EMBL Data Library i Heidelberg, Tyskland og er tilgjengelig under aksjesjonsnummer X66839.

Figur 2A-2B illustrerer grafisk ekspresjonen av MN- og MX-spesifikke proteiner i humane fibroblaster (F) i HeLa-celler (H) og i H/F-N og H/F-T hybridceller og motsvarer ekspresjonen i MX-infiserte- og MX-uinfiserte celler. Eksempel 5 inneholder detaljer angående fremgangsmåter og resultater.

Figur 3A-3B (diskutert i Eksempel 8) illustrerer grafisk resultatene fra radioimmunpresipitasjonsforsøk med ¹²⁵I-pGEX-3X-MN-protein og forskjellige

antistoff. Det radioaktive protein (15×10^3 cpm/rør) ble utfelt med ascitesvæske eller serum og SAC på følgende måte: (A) ascites med MAb M75; (B) kanin anti-MaTu-serum; (C) normalt kaninserum; (D) humanserum L8; (E) humanserum KH; og (F) humanserum M7.

5 Figur 4 (diskutert i Eksempel 8) viser resultatene av radioimmunoassay for MN-antigen. Ascitesvæske (fortynning som utfeller 50% radioaktivitet) fikk reagere i 2 timer med (A) "kald" (ikke-merket) protein pGEX-3X-MN eller med ekstrakter fra celler på følgende måte: (B) HeLa + MX; (C) rotte-2TK; (D) HeLa; (E) rotte XC; (F) T24; og (G) HEF. Deretter ble ^{125}I -merket pGEX-3X-MN-protein (25×10^3 cpm/rør)

10 tilsatt og inkubert i ytterligere 2 timer. Tilslutt ble radioaktiviteten av MAb M75 adsorbent til SAC og målt.

MaTu -- MX- og MN-komponenter

Som vist her utgjør MaTu et tokomponentsystem. En del av komplekset,

15 eksogent MX, er overførbart og manifesterer seg ved et protein, p58X, som er et cytoplasmatisk antigen som reagerer med enkelte naturlige sera fra mennesker og forskjellige dyr. Den andre komponenten, MN, er endogen i humane celler.

MN er et cellulært gen som bare oppviser liten homologitet med kjente DNA-sekvenser. Det er relativt konservativt og forekommer som et enkeltkopi-gen

20 i det kromosomale DNA til forskjellige hvirveldyr. Her beskrives kloningen og sekvenseringen av MN cDNA og den genetiske modellering av et fusjonsprotein, nemlig MN pluss karboksylterminalen i glutation-S-transferase, som lett kan renses ved affinitetskromatografi.

MN manifesterer seg i HeLa-celler gjennom tvilling-protein(er) p54/58N,

25 som er lokalisert på celleoverflaten og i kjernen. Immunblott ved bruk av et monoklonalt antistoff som reagerer med p54/58N (MAb M75) oppviste to bånd ved 54 kd og 58 kd. Disse to båndene kan motsvare en proteintype som avviker i glykosyleringsmønster og prosesseringsmåte. (Både p54N og p58N er glykosylert med oligosakkaridiske rester som inneholder mannose, men bare p58N inneholder

30 også glykosamin). I denne sammenheng angir uttrykket "tvillingprotein", p54/58N.

MN mangler i hurtig voksende sparsomme HeLa-kulturer, men lar seg indusere enten ved å holde cellene i tett kultur eller, mer virkningsfullt, ved å infisere dem med MX. De induserende faktorene er synergistiske. Bare p54/58N assosieres med virioner av vesikulært stomatittvirus (VSV) reproduisert i MaTu-

infiserte HeLa. Mens tvillingproteinet p54/58N er glykosylert og danner oligomerer sammenbundet gjennom disulfidbindinger, er p58X ikke glykosylert og danner ikke S-S-bundne oligomerer.

VSV setter p54/58N sammen til virioner i HeLa-celler, hvilket indikerer at
5 tvillingproteinet er ansvarlig for komplementeringen av VSV G-protein-mutanter og for dannelse av VSV(MaTu) pseudotyper. Siden bare kappebærende virus gir overflate-glykoproteiner for dannelse av infeksjøs, funksjonerende pseudotyper som kan utføre slike bestemte funksjoner som adsorpsjon og penetrering av virioner inn i celler [Zavada, J., J. Gen. Virol., 63: 15-24 (1982)] betyr denne
10 observasjon at MN-genet oppfører seg som en kvasi-viral sekvens.

Overflateproteinene på kappebærende virus som deltar i dannelsen av VSV-pseudotyper, er glykosylert som i MN-tvillingproteinet p54/58N. MN-proteiner ligner også virale glykoproteiner ved dannelsen av oligomerer (fortrinnsvis tri- eller tetramerer) og slik oligomerisering er, selv om det ikke nødvendigvis inngår S-S-
15 bindinger (disulfidbindinger), essensiell for sammensetningen av virioner [Kreis & Lodish, Cell, 46: 929-937 (1986)]. Disulfidbindingene kan sprenge ved reduksjon med 2-merkaptotanol.

Som rapportert av Pastorekova et al., Virology, 187: 620-626 (1992), ser p54/58N fra celleekstrakter eller fra VSV, etter reduksjon med merkaptotanol,
20 meget like ut på immunblott. Uten reduksjon, gir det i celleekstrakter flere bånd omkring 150 kd, hvilket tyder på at cellene kan inneholde flere ulike oligomerer (sannsynligvis med ulikt p54:p58-forhold), men VSV setter selektivt sammen kun én av disse, med en molekylvekt på ca. 153 kd. Denne oligomer kan være en trimer, eller heller en tetramer, bestående av 54 kd og 58 kd proteiner. Det
25 ekvimolare p54:p58-forhold i VSV-virioner indikeres av tilnærmet samme styrke av 54 kd og 58 kd båndene i en VSV-prøve analysert under reduserende betingelser.

Ekspresjonen av MN-proteiner viser seg å være diagnostisk/prognostisk for neoplastisk sykdom. Det ble fastslått at MN tvillingproteinet, p54/58N, ble uttrykt i HeLa-celler og i Stanbridge's tumorogene (H/F-T) hybridceller [Stanbridge et al.,
30 Somatic Cell Genet, 7: 699-712 (1981); og Stanbridge et al., Science, 215: 252-259 (1982)] men ikke i fibroblaster eller i ikke-tumorogene (H/F-N) hybridceller [Stanbridge et al., id.]. MN-proteiner ble funnet i immunblott fremstillet fra humane ovarie-, endometrie- og uterus-cervikale karsinomer og i enkelte benigne neoplasier (som mamma-papillomer), men ikke fra normalt ovarie-, endometrie-,

uterus- eller placenta-vev. I HeLa-celler infisert med MX, ble det iaktatt påfallende ultrastrukturelle endringer, nemlig dannelse av rikelige filamenter på celleoverflater og amplifikasjon av mitokondrier. Ved å benytte en immunogull-teknikk ble p54/58N gjort synlig på overflatefilamentene og i kjernen, spesielt i nukleolene.

- 5 MN-proteiner synes således å være tumorspesifikke, idet de ikke synes å dannes av normale ikke-tumor celler.

De senere eksempler viser at MX og MN er to ulike enheter som kan eksistere uavhengig av hverandre. MX som et eksogent, overførbart middel, kan formeres i fibroblaster og i H/F-N hybridceller som ikke uttrykker MN-relaterte proteiner (Figur 2A-2B). I slike celler induserer ikke MX dannelsen av MN-protein. 10 MN-protein kan dannes i HeLa og andre tumorceller selv uten MX, som vist i Figur 2A-2B og i Eksempel 5 og 6. Derimot er MX en potent induser av MN-relatert protein i HeLa-celler. Det øker sin produksjon 30 ganger i forhold til den konsentrasjon som finnes i uinfiserte celler (Eksempel 5 og 8 samt Tabell 1 i 15 Eksempel 8, nedenfor).

MN-gen – kloning og sekvensering

Figur 1A-1B viser nukleotidsekvensen for MN cDNA-klonen isolert som beskrevet i dette avsnitt. Som følge av degenereringen av den genetiske kode, 20 hvilket vil si at mer enn ett kodon kan kode for én aminosyre [for eksempel kodonene TTA, TTG, CTT, CTC, CTA og CTG koder alle for aminosyren leucin (Leu)], er det klart at variasjoner i nukleotidsekvensen for eksempel i Figur 1A-1B, hvor ett kodon er skiftet ut med et annet, ville frembringe et tilnærmet ekvivalent protein eller polypeptid i henhold til foreliggende oppfinnelse. Alle slike variasjoner 25 i nukleotidsekvensen av MN cDNA og komplementære nukleinsyresekvenser, faller inn under rammen for foreliggende oppfinnelse.

Det er dessuten klart at den nukleotidsekvens som her er beskrevet og vist i Figur 1A-1B, alene representerer den nøyaktige struktur av den her isolerte og beskrevne cDNA nukleotidsekvens. Det må forventes at svakt modifiserte 30 nukleotidsekvenser vil bli funnet eller vil kunne bli modifisert gjennom kjent teknikk for å kode for tilnærmet like MN-proteiner og polypeptider, for eksempel de som har lignende epitoper, og slike nukleotidsekvenser og proteiner/polypeptider betraktes som likeverdige hva denne oppfinnelse angår. DNA eller RNA som har ekvivalente kodoner, ansees i likhet med syntetiske nukleinsyresekvenser som

koder for proteiner/polypeptider som er homologe eller tilnærmet homologe med MN-proteiner/polypeptider, så vel som de nukleinsyresekvenser som med unntak av degenereringen av den genetiske kode, ville hybridisere til den nevnte cDNA-nukleotidsekvens, faller innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse.

- 5 Modifikasjoner og variasjoner av nukleinsyresekvenser som her angitt, antas å resultere i sekvenser som i det vesentlige er de samme som MN-sekvensen og fragmenter derav.

For å finne MN-genet ble det fremstillet et lambda gt11 cDNA-bibliotek fra MX-infiserte HeLa-celler. Total-RNA fra MX-infiserte HeLa-celler ble isolert ved
10 hjelp av en guanidinium-tiocyanat-CsCl metode, og mRNA ble affinitetsseparert på oligo-dT-cellulose. Syntesen av cDNA og kloningen av dette inn i lambda gt11 ble foretatt ved å benytte syntesesett fra Amersham, bortsett fra at EcoRI-NotI adapteren var fra Stratagene [La Jolla, CA (USA)]. Biblioteket ble underkastet immunoscreening med monoklonalt antistoff M75 i kombinasjon med geit-anti-mus
15 antistoff konjugert med alkalisk fosfatase. Denne immunoscreeningsmetoden er beskrevet av Young & Davis, PNAS (USA), 80: 1194-1198 (1983). En positiv klon ble plukket ut fra 350.000 gjennom søkte plakk (hvilket representerer ca. halvparten av hele biblioteket).

Den positive klon ble subklonet inn i NotI-setet til pBluescript KS
20 [Stratagene], hvorved pBluescript-MN ble dannet. To motsatt orienterte nøstede ("nested") delesjoner ble fremstillet ved å benytte Erase-a-BaseTM-settet [Promega; Madison, WI (USA)] og sekvensert etter dideoksymetoden med et T7 sekvenserings-sett [Pharmacia; Piscataway, NJ (USA)]. Sekvenseringen viste en partiell cDNA-klon hvor innskuddet var 1397 bp langt. Denne sekvens er vist i
25 Figur 1A-1B [SEKV ID NO: 1]. Sekvensen omfatter en stor 1290 bp åpen leseramme og en 107 bp 3' utranslatert region inneholdende et polyadenylerings-signal (AATAAA). Et annet interessant trekk ved sekvensen er forekomsten av et område som bidrar til instabilitet i mRNA (AUUUA i posisjon 1389) som er karakteristisk for mRNA i enkelte onkogener og lymfokiner [Shaw & Kamen, Cell,
30 46: 659-667 (1986)]. Som det fremgår av en sammenligning av størrelsen av MN-klonen med den for det tilsvarende mRNA i et northern blott (Eksempel 12), mangler cDNA ca. 100 bp fra sekvensens 5' ende.

Den åpne leserammen for MN cDNA-klonen koder for et antatt protein på ca. 48 kd (Figur 1A-1B; SEKV ID NO: 2). Analyse av den deduserte translaterete

aminosyre-(AA)-sekvens oppviste ikke noen signifikant homologi med publiserte proteinsekvenser. Den nærmeste homologi som ble funnet, tilsvarte den C-terminale del av MN-proteinet og forskjellige typer karbonsyreanhydraser (ca. 30-35% i 170-200 AA overlapping). Det aktive setet så vel som det Zn^{2+} -bindende domene i karbonsyreanhydrase er vel-konservert i MN-proteinet. MN-genet er imidlertid helt klart en ny sekvens oppnådd fra det humane genom.

Selv om MN-genet som antydte, oppviser en viss homologi med kjente karbonsyreanhydraser, adskiller det seg fra disse på flere måter. Det er kjent syv karbonsyreanhydraser [Dodgson et al., (red.) The Carbonic Anhydrases, (Plenum Press; New York/London (1991))]. Hver av deres gener inneholder syv introner, mens MN-genet tilsynelatende mangler introner. Alle kjente karbonsyreanhydraser er dessuten proteiner på ca. 30 kd, og således mindre enn de p54/58N-relaterte produktene av MN-genet. Dessuten danner ikke karbonsyreanhydrasene oligomerer slik som de MN-relaterte proteinene.

Ut fra den predikerte aminosyresekvens er det klart at produktet av MN-genet er et basisk protein (pI 9,08), med ett potensielt N-glykosyleringssete lokalisert til aminosyreposisjonene 303-313. Disse observasjonene stemmer overens med det funn at p54/58N-proteiner fra HeLa-celler er følsomme overfor endo H- og endo F-spaltning som hver forårsaker et tap på ca. 3 kd. Hydrofiliteitsprofilen avdekker en hydrofob sekvens av aminosyrer (i stillingene 371-395) som sannsynligvis representerer det område som omfatter plasmamembranen og også inneholder et potensielt spaltningssignal. Profilen stemmer godt med den observasjon at p54/58N-proteiner er lokalisert på cellemembranen. I MN-aminosyresekvensen forekommer ingen PEST-regioner, hvilket tyder på at produktet av MN-genet er et stabilt lengelevende protein [Rogers et al., Science, 234: 364-368 (1986)]. Et slikt trekk forklarer vår erfaring med uvirksom metabolsk merking av p54/58N. Den deduserte aminosyresekvens oppviser også andre trekk, så som 10 potensielle fosforylerings- og 7 myristylerings-seter og 3 antigene determinanter.

For å avgjøre hvorvidt begge p54/58N-proteinene kodes for av ett gen, ble antisense ODN benyttet for spesifikt å inhibere MN-gen ekspresjon. [En oversikt over slik anvendelse av antisense ODN finnes hos Stein & Cohen, Cancer Res., 48: 2659-2668 (1988)]. En detaljert beskrivelse av disse forsøkene finnes i Eksempel 11. Funnene tydet på at dyrkingen av HeLa-celler med ODN resulterte i en betydelig inhibering av p54/58N-syntesen, mens mengden av de produserte ulike

HeLa-celleproteiner forble omtrent den samme. Det er dessuten vesentlig at den spesifikke inhibering av ODN ved immunblotting påvirket begge p54/58N-proteinene (Eksempel 11). Det ble således konkludert med at det klonede MN-gen koder for begge p54/58N-proteinene i HeLa-celler.

- 5 For å bekrefte hvorvidt det klonede gen koder for det p54/58N-spesifikke protein, ble det subklonet inn i den bakterielle ekspresjonsvektoren pGEX-3X [Pharmacia; Uppsala, Sverige], konstruert for å uttrykke et fusjonsprotein inneholdende C-terminalen av glutathion-S-transferase. Denne subkloning er representativ for en fremgangsmåte for genetisk å modellere et MN-relatert protein
- 10 i henhold til oppfinnelsen. Den følgende beskrivelse utgjør eksempler og er illustrative for oppfinnelsen.

Fremstilling av fusjonsproteinet pGEX-3X-MN

- cDNA-innskuddet fra det ovenfor beskrevne pBluescript-MN ble frigjort ved
- 15 oppkutting av plasmidet DNA med NotI. Det ble deretter behandlet med S1-nuklease for å oppnå butte ender og deretter klonet inn i et defosforylert SmaI sete til pGEX-3X (Pharmacia). Etter transformasjon av XL1-Blue-celler og induksjon med IPTG, ble det oppnådd et fusjonsprotein.

- Fusjonsproteinet, MN glutathion-S-transferase, ble renset ved affinitets-
- 20 kromatografi på Glutathione-S-Sepharose 4B (Pharmacia). 20 mikrogram av det rensede rekombinante protein i hver av to parallellprøver ble separert ved SDS-PAGE på en 10% gel. Den ene av prøvene (A) ble farvet med Coomassie brilliant-blått, mens den andre (B) ble blottet over på en Hybond C membran (Amersham; Aylesbury, Bucks, England). Blottet ble fremkalt ved autoradiografi med ¹²⁵I-
- 25 merket MAb M75.

- SDS-PAGE-analysen ga et interessant resultat: en rekke proteinbånd med forskjellige molekyllvekter. Et lignende SDS-PAGE mønster ble oppnådd med et annet representativt fusjonsprotein fremstillet i henhold til oppfinnelsen, beta-galaktosidase-MN, som ble uttrykt fra lambda gt11 lysogener. Det synes som om
- 30 disse mønstre skyldes translasjonsfeil forårsaket av nærværet av 9 tandem-repeterte AGGAGG kodoner i MN-sekvensen. I bakteriegener er dette kodoner som i stor utstrekning unngås på grunn av mangelen på tilsvarende tRNA. Under translasjonen av tandemrepeterte AGGAGG fra fremmed mRNA oppstår det

således +1 ribosomale rammeforskyvninger med høy frekvens (ca. 50%)
[Spanjaard et al., Nuc. Acid Res., 18: 5031-5036 (1990)].

Ved immunblotting ble et lignende mønster oppnådd: alle de bånd som kunne ses på favede SDS-PAGE reagerte med det MN-spesifikke MAb M75, 5 hvilket tyder på at alle proteinbåndene er MN-spesifikke. Dessuten tyder dette resultatet på at bindingssetet for MAb M75 er på den N-terminale del av MN-proteinet som ikke påvirkes av rammeforskyvninger.

Som vist nedenfor i Eksempel 8, ble fusjonsproteinet pGEX-3X-MN benyttet i radioimmunoassay for MN-spesifikke antistoff og for MN-antigen.

10

MN-proteiner og/eller polypeptider

Uttrykket "MN-proteiner og/eller polypeptider" (MN-proteiner/polypeptider) skal her stå for proteiner og/eller polypeptider som kodes for av et MN-gen eller fragmenter derav. Et eksempel på et foretrukket MN-protein er det som med den 15 predikerte aminosyresekvens er vist i Figur 1A-1B (SEKV ID NO: 2). Foretrukne MN-proteiner/polypeptider er de proteiner og/eller polypeptider som har betydelig homologi med MN-proteinet vist i Figur 1A-1B.

Et "polypeptid" er en kjede av aminosyrer som er kovalent bundet av peptidbindinger og som her ansees å være sammensatt av 50 eller færre 20 aminosyrer. Et "protein" er her definert som et polypeptid sammensatt av mer enn 50 aminosyrer.

Det vil være klart at et protein eller polypeptid dannet in vivo av en neoplastisk celle, vil kunne ha en endret sekvens i forhold til den som er dannet av en tumorcelle i cellekultur. MN-proteiner og/eller polypeptider som har varierende 25 aminosyresekvenser herunder uten begrensninger, aminosyresubstitusjoner, ekstensjoner, delesjoner, avkortninger og kombinasjoner derav, faller således innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse. Det vil også være klart at et protein som foreligger i kroppsvæsker er utsatt for nedbrytningsprosesser, så som proteolytiske prosesser. MN-proteiner som er betydelig avkortet, og MN-polypeptider, kan forekomme i kroppsvæsker, så som sera. Uttrykket "MN-antigen" 30 benyttes her om MN-proteiner og/eller polypeptider.

Det vil videre være klart at aminosyresekvensen av MN-proteiner og polypeptider kan endres gjennom genetiske teknikker. En eller flere aminosyrer kan bli utelatt eller substituert. Slike aminosyreforandringer behøver ikke forårsake

noen målbar forandring i den biologiske aktivitet av proteinet eller polypeptidet og resulterer i proteiner eller polypeptider som faller innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse.

MN-proteiner og polypeptider ifølge oppfinnelsen, kan i henhold til
5 oppfinnelsen fremstilles etter en rekke fremgangsmåter, for eksempel syntetisk eller ved rekombinasjon eller på annen biologisk måte, det vil si ved å spalte lengre proteiner og polypeptider enzymatisk og/eller kjemisk. En foretrukket fremgangsmåte for fremstilling av MN-proteiner er ved rekombinasjon. En særlig foretrukket fremgangsmåte for ved rekombinasjon å fremstille et MN-protein, er
10 beskrevet ovenfor for fusjonsproteinet pGEX-3X-MN.

Rekombinant dannelse av MN-proteiner og polypeptider

En representativ fremgangsmåte for å fremstille MN-protein vist i Figur 1A-1B eller fragmenter derav, ville være å skyte inn det passende fragmentet av
15 MN cDNA i en passende ekspresjonsvektor som eksemplifisert ovenfor. Det kan benyttes et bredt utvalg av vert-kloningsvektorkombinasjoner ved kloning av det MN DNA som er isolert som her beskrevet. For eksempel kan egnede kloningsbærere innbefatte kromosomale, ikke-kromosomale og syntetiske DNA-sekvenser, så som forskjellige kjente bakterielle plasmider, som pBR322, andre *E. coli*-
20 plasmider og deres derivater og "wider host range" plasmider, så som RP4, fag DNA, så som de tallrike derivatene av fag-lambda, f.eks. NB989 og vektorer avledet fra kombinasjoner av plasmider og fag-DNA, så som plasmider som er endret for å benytte fag-DNA-ekspresjonskontrollsekvenser. Plasmidet pGEX-3X er en foretrukket kloningsbærer.

25 Anvendelige verter kan være eukaryote eller prokaryote og innbefatter bakterieverter, så som *E. coli* og andre bakteriestammer, gjær og andre sopper, dyre- eller planteverter, så som dyre- eller planteceller i kultur, insektceller og andre verter. Selvsagt kan ikke alle vertene være like effektive. Det bestemte valg av kombinasjon av vert-kloningsbærer vil kunne foretas av fagmannen etter
30 iakttagelse av de ovenfor beskrevne prinsipper, uten å bevege seg utenfor rammen av oppfinnelsen.

Det bestemte sete som velges for å skyte inn det utvalgte DNA-fragment i kloningsbæreren for å danne et rekombinant DNA-molekyl, avgjøres av en rekke faktorer. Disse innbefatter størrelsen og strukturen av proteinet eller polypeptidet

som skal uttrykkes, det ønskede protein eller polypeptids ømfintlighet overfor endoenzymatisk nedbrytning av komponenter i vertscellen og forurensning med dens proteiner, ekspresjonskarakteristika, så som lokaliseringen av start- og stopp-kodoner og av andre faktorer som vil være kjent for fagmannen.

5 Det rekombinante nukleinsyremolekyl som inneholder MN-genet, et fragment av dette eller cDNA fra dette, kan benyttes for å transformere en vert slik at verten (transformanten) kan uttrykke det strukturelle gen eller et fragment av dette, og til å danne det protein eller polypeptid som det hybride DNA koder for. Det rekombinante nukleinsyremolekyl kan også benyttes for å transformere en vert
10 slik at verten ved replikasjon kan danne ytterligere rekombinante nukleinsyremolekyler som kilde for MN-nukleinsyre og fragmenter av denne. Valget av passende vert for begge disse anvendelser kontrolleres av en rekke kjente faktorer. Disse innbefatter for eksempel forlikelighet med den valgte vektor, giftigheten av biproduktene, bekvemmelighet ved gjenvinning av det ønskede
15 protein eller polypeptid, ekspresjonskarakteristika, biologisk ubetenkelighet og omkostninger.

Når vertscellen er en prokaryot så som E. coli, fremstilles kompetente celler som er i stand til DNA-opptak, fra celler høstet etter eksponensiell vekstfase og påfølgende behandling i henhold til CaCl_2 -metoden, etter velkjente frem-
20 gangsmåter. Transformasjon kan også foretas etter at det er dannet en protoplast av vertscellen.

Når den benyttede vert er en eukaryot, kan det benyttes transfeksjonsmetoder, så som bruk av kalsiumfosfat-utfelling, elektroporering, konvensjonelle mekaniske prosedyrer, så som mikroinjeksjon, innføring av et
25 plasmid innkapslet i røde blodlegemer eller i liposomer, behandling av celler med slike midler som lysofosfatidyl-cholin eller ved å benytte virusvektorer.

Produksjonsnivået av et protein eller polypeptid styres av tre hovedfaktorer:
(1) antallet av kopier av det gen eller den DNA-sekvens som koder for det i cellen;
(2) effektiviteten som disse gen- og sekvenskopier transkriberes og translateres
30 med og (3) stabiliteten av mRNA. Effektiviteten av transkripsjon og translasjon (som sammen utgjør ekspresjon) er på sin side avhengig av nukleotidsekvenser som normalt befinner seg foran den ønskede kodende sekvens. Disse nukleotidsekvensene eller ekspresjonskontrollsekvensene definerer blant annet det sted hvor en RNA-polymerase griper inn for å initiere transkripsjon

(promotersekvensen) og hvor ribosomer binder og virker sammen med mRNA (transkripsjonsproduktet) for å initiere translasjonen. Ikke alle slike ekspresjonskontrollsekvenser virker med samme effektivitet. Det er derfor fordelaktig å skille de spesifikt kodende sekvenser for det ønskede protein fra deres tilstøtende

5 nukleotidsekvenser og i stedet fusjonere dem til kjente ekspresjonskontrollsekvenser slik at høyere ekspresjonsnivåer favoriseres. Etter at dette er oppnådd kan det nylig modellerte DNA-fragment føres inn i et multikopiplasmid- eller et bakteriofag-derivat for å øke antallet av gen- eller sekvenskopier inne i cellen og derved ytterligere forbedre utbyttet av uttrykt protein.

10 Det kan benyttes flere ekspresjonskontrollsekvenser. Disse inkluderer operator-, promoter- og ribosombindings- og interaksjons-sekvensene (herunder slike sekvenser som Shine-Dalgarno-sekvensene) av laktose-operonet av E. coli ("lac-systemet"), de tilsvarende sekvenser av tryptofan-syntetasesystemet til E. coli ("trp-systemet"), en fusjon av trp- og lac-promoteren ("tac-systemet"),

15 hovedoperator- og promoter-områdene til fag-lambda ($O_L P_L$ og $O_R P_R$) og kontrollområdet for kappeprotein til fag fd. DNA-fragmenter som inneholder disse sekvensene tas ut ved spaltning med restriksjonsenzymmer fra det DNA som er isolert fra transduserende fag som bærer lac- eller trp-operonene, eller fra DNA fra fag-lambda eller fd. Disse fragmentene manipuleres deretter for å oppnå en

20 begrenset molekyldensitet slik at de essensielle kontrollerende sekvenser kan knyttes sammen meget nær eller i direkte forbindelse med det initierende kodon for den kodende sekvens.

Fusjonsproduktet settes deretter inn i en kloningsbærer for transformasjon eller transfeksjon av den passende vert og produksjonsnivået av antigen måles.

25 Celler som gir den mest effektive ekspresjon kan således selekteres. Alternativt kan kloningsbærere som bærer det lac-, trp- eller lambda- P_L -kontrollsystem som er knyttet til et initieringskodon, benyttes og fusjoneres til et fragment som inneholder en sekvens som koder for et MN-protein eller -polypeptid slik at genet eller sekvensen translateres korrekt fra det initierende kodon i kloningsbæreren.

30 Uttrykket "rekombinant nukleinsyremolekyl" er her å forstå som en hybrid-nukleotidsekvens som omfatter minst to nukleotidsekvenser, hvorav den første sekvens vanligvis ikke finnes sammen med den andre i naturen.

Uttrykket "ekspresjonskontrollsekvens" er her å forstå som en nukleotid-sekvens som styrer og regulerer ekspresjonen av strukturelle gener når den operativt kobles til disse gener.

5 Syntetisk og biologisk produksjon av MN-proteiner og -polypeptider

MN-proteiner og -polypeptider ifølge oppfinnelsen, kan foruten ved rekombinant teknikk, også fremstilles syntetisk eller på annen biologisk måte. Syntetisk dannelsen av polypeptidet eller proteinet fordrer kjemisk syntetisering av den ønskede aminosyrekjede ved hjelp av velkjente metoder. Et eksempel på andre biologiske metoder for fremstilling av det ønskede polypeptid eller protein er å utsette et lengre MN-polypeptid eller -protein som inneholder den ønskede aminosyresekvens for selektiv proteolyse. Således kan for eksempel det lengre polypeptid eller protein spaltes med kjemiske reagenser eller med enzymer.

Kjemisk peptidsyntese er vanlig innen området og kan for eksempel foretas ved fastfase-syntese i henhold til Merrifield [Merrifield, J., Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963); Kent et al., Synthetic Peptides in Biology and Medicine, 29 f.f. red. Alitalo et al., (Elsevier Science Publishers 1985); og Haug, J.D., "Peptide Synthesis and Protecting Group Strategy", American Biotechnology Laboratory, 5(1): 40-47 (jan./febr. 1987)].

Teknikker for kjemisk peptidsyntese innbefatter bruk av automatiske peptidsyntesemaskiner som gjør bruk av kommersielt tilgjengelige beskyttede aminosyrer, for eksempel Biosearch [San Rafael, CA (USA)] modell 9500 og 9600; Applied Biosystems, Inc. [Foster City, CA (USA)] modell 430; Milligen [en avdeling av Millipore Corp.; Bedford, MA (USA)] modell 9050; og Du Pont's RAMP (Rapid Automated Multiple Peptide Synthesis) [Du Pont Compass, Wilmington, DE (USA)].

Nukleinsyreprober og undersøkelses-sett

Nukleinsyreprober ifølge foreliggende oppfinnelse er slike som omfatter sekvenser som er tilnærmet komplementære til MN cDNA-sekvensen vist i Figur 1A-1B eller til MN-gensekvenser. Uttrykket "tilnærmet komplementære" er her definert til å ha den mening som er velkjent på området og som således benyttes i forbindelse med standard hybridiseringsbetingelser. Stringensen ved

hybridiseringsbetingelsene kan reguleres for å kontrollere presisjonen av komplementariteten.

Probene kan benyttes for å påvise MN DNA og/eller RNA og kan således benyttes for å undersøke på nærvær eller ikke av MN-gener, amplifikasjon(er),
 5 mutasjon(er) eller genetiske omleiringer av MN-gener i en pasients celler. For eksempel kan overekspresjon av et MN-gen påvises gjennom northern blotting ved å benytte prober i henhold til oppfinnelsen. Genforandringer som blant annet amplifikasjoner, translokasjoner, inversjoner og delesjoner, kan påvises ved å benytte prober ifølge oppfinnelsen for in situ hybridisering til kromosomer fra en
 10 pasients celler enten de er i metafase-spredning eller i kjerner i interfase. Southern blotting vil også kunne benyttes med probene ifølge oppfinnelsen for å påvise amplifikasjoner eller delesjoner av MN-gener. RFLP- (restriksjonsfragmentlengde polymorfisme) analyse i forbindelse med bruk av disse prober, er en foretrukket metode for påvisning av genforandringer, mutasjoner og delesjoner. Probene kan
 15 også benyttes for å identifisere MN-proteiner og/eller polypeptider så vel som homologer eller nære homologer til disse, gjennom deres hybridisering til diverse mRNA transkribert fra MN-gener i forskjellig vev.

Probene kan således ha nyttig diagnostisk/prognostisk anvendelse.

Probene kan inngå i undersøkelses-sett, fortrinnsvis med passende anordninger
 20 for å gjøre det mulig å synliggjøre probene når de hybridiseres til et passende MN-gen eller MN mRNA-mål. Prøvene innbefatter vevsprøver, kroppsvæsker og vev- og celleekstrakter.

Tester

25 I henhold til foreliggende oppfinnelse tilveiebringes prøveteknikk for å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen eller MN-spesifikke antistoff i prøver fra hvirveldyr, fortrinnsvis pattedyr, og særlig i humanprøver. Slike prøver inkluderer vevsprøver, kroppsvæsker, vevsekstrakter og celleekstrakter. MN-antigen kan påvises ved immunoassay, immunhistokjemisk farging, immunelektron- og sveipe-
 30 mikroskopi ved bruk av blant annet "immunogull".

Prøver som MN-antigen-bestemmelse fortrinnsvis kan foretas på er vevs- og/eller celleekstrakter. (Eksemplene 7 og 8 nedenfor er representative). MN-antigen kan imidlertid påvises i kroppsvæsker, herunder blant annet: blod, serum, plasma, sæd, brysteksudat, spytt, tårer, sputum, slim, urin, lymfe, cytosoler,

ascites, pleuraeffusjoner, fostervann, blæreutskyllinger, bronkoalveolære utskyllinger og cerebrospinalvæske. Det er å foretrekke at MN-antigenet er konsentrert fra et større volum av kroppsvæsken før undersøkelsen. Hvilke kroppsvæsker som foretrekkes for bestemmelsen avhenger av hvilken cancertype som det undersøkes for, men foretrukne kroppsvæsker vil i alminnelighet være

MN-spesifikke antistoff kan bindes av serologisk aktive MN-proteiner/polypeptider i prøver av slike kroppsvæsker som blod, plasma, serum, lymfe, slim, tårer, urin, spinalvæske og spytt. Slike antistoff finnes imidlertid oftest i blod, plasma og serum, fortrinnsvis i serum. En representativ prøve for påvisning av MN-spesifikke antistoff er vist senere i Eksempel 8, hvor fusjonsproteinet pGEX-3X-MN benyttes. Korrelering av resultatene fra bestemmelsene for å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen og MN-spesifikke antistoff som kan reagere med dette, gir et foretrukket bilde av en pasients sykdomstilstand.

Testene i henhold til denne oppfinnelse er både diagnostiske og/eller prognostiske, dvs. diagnostisk/prognostisk. Betegnelsen "diagnostisk/prognostisk" er her ment å omfatte følgende prosesser, enten hver for seg eller kumulativt, avhengig av den kliniske sammenheng: bestemmelse av sykdomsforekomsten, bestemmelse av en sykdoms natur, skjelning mellom én sykdom og en annen, forutsigelse av det sannsynlige utfall av en sykdomstilstand, bestemmelse av utsiktene for restitusjon fra en sykdom ut fra tilfellets natur og symptomer, overvåkning av en pasientens sykdomsstatus, overvåkning av tilbakefall av en sykdom og/eller bestemmelse av det foretrukne terapeutiske regime for en pasient. De diagnostiske/prognostiske metoder i henhold til oppfinnelsen, er for eksempel anvendelige for å foreta screening av populasjoner for forekomst av neoplastisk eller pre-neoplastisk sykdom, bestemme risikoen for å utvikle neoplastisk sykdom, diagnostisere tilstedeværelse av neoplastisk og/eller pre-neoplastisk sykdom, overvåke sykdomsstatus til pasienter med neoplastisk sykdom og/eller bestemme prognosen for forløpet av neoplastisk sykdom.

Foreliggende oppfinnelse er egnet til screening med henblikk på forekomst av et bredt utvalg neoplastiske sykdommer, innbefattet karsinomer, så som mamma-, urinveis-, ovarie-, uterus-, cervix-, endometrie-, plateepitel- og adeno-skvamøse karsinomer; hode- og hals-cancer; mesodermale svulster, så som neuroblastomer og retinoblastomer; sarkomer, så som osteosarkomer og Ewings

sarkom, samt melanomer. Av særlig interesse er gynekologiske kreftformer innbefattet ovarie-, uterus-, cervix-, vaginal-, vulva- og endometrie-kreft, særlig ovarie-, uterocervikal- og endometrie-kreft. Dessuten er kreft i bryst, mave, innbefattet spiserør, i tykktarm, nyre, prostata, lever, urinveier, innbefattet blæren, i lunge, og hode og hals, av særlig interesse.

Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter og utstyr for å vurdere sannsynligheten for forekomst av maligne eller premaligne celler, for eksempel i en cellegruppe nylig tatt fra en vert. En slik prøving kan benyttes for å påvise svulster, måle veksten av disse og bidra til sykdommens diagnose og prognose. Prøvingene kan også benyttes for å påvise forekomst av cancermetastase og til å fastslå fravær eller fjerning av alt svulstvev etter kirurgisk inngrep, cancer-kjemoterapi og/eller strålebehandling. De kan dessuten benyttes for å overvåke cancer-kjemoterapi og tumorresidiv.

Forekomsten av MN-antigen eller -antistoff, kan påvises og/eller kvantifiseres ved å benytte en rekke veldefinerte diagnostiske prøveteknikker. Fagmannen kan tilpasse konvensjonelle immunoassay-former for å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen og/eller -antistoff. Eksempel 8 gir detaljer angående former av en foretrukket diagnosemetode i henhold til oppfinnelsen, en radioimmunbestemmelse. Det finnes selvsagt mange andre formater for påvisning av MN-antigen og MN-spesifikke antistoff. Disse kan være western blott, ELISA (enzymbundet immunosorbenttester), RIA (radioimmunotest), kompetitiv EIA eller smørbrødteknikk (tosidig antistoff sandwichtester) som alle utgjør vanlig benyttede prøver innen diagnostikken. I slike immunotester er tolkningen av resultatene basert på den antagelse at antistoffet eller antistoffkombinasjonen ikke vil kryssreagere med andre proteiner og proteinfragmenter som forekommer i prøven og som ikke er relatert til MN.

En representativ type ELISA-test for MN-antigen er en form hvor en mikrotiterplate dekkes med antistoff produsert mot MN-proteiner/polypeptider eller antistoff mot helceller som uttrykker MN-proteiner, og til denne tilsettes en pasientprøve, for eksempel et vevs- eller celleekstrakt. Etter en inkuberingstid som gir ethvert antigen mulighet til å binde seg til antistoffene, vaskes platen, og det tilsettes et annet sett anti-MN-antistoff som er koblet til et enzym, hvorefter den inkuberes for at reaksjonen skal finne sted, hvorpå platen vaskes på nytt. Deretter tilsettes mikrotiterplaten enzymsubstrat og inkuberes i et tidsrom som gir enzymet

anledning til å virke på substratet, hvorpå adsorbansen av den endelige blanding måles. En stor forandring i adsorbans tyder på et positivt resultat.

For fagmannen på immunotestområdet vil det dessuten være klart at MN-proteiner og/eller polypeptider kan benyttes for å påvise og/eller kvantifisere
5 forekomst av MN-antigen i kroppsvæsker, vev og celler fra pasienter. I henhold til en slik utførelsesform benyttes en form for konkurrerende immunotest, hvor MN-protein/polypeptidet merkes og prøven av kroppsvæske tilsettes for å konkurrere om bindingen av det merkede MN-protein/polypeptid til antistoff som er spesifikke for MN-protein/polypeptid. En slik prøve kan benyttes for å påvise og/eller
10 kvantifisere MN-antigen som beskrevet i Eksempel 8.

I henhold til en annen utførelsesform kan det benyttes en immunmetrisk bestemmelse, hvor et merket antistoff produsert mot et MN-protein eller -polypeptid benyttes. Ved en slik bestemmelse er mengden av merket antistoff som bindes komplekst med det antigen-bundne antistoff direkte proporsjonalt med
15 mengden av MN-antigen i prøven.

En representativ prøve for å påvise MN-spesifikke antistoff, er en konkurransebasert bestemmelse, hvor merket MN-protein/polypeptid utfelles med antistoff i en prøve, for eksempel i kombinasjon med monoklonale antistoffer som gjenkjenner MN-proteiner/polypeptider. Fagmannen vil kunne modifisere
20 konvensjonelle immunotest-former for å påvise og/eller kvantifisere MN-spesifikke antistoff. Påvisning av bindingen av disse antistoff til det nevnte MN-protein/polypeptid, kan skje på mange kjente måter, f.eks. i human sammenheng ved bruk av anti-humant merket IgG.

Et eksempel på en immunotestmetode i henhold til oppfinnelsen for å
25 påvise og/eller mengdebestemme MN-antigen i en prøve fra et hvirveldyr, omfatter følgende trinn:

- a) inkubering av den nevnte hvirveldyr-prøve med ett eller flere sett av antistoff (et antistoff eller flere antistoff) som bindes til MN-antigen, hvor den ene settet er merket eller påvisbart på annen måte;
- 30 b) undersøkelse av den inkuberte prøve på nærvær av immunkomplekser som omfatter MN-antigen og de nevnte antistoff.

Et annet eksempel på en immunotestmetode i henhold til denne oppfinnelse, er den hvor det benyttes en konkurransebasert immunotest for å

påvise og/eller kvantifisere MN-antigen i en prøve fra et hvirveldyr, og hvor metoden omfatter følgende trinn:

- a) inkubering av prøve fra hvirveldyr med én eller flere sett av MN-spesifikke antistoff og en viss mengde merket, eller på annen måte påvisbart, MN-protein/polypeptid, hvor MN-protein/polypeptidet konkurrerer om binding til de nevnte antistoff med forekommende MN-antigen i prøven;
- b) undersøkelse av den inkuberte prøve for å bestemme mengden merket/påvisbart MN-protein/polypeptid bundet til de nevnte antistoff; og
- c) ut fra resultatet av undersøkelsen i trinn b) bestemmelse av hvorvidt MN-antigen forekommer i prøven og/eller av den forekommende mengde av MN-antigen i prøven.

Etter at det er fremstillet antistoff (innbefattet biologisk aktive antistoff-fragmenter) som har egnet spesifisitet, er et bredt utvalg av immunologiske undersøkelsesmetoder tilgjengelige for å bestemme dannelsen av spesifikke antistoff-antigenkomplekser. Det er i den vitenskapelige litteratur og patentlitteraturen beskrevet adskillige kompetitive og ikke-kompetitive proteinbindingsforsøk, og et stort utvalg av slike tester er kommersielt tilgjengelige. Eksempler på immunotest som er egnet for å påvise et serumantigen er slike som er beskrevet i US-patent 3.791.932; 3.817.837; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074 og 4.098.876.

De antistoff som benyttes i bestemmelsesmetodene kan være merkede eller umerkede. Umerkede antistoff kan benyttes ved agglutinerings-, merkede antistoff kan benyttes i et stort utvalg undersøkelser, ved bruk av et stort utvalg markører.

Passende deteksjonsanordninger innbefatter bruken av markører, så som radionuklider, enzymer, koenzymer, fluorescerende forbindelser, kjemiluminesensforbindelser, kromogener, enzymsubstrater eller kofaktorer, enzyminhibitorer, frie radikaler, partikler, farvestoff og lignende. Slike merkede reagenser kan benyttes i en rekke velkjente bestemmelsesmetoder, så som radioimmunoassay, enzym-immunoassay, f.eks. ELISA, fluorescens-immunoassay og lignende. Se for eksempel US-patent 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; og 4.233.402.

Fremgangsmåter for fremstilling av antistoff egnet for bestemmelsene i henhold til oppfinnelsen, er beskrevet nedenfor. Eksemplene nedenfor gir en utførlig beskrivelse av representative bestemmelser i henhold til oppfinnelsen.

Immunotest undersøkelses-sett

De ovenfor skisserte bestemmelsesmetoder kan innlemmes i undersøkelses-sett for å bestemme og/eller kvantifisere MN-antigen og/eller MN-spesifikke antistoff (inkludert biologisk aktive antistoff-fragmenter). Sett til påvisning og/eller kvantitering av MN-antigener kan omfatte MN-proteiner/-polypeptider og/eller polyklonale og/eller monoklonale MN-spesifikke antistoff. Slike diagnostiske/prognostiske undersøkelses-sett kan omfatte ett eller flere sett av polyklonale og/eller monoklonale antistoff, for en sandwich-form, hvor antistoff gjenkjenner epitoper på MN-antigenet og ett sett er passende merket eller påvisbart på annen måte.

Undersøkelses-sett for en prøvingsform hvor det forekommer konkurranse mellom et merket (eller på annen måte påvisbart) MN-protein/polypeptid og et MN-antigen i prøven, for binding til et antistoff, kan omfatte kombinasjonen av det merkede protein/polypeptid og antistoffet i mengder som fører til optimal følsomhet og nøyaktighet.

Undersøkelses-sett for MN-spesifikke antistoff omfatter fortrinnsvis merkede/påvisbare MN-proteiner og/eller -polypeptider, og kan omfatte andre eventuelt nødvendige komponenter, for eksempel for å foreta en foretrukket undersøkelse som den beskrevet i Eksempel 8 nedenfor. Slike undersøkelses-sett kan ha andre passende former for konvensjonelle bestemmelser.

Fremstilling av MN-spesifikke antistoff

Betegnelsen "antistoff" er her definert slik at det ikke bare innbefatter hele antistoff, men også biologisk virksomme fragmenter av antistoff, fortrinnsvis fragmenter som inneholder antigen-bindingsregionene. Slike antistoff kan fremstilles ved konvensjonell metodikk og/eller ved genetisk modellering. Antistoff-fragmenter kan fremstilles ved genetisk modellering, fortrinnsvis fra de variable regionene i lette og/eller tunge kjeder (V_H og V_L), inkludert de hypervariable regionene og helst fra både V_H - og V_L -regionene. For eksempel omfatter betegnelsen "antistoff" her polyklonale og monoklonale antistoff og biologisk aktive fragmenter derav, innbefattet blant andre muligheter, "univalente" antistoff [Glennie et al., *Nature*, 295: 712 (1982)]; Fab-proteiner innbefattet Fab'- og F(ab')₂-fragmenter enten de er kovalent eller ikke-kovalent aggregert; lette eller tunge

kjeder alene, fortrinnsvis variable tunge og lette kjederegioner (V_H - og V_L -regioner) og helst innbefattet de hypervariable regionene [ellers kjent som CDR (komplementaritetsbestemmende regioner) av de nevnte V_H - og V_L -regioner]; F_c -proteiner; "hybrid"-antistoff som kan binde mer enn ett antigen; konstant-variable regionkimærer; "kompositt" immunglobuliner med tunge og lette kjeder av ulike opprinnelse; "endrete" antistoff med forbedret spesifisitet og andre karakteristika som fremstillet ved standard rekombinant teknikk og også ved oligonukleotid-rettet mutageneseteknikk [Dalbadie-McFarland et al., PNAS (USA), 79: 6409 (1982)].

For terapeutisk bruk og/eller avbildningsanvendelse kan det være fordelaktig at antistoffene er biologisk aktive antistoff-fragmenter, fortrinnsvis genetisk modellerte fragmenter, særlig genetisk modellerte fragmenter fra V_H - og/eller V_L -regionene og helst omfattende de hypervariable regioner i disse.

Det finnes konvensjonelle teknikker for fremstilling av polyklonale og monoklonale antistoffer som er velkjent innen immunoassayområdet. Immunogener for å fremstille MN-spesifikke antistoff innbefatter MN-proteiner og/eller -polypeptider, fortrinnsvis rensede, og MX-infiserte tumorcellelinjer, for eksempel MX-infiserte HeLa-celler, blant andre immunogener.

Antipeptid-antistoff fremstilles også etter konvensjonelle metoder, som for eksempel beskrevet i europeisk patentpublikasjon nr. 44.710 (publisert 27. januar, 1982). I korte trekk fremstilles slike anti-peptid antistoff ved å velge et peptid fra en MN-aminosyresekvens, så som fra Figur 1A-1B, syntetisere den kjemisk, konjugere den til et passende immunogent protein og injisere den i et passende dyr, vanligvis en kanin eller en mus, hvorpå det dannes enten polyklonale eller monoklonale antistoff, sistnevnte ved hjelp av Kohler-Milstein-prosedyren.

Ved siden av konvensjonell hybridom-teknologi, kan det for fremstilling av antistoff i henhold til denne oppfinnelse, benyttes nyere teknologi. For eksempel har bruken av PCR (polymerasekjedereaksjon) for å klonere og uttrykke antistoff V -gener og fag-"display"-teknologi for å selekttere antistoffgen-kodende fragmenter med bindingsaktiviteter, resultert i isolering av antistoff-fragmenter fra repertoarer av PCR amplifiserte V -gener ved bruk av immuniserte mus eller mennesker. [Marks et al., BioTechnology, 10: 779 (juli, 1992) for referanse; Chiang et al., BioTechniques, 7(4): 360 (1989); Ward et al., Nature, 341: 544 (12. oktober, 1989); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); Clackson et al., Nature, 352:

624-628 (15. august, 1991); og Mullinax et al., PNAS (USA), 87: 8095 (oktober, 1990).

Beskrivelser av fremstilling av antistoff, en betegnelse som her er definert som innbefattende biologisk aktive antistoff-fragmenter, ved rekombinant teknikk, finnes i US-patent 4.816.567 (av 28. mars, 1989); europeisk patentsøknad, publisasjonsnr. (EP) 338.745 (publisert 25. oktober, 1989); EP 368.684 (publisert 16. juni, 1990); EP 239.400 (publisert 30. september, 1987); WO 90/14424 (publisert 29. november, 1990); WO 90/14430 (publisert 16. mai, 1990); Huse et al., Science, 246: 1275 (8. desember, 1989); Marks et al., BioTechnology, 10: 779 (juli 1992); La Sastry et al., PNAS (USA), 86: 5728 (august 1989); Chiang et al., BioTechniques, 7(40): 360 (1989); Orlandi et al., PNAS (USA), 86: 3833 (mai 1989); Ward et al., Nature, 341: 544 (12. oktober, 1989); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991); og Hoogenboom et al., Nucleic Acids Res., 19(15): 4133 (1991).

15 Fremstilling av monoklonale antistoff

Monoklonale antistoff for bruk ved tester i henhold til oppfinnelsen, kan oppnås etter fremgangsmåter som er velkjent på området, som for eksempel Galfre & Milstein, "Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures," i Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques, 73: 1-46 [Langone & Vanatis (red.); Academic Press (1981)]; og i den klassiske referanse Milstein & Kohler, Nature, 256: 495-497 (1975).

Selv om det representative hybridom ifølge denne oppfinnelse, dannes ved fusjon av cellerlinjer fra mus, kan humane/humane hybridomas [Olsson et al., PNAS (USA), 77: 5429 (1980)] og human/murine hybridomas [Schlom et al, PNAS (USA), 77: 6841 (1980); Shearman et al., J. Immunol., 146: 928-935 (1991); og Gorman et al., PNAS (USA), 88: 4181-4185 (1991)] også fremstilles. Slike "humaniserte" monoklonale antistoff skulle kunne være foretrukne monoklonale antistoff for terapeutiske anvendelser og avbildningsanvendelser.

Spesifikke monoklonale antistoffer for denne oppfinnelse kan fremstilles ved å immunisere passende pattedyr, fortrinnsvis gnagere og spesielt kanin eller mus, med et passende immunogen, for eksempel MaTu-infiserte HeLa-celler eller MN-proteiner/polypeptider, eventuelt festet til et bærerprotein. Produksjonen av VU-M75 hybridomer som sekreterer MAb M75 er et eksempel og dette er beskrevet nedenfor. MAb M75 tjener til å identifisere MN-proteiner/polypeptider i

forskjellige diagnostiske laboratorieundersøkelser, for eksempel i tumor-cellekulturer eller i kliniske prøver. Ved hjelp av metoden beskrevet for fremstilling av MAb M75 (isotype IgG2B) ble også MAb M16 (isotype IgG2A) og M67 (isotype IgG1) produsert.

5

MAb M75

Monoklonalt antistoff M75 (MAb M75) fremstilles av lymfocytisk hybridom fra mus, VU-M75, som opprinnelig ble deponert i Collection of Hybridomas ved Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Tsjekkoslovakia) under ATCC betegnelsen HB 11128 den 17. september, 1992 ved American Type Culture Collection (ATCC) i Rockville, MD (USA).

Hybridom VU-M75 ble fremstillet ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet i Gerhard, W., "Fusion of cells in suspension and outgrowth of hybrids in conditioned medium," i Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis, side 370 [Kennet et al., (red.); Plenum NY (USA)]. BALB/C mus ble immunisert med MaTu-infiserte HeLa-celler og miltceller fra disse fusjonert med myelomcellelinjen NS-0. Vevskulturmedier fra hybridomene ble underkastet screening med henblikk på monoklonale antistoffer ved som antigen, å benytte det p58 som var immunpresipitert fra celleekstrakter av MaTu-infiserte HeLa med kanin-anti-MaTu-serum og protein A-Staphylococcus aureus-celler (SAC) [Zavada & Zavadova, Arch. Virol., 118, 189-197 (1991)] og eluert fra SDS-PAGE gel. Monoklonale antistoff ble rensset fra TC-medier ved affinitets-kromatografi på protein A-Sepharose [Harlow & Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY (USA); 1988].

De monoklonale antistoff som i henhold til foreliggende oppfinnelse er egnet til å identifisere MN-proteiner/polypeptider, kan merkes på en hvilken som helst konvensjonell måte, for eksempel med enzymer, så som peroksydase fra pepperrot (HRP), fluorescerende forbindelser eller med radioaktive isotoper, så som ^{125}I . En foretrukket merking i henhold til foreliggende oppfinnelse er ^{125}I og en foretrukket metode for merking av antistoffene består i å benytte kloramin-T [Hunter, W.M., "Radioimmunoassay," i: Handbook of Experimental Immunology, s. 14.1-14.40 (D.W. Weir red.; Blackwell, Oxford/London/Edinburgh/Melbourne; 1978)].

30

MAB H460

Monoklonalt antistoff, H460 (MAB H460) ble fremstillet på lignende måte som MAB M75 bortsett fra at musene ble immunisert med HeLa-celler som ikke var infisert med MaTu og at muselymfocytter, i stedet for miltceller, ble fusjonert med celler fra myelomcellelinjen NS-0. MAB H460 reagerer omtrent likt med enhver humancelle.

Terapeutisk anvendelse av MN-spesifikke antistoff

De MN-spesifikke monoklonale og/eller polyklonale, fortrinnsvis monoklonale og helst MAB M75, antistoff ifølge oppfinnelsen, kan benyttes terapeutisk ved behandling av neoplastisk og/eller pre-neoplastisk sykdom, enten alene eller i kombinasjon med kjemoterapeutiske medikamenter eller toksiske midler, så som ricin A. Videre ville slike biologisk aktive antistoff-fragmenter som her er beskrevet, være å foretrekke for terapeutisk anvendelse. Foretrukne MN-spesifikke antistoff for slike terapeutiske anvendelser ville dessuten være humaniserte monoklonale antistoff.

De MN-spesifikke antistoffene kan administreres i en terapeutisk effektiv mengde, fortrinnsvis dispergert i en fysiologisk akseptabel, ugiftig, flytende bærer.

Antistoff for avbildningsformål

De MN-spesifikke antistoff i henhold til oppfinnelsen, kan benyttes for avbildningsformål når de kobles til et avbildningsmiddel, så som en radionuklide. Biologisk aktive antistoff-fragmenter eller humaniserte monoklonale antistoff ville være å foretrekke for avbildningsanvendelse.

En pasients neoplastiske vev kan identifiseres med hensyn til for eksempel setet for svulstene og lokalisering av eventuelle metastaser. Antistoff som er passende merket eller koblet til et avbildningsmiddel, kan i en fysiologisk akseptabel bærer injiseres i en pasient, og bindingen av antistoffene kan påvises ved hjelp av en metode egnet for merkingen eller avbildningsmidlet, for eksempel ved scintigrafi.

Antisense MN-nukleinsyresekvenser

MN-gener anses her for antatte onkogener, og proteinene som kodes for av disse anses å være antatte onkoproteiner. Antisense nukleinsyresekvenser som er tilnærmet komplementære til mRNA transkribert fra MN-gener, som antisense oligodeoksynukleotidene (ODN) i det nedenfor angitte Eksempel 11 representerer, kan benyttes for å redusere eller forhindre ekspresjon av MN-genet. [Zamecnick, P.C., "Introduction: Oligonucleotide Base Hybridization as a Modulator of Genetic Message Readout," s. 1-6, Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS, (Wiley-Liss, Inc., New York, NY (USA; 1991); Wickstrom, E., "Antisense DNA Treatment of HL-60 Promyelocytic Leukemia Cells: Terminal Differentiation and Dependence on Target Sequence," s. 7-24, id.; Leserman et al., "Targeting and Intracellular Delivery of Antisense Oligonucleotides Interfering with Oncogene Expression," s. 25-34, id.; Yokoyama, K., "Transcriptional Regulation of c-myc Proto-oncogene by Antisense RNA," s. 35-52, id.; van den Berg et al., "Antisense fos Oligodeoxyribonucleotides Suppress the Generation of Chromosomal Aberrations," s. 63-70, id.; Mercola, D., "Antisense fos and fun RNA," s. 83-114, id.; Inouye, Gene, **72**: 25-34 (1988); Miller and Ts'o, Ann Reports Med Chem., **23**: 295-304 (1988); Stein & Cohen, Cancer Res., **48**: 2659-2668 (1988); Stevenson & Inversen, J. Gen. Virol., **70**: 2673-2682 (1989); Goodchild, "Inhibition of Gene Expression by Oligonucleotides," s. 53-77, Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression (Cohen. J.S., red.; CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: 1989); Dervan et al., "Oligonucleotide Recognition of Double-helical DNA by triple-helix Formation," s. 197-210, id.; Neckers, L.M., "Antisense Oligodeoxynucleotides as a Tool for Studying Cell Regulation: Mechanisms of Uptake and Application to the Study of Oncogene Function," s. 211-232, id.; Leitner et al., PNAS (USA), **87**: 3430-3434 (1990); Bevilacqua et al., PNAS (USA), **85**: 831-835 (1988); Loke et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., **141**: 282-288 (1988); Sarin et al., PNAS (USA), **85**: 7448-7451 (1988); Agrawal et al., "Antisense Oligonucleotides: A Possible Approach for Chemotherapy and AIDS," International Union of Biochemistry Conference on Nucleic Acid Therapeutics (jan. 13-17, 1991; Clearwater Beach, Florida, USA); Armstrong, L., Ber. Week, s. 88-89 (5. mars, 1990); og Weintraub et al., Trends, **1**: 22-25 (1985)]. Ved hybridisering til MN mRNA, særlig i nærheten av ribosom-bindingssetet og translasjonsinitieringspunktet, inhiberer slike antisense

nukleinsyresekvenser, fortrinnsvis oligonukleotider, translasjon av mRNA. Bruken av slike antisense nukleinsyresekvenser kan således betraktes som en form for cancerterapi.

Foretrukne antisense oligonukleotider i henhold til oppfinnelsen er gen-
5 spesifikke ODN eller oligonukleotider som er komplementære til 5'-enden av MN mRNA. Særlig foretrukket er 29-mer ODN1 og 19-mer ODN2, og sekvensene for disse er angitt nedenfor i Eksempel 11. Disse antisense ODN er representative for de mange antisense nukleinsyresekvenser som kan bevirke inhibering av MN-genekspresjon. Fagmannen vil kunne fastslå passende antisense nukleinsyre-
10 sekvenser, fortrinnsvis antisense oligonukleotider, fra nukleinsyresekvensen i Figur 1A-1B.

Vaksiner

Det vil lett innsees at MN-proteiner og -polypeptider i henhold til
15 oppfinnelsen, kan inkorporeres i vaksiner som kan indusere beskyttende immunitet mot neoplastisk sykdom og ha en dempende effekt på tumorigen aktivitet. MN-proteiner og/eller -polypeptider kan syntetiseres eller fremstilles ved rekombinasjon eller på annen biologisk måte, slik at de omfatter én eller flere aminosyresekvenser tilsvarende én eller flere epitoper av MN-proteinene i
20 monomer eller i multimer form. Disse proteinene og/eller polypeptidene kan deretter inkorporeres i vaksiner som kan indusere beskyttende immunitet. Teknikker for å forbedre antigeniteten av slike polypeptider inkluderer inkorporering i en multimer-struktur, binding til en sterkt immunogen proteinbærer, for eksempel KLH ("keyhole limpet hemocyanin") eller difteri-toksoid og
25 administrasjon i kombinasjon med adjuvanter eller andre immunresponsforsterkere.

Foretrukne MN-proteiner/polypeptider for anvendelse i vaksiner i henhold til foreliggende oppfinnelse, vil være genetisk modellerte MN-proteiner. Et foretrukket rekombinant MN-protein er fusjonsproteinet pGEX-3X-MN, fremstillet i henhold til
30 oppfinnelsen.

Et eksempel på en foretrukket anvendelse av en slik vaksine i henhold til oppfinnelsen, er administrasjon til pasienter som kirurgisk har fått fjernet den MN-bærende primærcancer. Vaksinen kan indusere aktiv immunitet i pasientene og forhindre residiv eller metastase.

Det vil videre være klart at anti-idiotype antistoff for antistoff til MN-proteiner/polypeptider også vil være egnet som vaksiner og at disse kan formuleres på tilsvarende måte.

En aminosyresekvens tilsvarende en epitop på et MN-protein/polypeptid, enten i monomer eller multimer form, kan også oppnås ved kjemisk syntese eller ved å rense biologiske kilder, herunder også genetisk endrede mikroorganismer eller deres dyrkningsmedier [se Lerner, "Synthetic Vaccines", Sci. Am. 248(2): 66-74 (1983)]. Protein/polypeptidet kan være kombinert i en aminosyresekvens med andre proteiner/polypeptider iberegnet fragmenter av andre proteiner, som for eksempel når de syntetiseres som et fusjonsprotein eller kobles til andre antigene eller ikke-antigene polypeptider av syntetisk eller biologisk opprinnelse.

Uttrykket "tilsvarende en epitop av et MN-protein/polypeptid" skal forstås å inkludere den praktiske mulighet at aminosyresekvensvariasjoner i et naturlig forekommende protein eller polypeptid i enkelte tilfeller kan være antigene og gi beskyttende immunitet mot neoplastisk sykdom og/eller antitumorogene effekter. Mulige sekvensvariasjoner innbefatter, uten begrensning, aminosyresubstitusjoner, ekstensjoner, delesjoner, forkortninger, interpolasjoner og kombinasjoner derav. Slike variasjoner faller innenfor oppfinnelsens tiltenkte ramme under forutsetning av at det protein eller polypeptid som inneholder disse, er immunogent og at antistoff som frembringes av et slikt polypeptid eller protein kryssreagerer med naturlig forekommende MN-proteiner og -polypeptider i tilstrekkelig grad til å gi beskyttende immunitet og/eller antitumorogen aktivitet ved administrering som vaksine.

Slike vaksinepreparater vil bli kombinert med et fysiologisk akseptabelt medium, herunder immunologisk akseptable fortynningsmidler og bærere, samt vanlig benyttede hjelpestoffer, så som Freund's komplette adjuvans, saponin, alun og lignende. Administrasjon vil bli foretatt i immunologisk effektive mengder av MN-proteinene eller -polypeptidene, fortrinnsvis i mengder som gir enhetsdoser fra 0,01 til 10,0 mikrogram av det immunologisk aktive MN-protein og/eller -polypeptid per kg legemsvekt. Fullstendig beskyttende doser kan variere fra 0,1 til ca. 100 mikrogram antigen.

Administrasjonsmåte, antigendose, antall og hyppigheten av injeksjoner er gjenstand for optimalisering som fagmannen vil kunne foreta.

De følgende eksempler er gitt som illustrasjon.

Materialer og metoder

Følgende materialer og metoder ble benyttet i eksemplene nedenfor.

5 MaTu-infiserte og uinfiserte HeLa-celler

MaTu-agens [Zavada et al., Nature New Biol., 240: 124-125 (1972); Zavada et al., J. Gen. Virol., 24: 327-337 (1974)] var fra opprinnelige "MaTu"-celler [Widmaier et al., Arch. Geschwulstforsch., 44: 1-10 (1974)] som var overført til vårt forråd av HeLa ved kokultivering med MaTu-celler behandlet med mitomycin C, for
 10 å sikre at kontroll- og MaTu-infiserte celler var sammenlignbare. MaTu-celler ble inkubert i 3 timer ved 37°C i medier inneholdende 5 µg/mL mitomycin C [Calbiochem, LaJolla, CA (USA)]. Blandingskulturer av 2×10^5 mitomycin C-behandlede celler og 4×10^5 friske recipientceller i 5 mL medium ble satt igang. Etter 3 dager ble de først dyrket i subkultur og deretter underkastet passasje 1-2
 15 ganger per uke. Kontroll-HeLa-cellene var de samme som dem beskrevet i Zavada et al., Nature New Biol., 240: 124-125 (1972).

Sera

Humane sera fra cancerpasienter, fra pasienter med forskjellige ikke-
 20 tumorplager og fra friske kvinner, ble oppnådd fra Clinics of Obstetrics and Gynaecology ved Postgraduate Medical School, Bratislava, Tsjekkoslovakia.

De humane sera KH var fra et mammakarsinom fra en 50 år gammel pasient, 14 måneder etter reseksjon. Dette serum var et av de to sera av totalt 401 serumprøver som inneholdt nøytraliserende antistoff mot den VSV(MaTu)
 25 pseudotype som er beskrevet av Zavada et al., Nature New Biology, 240: 124-125 (1972). Serum L8 var fra en pasient med Pagets sykdom. Serum M7 var fra en frisk donor.

Kanin anti-MaTu-serum ble fremstillet ved å immunisere en kanin tre ganger med tidsintervaller på 30 dager med $10^{-5} \times 10^7$ levende MaTu-infiserte
 30 HeLa-celler.

RIP og PAGE

RIP og PAGE ble foretatt i det vesentlige som beskrevet i Zavada et Zavadova, Arch. Virol., 118: 189-197 (1991), bortsett fra at det i de her beskrevne

forsøk ble benyttet [³⁵S]metionin (NEN), 10 µCi/mL metionin-fritt MEM medium, supplert med 2% FCS og 3% komplett MEM. Konfluente petriskål- cellekulturer ble inkubert over natten i dette medium.

For RIP ble SAC-prosedyren [Kessler, J. Immunol., **115**: 1617-1624 (1975)] benyttet. Alle inkubasjoner og sentrifugeringer ble foretatt ved 0-4°C. Celle-monolag ble ekstrahert med RIPA-buffer (0,14M NaCl, 7,5 mM fosfat-buffer, pH 7,2, 1% Triton X-100, 0,1% natriumdeoksykolat, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid og Trasylol). For å undertrykke ikke-spesifikke reaksjoner ble antisera preabsorbent med føtalt kalveserum [Barbacid et al., PNAS (USA), **77**: 1617-1621 (1980)] og antigene ekstrakter med SAC.

For PAGE (under reduserende betingelser) benyttet vi 10% gel med SDS [Laemmli, Nature, **227**: 680-685 (1970)]. Som proteiner for å markere referansen tjente Sigma-settet (produkt MW-SDS-200). Til fluorografi benyttet vi salicylat [Heegaard et al., Electrophoresis, **5**: 263-269 (1984)].

15

Immunblott

Immunblotting anvendt som beskrevet her, følger metoden til Towbin et al., PNAS (USA), **76**: 4350-4354 (1979). Proteinene ble overført fra de respektive gel til nitrocellulose [Schleicher & Schuell; Dassel, Tyskland; 0,45 µm porøsitet] i Laemmli elektrode-buffer fortynnet 1:10 med destillert vann, uten metanol eller SDS. Overføringen pågikk i 2 1/2 time ved 1,75 mA/cm². Blottene ble fremkalt med ¹²⁵I-merket MAb, og autoradiografi ble foretatt under bruk av intensiverende gittere, med røntgenfilmer eksponert ved -70°C.

I ekstrakter fra cellekulturer som kun inneholdt små mengder MN-antigen, konsentrerte vi antigenet fra 0,5 eller 1 mL av et ekstrakt ved å tilsette 50 µL av en 10% SAC-suspensjon, på forhånd ladet med MAb M75. Denne metode tillot konsentrering av MN-antigenet selv fra kliniske prøver som inneholdt humant IgG. Forutgående kontrollforsøk viste at en slik metode ikke interfererte med binding av MN-antigenet til SAC-adsorbent M75. Vevsekstraktene ble fremstillet ved å male vevet med sand (analytisk kvalitet) med morter og pistill. Homogenatene ble tilsatt RIPA-buffer, 10:1 (volum til vekt) av opprinnelig vev. Ekstraktene ble klarnet i 3 minutter ved hjelp av en Eppendorf sentrifuge.

Eksempel 1

Immunfluorescens av MaTu-spesifikke antigener

Immunfluorescenseksperimenter ble foretatt på kontroll- og MaTu-infiserte HeLa-celler med monoklonale antistoff, fremstillet som beskrevet ovenfor, som er spesifikke for MaTu-beslektede antigener. FITC-konjugert anti-mus IgG ble benyttet for å påvise nærvær av de monoklonale antistoffene. Giemsaifarving av cellene viste ingen klar forskjell mellom kontroll- og MaTu-infiserte HeLa-celler.

MAB, som i forutgående undersøkelser hadde vist seg å være spesifikke for MaTu-beslektede antigener, oppviste to forskjellige reaktiviteter ved immunfluorescens. En representant for den første gruppen, MAb M67, ga en granulær cytoplasmatisk fluorescens i MaTu-infiserte HeLa, som kun ble observert i celler fiksert med aceton; levende celler oppviste ingen fluorescens. MAb M16 ga samme type fluorescens. Både med M67 og M16 ble det bare registrert ekstremt svak "bakgrunns" fluorescens i kontroll-HeLa-celler.

Et annet MAB, M75, oppviste en granulær membranfluorescens på levende MaTu-infiserte celler og en granulær kjerne-fluorescens i acetonfikserte celler. M75 oppviste imidlertid enkelte ganger en lignende, om enn meget svakere, fluorescens på uinfiserte HeLa-celler. En sammenheng basert på vekstbetingelsene ble iaktatt: i HeLa-celler som var uinfisert med MaTu, ble begge typer fluorescens med MAb M75 bare iaktatt dersom cellene var dyrket gjennom flere passasjer i tette, men ikke i sparsomme, kulturer.

Mengden av M75-reaktive celleoverflateantigener ble analysert cytofluorometrisk og var avhengig av cellekulturenes tetthet og av infeksjon med MaTu. Kontroll- og MaTu-infiserte HeLa-celler ble dyrket i 12 dager i tette eller sparsomme kulturer. Cellene ble frigjort med Versene (EDTA) og inkubert med MAb M75 eller uten MAB og deretter inkubert med FITC-konjugert anti-mus IgG. Fluorescensintensiteten ble målt.

Det viste seg at antigenbindingen MAb M75 er induserbar, idet den viste seg å ikke forekomme i kontroll-HeLa dyrket i sparsom kultur og til å bli indusert enten av veksten av HeLa i tett kultur eller ved infeksjon med MaTu. Disse to faktorene ble funnet å ha additiv eller synergistisk effekt. Disse observasjonene, sammen med andre resultater som her er beskrevet, tydet på at to ulike agens var involvert: eksogent, overførbart MX, reaktivt med M67, og endogent, induserbart MN, påvist med MAB M75.

Eksempel 2

Immunblott-analyse av proteiner som reagerer med MAb M75

For å avgjøre hvorvidt MAb M75 reagerer med det samme protein i både uinfisert og MaTu-
 5 uinfisert HeLa og for å bestemme proteinets molekylvekt, ble ekstrakter av disse cellene analysert ved PAGE og immunblotting (som beskrevet ovenfor). Uinfiserte eller MaTu-infiserte HeLa-celler som var dyrket i 12 dager i tette eller sparsomme kulturer, ble utsådd i 5 cm petriskåler i 5×10^5 celler per disk i alle varianter. 2 dager senere ble cellene ekstrahert med RIPA-buffer (beskrevet
 10 ovenfor), 200 μ L/skål. Ekstraktene ble blandet med 2x konsentrert Laemmli-prøvebuffer inneholdende 6% merkaptoetanol og kokt i 5 minutter. Proteiner ble separert ved SDS-PAGE og blottet over på nitrocellulose. Blottene ble fremkalt med 125 I-merket MAb M75 og autoradiografi.

MAb M75 reagerte med to MN-spesifikke proteinbånd på 54 kd og 58 kd, som var de samme i uinfisert HeLa dyrket ved høy tetthet og i MaTu-infiserte
 15 HeLa, hvilket tyder på at M75 gjenkjenner de samme proteiner i både uinfiserte og MaTu-infiserte HeLa-celler. I overensstemmelse med de cytofluorometriske resultatene avhang mengden av antigenet både av celletetthet og av infeksjon med MaTu, idet sistnevnte er en vesentlig mer potent induser av p54/58N.

20

Eksempel 3

Radioimmunoassay av MaTu-spesifikke antigener in situ

I motsetning til resultatene med M75, viste den andre MAb M67 seg å være spesifikk for det eksogene, overførbare agens MX. Med M67 iakttok vi ingen
 25 immunfluorescens i kontroll-HeLa enten cellene var dyrket i tett eller i sparsom kultur. Denne forskjell fremgikk klart ved radioimmunoassay-eksperimenter, hvor 125 I-merket MAb M67 og M75 ble benyttet.

For disse eksperimentene ble parallelle kulturer av uinfiserte og MaTu-infiserte celler dyrket i tette eller sparsomme kulturer. Kulturene var enten levende
 30 (uten fiksering) eller fiksert (med metanol i 5 minutter og lufttørket). Kulturene ble inkubert i 2 timer i petriskåler med de 125 I-merkede MAb, 6×10^4 cpm/skål. Deretter ble skålene rensert fire ganger med PBS og solubilisert med 1 mL 2N NaOH per skål og radioaktiviteten bestemt med en gammateller.

Den enkle radioimmunoassay ble i dette eksempel foretatt direkte i petriskål-kulturer. Seksten varianter av denne radioimmunoassay satte oss i stand til å fastslå hvorvidt MX- og MN-antigenene er lokalisert på overflaten eller i det indre av cellene, og hvorledes ekspresjonen av disse to antigener avhenger av infeksjonen med MaTu og av den tetthet som cellene var dyrket i før utsåing av petriskålene. I levende, ufikserte celler kan bare celleoverflate-antigener binde MAb. I disse cellene viste M67 ingen reaksjon med noen variant av kulturrene, mens M75 reagerte i overensstemmelse med resultatene fra Eksempel 1 og 2.

Fiksering av cellene med metanol gjorde cellemembranen permeabel overfor MAb: M67 reagerte med HeLa infisert med MaTu uavhengig av tidligere celletetthet, og bandt seg ikke til kontroll-HeLa. MAb M75 i metanol-fikserte celler bekreftet fravær av korresponderende antigen i uinfiserte HeLa fra sparsomme kulturer og induksjon av dette både ved vekst i tette kulturer og ved infeksjon med MaTu.

Eksempel 4

Påvisning av MaTu-komponenter som er reaktive med animale sera eller assosiert med VSV-virioner

Immunblott-analyser av MaTu-spesifikke proteiner fra RIPA-ekstrakter fra uinfiserte eller MaTu-infiserte HeLa og fra renset VSV reprodusert i kontrollceller og i MaTu-infiserte HeLa, viste hvilke av antigenene, p58X eller p54/58N, som ble radioimmunpresipitert med animalske sera og hvilke av dem som var ansvarlig for komplementering av VSV-mutanter og for dannelse av pseudotype virioner.

Detaljer angående disse fremgangsmåtene finnes i Pastorekova et al., Virology, 187: 620-626 (1992).

Serum av kanin immunisert med MaTu-infiserte HeLa, immunpresipiterte både MAb M67- og MAb M75-reaktive proteiner (både p58X og p54/58N), mens de "spontant" immune sera fra normal kanin, sau eller leukemisk ku, bare immunpresipiterte det M67-reaktive protein (p58X). I VSV som var reprodusert i MaTu-infiserte HeLa-celler og senere renset, forekom derimot bare de M75-reaktive bånd av p54/58N. Det ble således konkludert med at MX og MN er uavhengige komponenter av MaTu og at det var p54/58N som var komplementær til VSV-mutanter og ble satt sammen til pseudotype virioner.

Som vist i Figur 2A og diskutert nedenfor i Eksempel 5, ble MX-antigenet funnet å forekomme i MaTu-infiserte fibroblaster. Av Zavada & Zavadova (1991) ble det rapportert at et p58-bånd fra MX-infiserte fibroblaster ikke kunne påvises ved RIP med kanin-anti-MaTu-serum. Dette serum inneholder mer antistoff mot MX- enn mot MN-antigen. Forskjellen kan forklares gjennom den ekstremt langsomme spredning av MX i infiserte kulturer. Resultatene rapportert av Zavada & Zavadova (1991) var fra fibroblaster testet 6 uker etter infeksjon, mens den siste testing var 4 måneder etter infeksjon. Vi har ved immunblott funnet at MX først kan påvises i både H/F-N- og H/F-T-hybrider etter 4 uker, i HeLa-celler etter 6 uker og i fibroblaster bare 10 uker etter infeksjon.

Eksempel 5

Ekspresjon av MN- og MX-spesifikke proteiner

Figur 2A-2B illustrerer grafisk ekspresjonen av MN- og MX-spesifikke proteiner i humane fibroblaster, i HeLa-celler og i H/F-N- og H/F-T-hybridceller og motsvarer ekspresjonen i MX-infiserte og uinfiserte celler. Cellene ble infisert med MX ved kokultivering med mitomycin C-behandlede MX-infiserte HeLa. Infiserte og uinfiserte celler ble dyrket gjennom tre passasjer i tette kulturer. Ca. 4 måneder etter infeksjon ble infiserte celler dyrket i petriskåler parallelt med uinfiserte celler for å danne tette monolag.

Radioimmunoassay ble foretatt direkte i konfluente cellekulturer i petriskåler (5 cm), fiksert med metanol i det vesentlige som beskrevet ovenfor i Eksempel 3. Monolagene ble fiksert med metanol og behandlet med ^{125}I -merket MAb M67 (spesifikk for eksogent MX-antigen) eller M75 (spesifikt for endogent MN-antigen) ved 6×10^4 cmp/skål. Den bundne radioaktivitet ble målt, og resultatene vist i Figur 2A-2B.

Figur 2A viser at MX ble overført til alle fire undersøkte cellelinjer, det vil si til humane embryofibroblaster, til HeLa og til både H/F-N- og H/F-T-hybrider. Derimot var alle fire uinfiserte motsvarende cellelinjer MX-negative. Figur 2B viser at MN-antigener forekommer i både MX-infiserte og uinfiserte HeLa og H/F-T-celler, men ikke i fibroblastene. Det ble ikke funnet MN-antigen i kontrollen H/F-N, og bare en minimal økning i forhold til bakgrunnen av MN-antigen ble funnet i MaTu-infisert H/F-N. Det ble således fastslått at ekspresjon av MN-antigen i hybridene korrelerte meget sterkt med tumorigeniteten.

Disse resultatene stemte overens med resultater oppnådd ved immunblotting. Det MN-spesifikke tvillingprotein p54/58N, ble påvist ved immunblotting i HeLa-cellelinjer (begge våre standardtyper, dvs. HeLa K, og i Stanbridge-mutanten av HeLa, dvs. D98/AH.2 eller HeLa S) og i tumorogent H/F-T. Derimot ble p54/58N ikke påvist hverken i fibroblastene eller i det ikke-tumorogene H/F-N selv etter bevisst lang eksponering av filmen benyttet til påvisning av radioaktivitet. Infeksjon av HeLa-cellene med MX resulterte i en sterk økning av konsentrasjonen av p54/58N-proteinene.

Hybridcellene H/F-N og H/F-T ble konstruert av Eric J. Stanbridge [Stanbridge et al., Somatic Cell Genetics, 7: 699-712 (1981); og Stanbridge et al., Science, 215: 252-259 (1982)]. Hans opprinnelige hybrid, fremstillet ved fusjon av en HeLa-celle og et humant fibroblast var ikke tumorogent i nakne mus selv om det bibeholdt enkelte egenskaper ved transformerte celler, som for eksempel vekst på mykagar. Skjeldne segreganter fra hybridene som har mistet kromosom 11 er tumorogene. Den mest sannsynlige forklaringen for tumorogeniteten i disse segregantene er at kromosom 11 inneholder et suppressor-gen (et anti-onkogen) som blokkerer ekspresjonen av et hittil ukjent onkogen. Det onkoprotein som dette onkogen koder for er avgjørende for H/F-hybridenes kapasitet for tumordannelse i nakne mus. Siden p54/58N-proteinet viser korrelasjon med tumorogenisiteten av H/F-hybridene, er det en kandidat for dette antatte onkoprotein.

Eksempel 6

Immunblott av MN-antigen fra humane tumorcellekulturer og fra kliniske prøver av humant vev

Sammenhengen mellom MN-antigen og tumorogeniteten i H/F-hybridceller som vist gjennom Eksempel 5, førte til undersøkelse med henblikk på forekomst av MN-antigen i andre humane tumorcellekulturer og i kliniske prøver. Forutgående forsøk tydet på at konsentrasjonen av MN-antigen i ekstraktene fra andre humane tumorcellekulturer var lavere enn i HeLa, og det ble derfor innsett at autoradiograferingen ville fordre lang eksponering. Metodens følsomhet ble derfor forbedret gjennom metoden angitt under materialer og metoder: Immunblotting, ovenfor, hvor MN-antigenet ble konsentrert ved presipitasjon med MAb M75-ladet SAC.

Immunblott av MN-proteiner i cellekulturekstrakter ble fremstillet fra følgende: (A) MX-infiserte HeLa-celler; (B) humane fibroblaster; (C) T24; (D) T47D; (E) SK-Mel 1477; og (F) HeLa-celler uinfisert med MX. Proteinene ble separert ved PAGE etter oppvarming i en prøvebuffer, enten med eller uten 3% merkapttoetanol (henholdsvis + ME eller 0 ME). Det ble således foretatt en elektroforese for hvert ekstrakt + ME og deretter 0 ME. I bane (A) (cellekulturekstraktet fra MX-infiserte HeLa-celler) ble analysert direkte (10 µL per bane), mens antigenene fra de øvrige ekstraktene (bane B-E) hver ble konsentrert fra et 500 µL ekstrakt ved presipitasjon med MAb M75 og SAC. Immunblottene indikerte at to andre humane karsinomcellelinjer inneholdt MN-relaterte proteiner -- T24 -- (blærekarzinom; bane C) og T47D (mammakarzinom; bane D). Disse cellene inneholder proteiner som reagerer med MAb M75 som under reduserende betingelser har molekyllvekter på 54 kd og 56 kd og under ikke-reduserende betingelser har en molekyllvekt på ca. 153 kd. Intensiteten av de to båndene var minst 10 ganger lavere enn tilsvarende for p54/58N tvillingproteinene fra HeLa-celler.

Et ekstremt svakt bånd ved ca. 52 kd kunne under reduserende betingelser, iaktas fra ekstrakter fra humane melanomceller (SK Mel 1477; bane E), men ingen bånd for humane fibroblastekstrakter (bane B) kunne sees hverken på reduserende eller ikke-reduserende gel.

Immunblott av humane vevsekstrakter, herunder kirurgiske prøver, ble sammenlignet med tilsvarende for celleekstrakter fra MX-infisert HeLa (bane A). Vevsekstraktene i de øvrige banene ble fremstillet fra følgende: (B) full-term placenta; (C) corpus uteri; (D, M) adenocarcinoma endometrii; (E, N) carcinoma ovarii; (F, G) trofoblaster; (H) normalt ovarium; (I) myoma uteri; (J) mammapapillom; (K) normal mammakjertel; (L) hyperplastisk endometrium; (O) cervikalt karsinom; og (P) melanom. Det MN-relaterte antigen fra samtlige ekstrakter med unntak av bane A (analysert direkte med 10 µL per bane) ble først konsentrert fra et 1 mL ekstrakt, som ovenfor forklart. MN-proteiner ble funnet i endometrie-, (bane D og M), ovarie- (bane E og N) og i uterus-cervix- (bane O) - karsinomer. I disse ekstraktene ble MN-relaterte proteiner funnet i tre bånd som hadde molekyllvekter på mellom ca. 48 kd og ca. 58 kd. Et annet MN-relatert

protein forekom i vevsekstrakter fra et mamma-papillom. Dette protein ble registrert som et enkelt bånd ved ca. 48 kd (bane J).

Klart negative var ekstraktene fra fullbåret placenta (bane B), normale brystkjertler (bane K), hyperplastisk endometrium (bane L), normale ovarier (bane H) og fra uterine myomer (bane I). Bare ekstremt svake MN-relaterte bånd ble sett i ekstrakter fra trofoblaster (bane F og G) og fra melanom (bane P).

Registreringene av at antigen relatert til p54/58N ble uttrykt i kliniske prøver av flere typer humane karsinomer, men ikke i normalt vev fra tilsvarende organer, styrker ytterligere assosiasjonen av MN-antigen med tumorigenese. Når det gjelder humane svulster skal det imidlertid bemerkes at et normalt vev aldri virkelig utgjør en adekvat kontroll da svulster antas ikke å oppstå fra modne differensierte celler, men snarere fra enkelte stamceller som er i stand til deling og differensiering. I kroppsorganer kan slike celler være ganske skjeldne.

15 Eksempel 7

MN-antigen i animalske celledinjer

Siden MN-genet forekommer i det kromosomale DNA i alle undersøkte hvirveldyrarter, ble det lett etter MN-relaterte antigen også i celledinjer som skriver seg fra normalt vev og fra svulster fra flere dyrearter. MN-relatert protein ble funnet i to celledinjer fra rotte, hvorav den ene var XC-celledinjen avledet fra rotte-rhabdomyosarkom induisert med Rous sarkom-virus, mens den andre var rotte-2-Tk⁻-celledinjen. I ekstrakter fra begge disse celledinjene fra rotte ble det på blottene funnet et enkelt proteinbånd. Molekylvekten for dette på blott produsert på en reduserende gel og fra en ikke-reduserende gel, var henholdsvis 53,5 kd og 153 kd.

Immunblott av MN-proteiner ble fremstillet fra (A) MX-infiserte HeLa-celler og fra (B) rotte-Tk⁻-celler [hvor proteinene, som angitt ovenfor, ble separert ved PAGE etter oppvarming i en prøvebuffer med 3% merkapttoetanol (+ ME) eller uten 3% merkapttoetanol (0 ME)]. Konsentrasjonen av MN-antigen i disse to celledinjene syntes å være like både i + ME og 0 ME sammenligningene. Ekstraktene ble analysert direkte (40 µL per bane).

MN-relaterte proteiner fra XC-celler viste det samme mønster som rotte-2-Tk⁻-celler både under reduserende og ikke-reduserende betingelser, bortsett fra at konsentrasjonen var ca. 30 x lavere. Funnet av et MN-relatert protein, p53.5N, i

to cellelinjer fra rotte (de nettopp diskuterte immunblott og Figur 4) danner basis for et modellsystem.

Ingen av de undersøkte cellelinjer fra andre dyr inneholdt påvisbare mengder av MN-antigen selv når den høyst sensitive immunblott-teknikken hvor MN-antigenene konsentreres, ble benyttet. De MN-negative cellene var: Vero-celler (grønn marekatt); muse-L-celler; muse-NIH-3T3-celler enten disse er normale, infisert med Moloney-leukemivirus eller transformert med Harvey-sarkom-virus; GR-celler (mus-mammatumorceller induisert med MTV) og NMG-celler (normal mammakjertel fra mus).

Eksempel 8

Radioimmunoassay i flytende fase under bruk av rekombinant MN-protein for MN-spesifikke antistoff og for MN-antigen

Det genetisk modellerte MN-protein, fusjonert med glutation-S-transferase, pGEX-3X-MN, fremstillet og rensert som beskrevet ovenfor, ble merket med ^{125}I etter kloramin-T-metoden [Hunter (1978)]. Det rensede protein muliggjorde utvikling av en kvantitativ RIA for MN-spesifikke antistoff så vel som for MN-antigener. Alle fortynninger av antistoff og antigener ble fremstillet i RIPA-buffer (1% TRITON X-100 og 0,1% natriumdeoksykholat i PBS (fosfat-bufret salt-oppløsning), pH 7,2) som ble tilsatt 1% føtalt kalveserum (FCS). Vevs- og celle-ekstrakter ble fremstillet i RIPA-buffer inneholdende 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid og 200 trypsin-inhiberende enheter av Trasylol (aprotinin) per mL, uten FCS. ^{125}I -merket pGEX-3X-MN-protein (2,27 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ TCA-presipiterbart protein) ble før bruk fortynnet med RIPA + 1% FCS og ikke-spesifikt bindende radioaktivitet ble adsorbert med en suspensjon av fikserte protein A-Staphylococcus aureus-celler (SAC).

I en RIA for MN-spesifikke antistoff ble MAb-holdige ascitesvæsker eller testsera blandet med ^{125}I -merket protein, hvorefter de fikk reagere i et totalvolum på 1 mL i 2 timer ved romtemperatur. Deretter ble 50 μL av en 10% suspensjon av SAC [Kessler, ovenfor] og blandingen inkubert i 30 minutter. Tilslutt ble SAC pelletert, vasket 3 x med RIPA og den bundne radioaktiviteten bestemt i en gammateller.

Titring av antistoff mot MN-antigen er vist i Figur 3A-3B. Ascitesvæske fra en mus med M75 hybridomceller (A) er vist å ha et 50% slutt punkt ved fortynning

1:1,4 x 10⁻⁶. Derimot oppviste ascitesvæsker med MAb spesifikt for MX-protein (M16 og M67) ingen presipitasjon av ¹²⁵I-merket pGEX-3X-MN selv ved fortytning 1:200 (resultatet er ikke vist). Normalt kaninserum (C) ga ikke signifikant presipitasjon av MN-antigenet. Kanin-anti-MaTu-serum (B), oppnådd etter
 5 immunisering med levende MX-infiserte HeLa-celler, presipiterte 7% av det radioaktive MN-protein ved 1:200 fortytning. Kanin-anti-MaTu-serumet ble ved immunblott som antydnet i Eksempel 4 (ovenfor) vist å presipitere både MX- og MN-proteiner.

Bare en av i alt 180 undersøkte humane sera (90 kontroller og 90 sera fra
 10 pasienter med mamma-, ovarie- eller uterin cervikal cancer) viste signifikant presipitasjon av det radioaktivt merkede MN-rekombinante protein. Dette serum, L8, (D) ble testet på nytt ved immunblotting (som i Eksempel 4), men presipiterte ikke noe p54/58N fra MX-infiserte HeLa-celler. Også 6 andre humane sera, inkludert KH (E), var negative ved immunblotting. Det eneste positive humane
 15 serum i RIA, L8, var således reaktivt kun med det genetisk modellerte produkt, men ikke med nativt p54/58N uttrykt av HeLa-celler.

Ved et RIA for MN-antigen, ble fortytningen av MAb M75, som i den foregående test presipiterte 50% av maksimalt presipiterbar radioaktivitet (=fortytning 1:1,4 x 10⁻⁶) blandet med fortytninger av celleekstrakter, hvorefter de
 20 fikk reagere i 2 timer. Deretter ble ¹²⁵I-merket pGEX-3X-MN (25 x 10³ cpm/rør) tilsatt i ytterligere 2 timer. Tilslutt ble den radioaktivitet som var bundet til MAb M75 presipitert med SAC og vasket som ovenfor. 100% presipitasjon (=0 inhibering) ble ansett som den maksimale radioaktivitet bundet av den anvendte MAb-fortytning. Konsentrasjonen av MN-antigenet i undersøkte celleekstrakter ble beregnet fra en
 25 inhiberingskurve som ble oppnådd med "kald" pGEX-3X-MN benyttet som standard (A) i Figur 4.

Reaksjonen av radioaktivt merket pGEX-3X-MN-protein med MAb M75 gjorde det mulig for oss å beregne MN-antigenet direkte i celleekstrakter. Figur 4 viser at 3 ng av "kald" pGEX-3X-MN (A) forårsaket en 50% inhibering av
 30 presipitasjonen av "hot" pGEX-3X-MN. En ekvivalent mengde MN-antigen forekommer i 3 x 10³ ng proteiner ekstrahert fra MaTu-infisert HeLa (B) eller fra rotte2-Tk⁻-celler (C). Konsentrasjoner av MN-protein i celleekstrakter, bestemt ved denne RIA, er vist nedenfor i Tabell 1. Det skal bemerkes at de beregnede verdiene ikke er absolutte, idet MN-antigener i celleekstrakter er av noe ulike

størrelser og siden det genetisk modellerte MN-protein også er et produkt som inneholder molekyler av varierende størrelse.

Tabell 1

5 Konsentrering av MN-protein i celleekstrakter

Celler	ng MN/mg total-protein
HeLa + MX	939,00
10 Rotte2-Tk ⁻	1065,00
HeLa	27,50
15 XC	16,40
T24	1,18
HEF	0,00
20	

Dataene ble beregnet fra resultatene vist i Figur 4.

Eksempel 9

25 **RIP av MX-antigen**

En tilnærmet konsentrasjon av p58X-proteinet kan oppnås ved RIP fra ekstrakter av MaTu-infiserte HeLa-celler som er blitt metabolsk merket med [³⁵S]-metionin eller med en blanding av [¹⁴C]-aminosyrer. Resultatene er vist i Tabell 2.

Tabell 2

Radioimmunpresipitasjon av metabolsk merket p58X-protein

Merking			Radioaktivitet			
			Presipitert med			
			MAb M16 + SAC % cpm			
	Inter-	Total	cpm x 10 ⁻³		i p58X	
	vall	Celler	cpm x 10 ⁻⁶	Pres. 1	Pres.2	(Pres.1+2)
10 ³⁵ S-metionin	A	HeLa	7,850	11,455	7,631	0
		HeLa+MX	9,337	93,797	12,117	0,891
	B	HeLa	6,270	7,299	5,947	0
		HeLa+MX	6,469	67,099	7,346	0,935
15 ¹⁴ C-amino-syrer	A	HeLa	4,223	6,423	4,168	0
		HeLa+MX	3,577	29,280	4,936	0,705
	B	HeLa	3,266	4,915	3,805	0
		HeLa+MX	2,627	24,323	4,346	0,824

Den radioaktive telling er uttrykt i cpm av den totale eller immunpresipiterte radioaktivitet per skål. Intervaller: A - celler merket over natten; B - parallellkulturer etter 24 timers "chase".

Fra resultatene vist i Tabell 2 fremgår det at p58X representerer ca. 0,8% av proteinene i celleekstraktene.

Svært like verdier ble oppnådd i kulturer etter inkubering over natten med merkede aminosyrer og i parallele kulturer som dessuten ble inkubert i ytterligere 24 timer i "kalde" media med fullt belegg av aminosyrer. Disse resultatene tyder på at de oppnådde radioaktivitetsverdier avspeiler en allerede oppnådd likevektstilstand fremfor inkorporeringshastigheten. Verdiene kan derfor ikke være meget forskjellige fra de aktuelle innhold av p58X i ekstraktene. Ekstrakter fra

celler merket med [^{35}S]-metionin ga p58X-verdier som lignet verdiene for celler fra ekstrakter av kulturer merket med en blanding av [^{14}C]-aminosyrer.

Eksempel 10

5 Immunelektron- og sveipe-mikroskopi av kontroll- og av MX-infiserte HeLa-celler

Som antydnet ovenfor i Eksempel 1 er MN-antigen, påvist ved indirekte immunfluorescens med MAb M75, lokalisert på overflatemembranene og i kjernen av MX-infiserte HeLa-celler eller i HeLa-celler dyrket i tette kulturer. For mer eksakt å vurdere lokaliseringen av MN-antigenet, ble det benyttet immunelektron-
 10 mikroskopi, hvor MAb M75 bundet til MN-antigen ble synliggjort med immunogullkuler. [Herzog et al., "Colloidal gold labeling for determining cell surface area," i: Colloidal Gold, Vol. 3 (Hayat, M.A., red.), s. 139-149 (Academic Press Inc.; San Diego, CA).].

Ultratynne snitt av MX-uinfiserte (kontroll) og av MX-infiserte HeLa-celler
 15 ble farvet med MAb M75 med og uten immunogull. [Enkelte celler ble fiksert og behandlet med M75 og immunogull før de ble innstøpt og oppsnittet. Prosedyren muliggjør immunogull-dekorering av kun celleoverflate-antigener. Enkelte av cellene ble behandlet med M75 og immunogull bare etter at de var innstøpt og oppsnittet, og på den måten kunne også antigener inne i cellene dekoreres.
 20 Enkelte av cellene som ikke var behandlet med immunogull befant seg i en avsluttende fase av celledelingen].

Immunelektron- og sveipe-mikrografier av de farvede cellene viste lokaliseringen av MN-antigen i cellene, og også den slående ultrastrukturelle forskjell mellom kontroll- og MX-infisert HeLa. En kontroll-HeLa-celle viste seg,
 25 gjennom visualisering med gullkuler, å ha meget lite MN-antigen på overflaten. Celleoverflaten var relativt glatt, med kun to små protrusjoner. Det kunne ikke registreres mitokondrier i cytoplasmaet. Derimot viste MX-infiserte HeLa-celler seg å ha rikelig med tette, filamentøse protrusjoner ut fra overflatene. Det meste av MN-antigenet er lokalisert på disse filamentene som ble dekorert med immunogull
 30 når immunogull ble benyttet for farvingen. Cytoplasmaet av MX-infiserte HeLa ble vist å inneholde adskillige mitokondrier. MN-antigen ble funnet i kjernen av MX-infiserte celler. Noe av MN-antigenet befant seg i nukleoplasmaet (antagelig bundet til kromatin), men en høyere konsentrasjon av MN-antigenet fantes i nukleolene. Igjen, var overflaten av normale HeLa-celler relativt glatt mens MX-

infiserte HeLa-celler på overflaten hadde tallrike filamenter og "blærer". Enkelte av filamentene synes å danne broer som forbinder dem med naboceller.

Det har i enkelte tilfeller vært iaktatt at en av forskjellene mellom in vitro transformerte celler og deres normale opphavsceller, er at overflaten av normale celler var glatt, mens det på transformerte celler fantes tallrike hårlignende protrusjoner [Darnell et al., "Molecular Cell Biology," (2nd edition) Sci. Am. Books; W.H. Freeman and Co., New York (1990)]. I henhold til disse kriterier har MX-infiserte HeLa-celler, som det fremgår av de mikrografier som her er diskutert, et supertransformert utseende.

I enkelte svulster er det dessuten beskrevet amplifikasjon av mitokondrier [Bernhard, W., "Handbook of Molecular Cytology," s. 687-715, Lima de Faria (red.), North Holland Publishing Co.; Amsterdam-London (1972)]. Slik amplifikasjon ble iaktatt for MX-infiserte HeLa-celler som antok meget intens farge med Janus-grønt, som er spesifikt for mitokondrier, mens kontroll-HeLa bare ble svakt farvet.

Det skal bemerkes at elektronmikroskopi-spesialister ikke var i stand til å finne noen strukturelle karakteristika som var spesifikke for tumorceller.

Eksempel 11

Antisense ODN inhiberer MN-gen-ekspressjon

For å avgjøre hvorvidt begge p54/58N-proteinene ble kodet av ett gen, ble de følgende eksperimenter med antisense ODN foretatt. Tidligere sparsomt voksende HeLa-celler ble utsådd for å oppnå en overvokst kultur og inkubert i 130 timer, enten uten eller i nærvær av 2 genspesifikke ODN som var komplementære til 5'-enden av MN mRNA. HeLa-celler ble dyrket i subkultur til 8×10^5 celler per mL av DMEM med 10% FCS. Samtidig ble det gjort følgende ODN-tilsetninger til mediene: (A) 29-mer ODN1 [5' CGCCCAGTGGGTCATCTTCCCCAGAAGAG 3' (SEKV ID NO: 3), komplementært til posisjonene 44-72] i 4 μ M sluttkonsentrasjon, (B) 19-mer ODN2 [5' GGAATCCTCCTGCATCCGG 3' (SEKV ID NO: 4), komplementært til posisjonene 12-30] i 4 μ M sluttkonsentrasjon og (C) både ODN1 og ODN2 i 2 μ M sluttkonsentrasjon av hver. (D) celler behandlet på samme måte, men inkubert uten ODN, tjente som kontroll. Etter 130 timer ble det fremstillet ekstrakter av cellene som ble analysert ved immunblotting under bruk

av ^{125}I -merket MAb M75. Proteinekstrakter fra cellene ble analysert ved immunblotting og RIA under bruk av MAb M75.

Dyrking av HeLa-celler med ODN viste seg å resultere i betydelig inhibering av p54/58N-syntese. 19-mer ODN2 i 4 μM sluttkonsentrasjon var meget effektiv, idet det ifølge RIA forårsaket 40% inhibering, mens 29-mer ODN1 (4 μM) og en kombinasjon av de to ODN, hver i 2 μM sluttkonsentrasjon, var mindre effektiv, idet RIA viste 25-35% reduksjon av MN-relaterte proteiner. Derimot var mengden av forskjellige HeLa-celleproteiner, bestemt ved RIA under bruk av spesifikk MAb H460, omtrent den samme i alle cellevariantene. Det viktigste var at det ved immunblott kunne registreres at spesifikk binding av ODN påvirket begge p54/58N-proteinene. Vi konkluderte således med at det MN-gen som vi klonet, kodet for begge p54/58N-proteiner i HeLa-celler.

Eksempel 12

Northern blotting av MN mRNA i tumorogene og ikke-tumorogene cellelinjer

Northern blotting av MN mRNA i humane cellelinjer ble foretatt. Total RNA ble fremstillet fra de følgende cellelinjer ved guanidinium-tiocyanat-CsCl-metoden: HeLa-celler som vokste i tett (A) og sparsom (B) kultur; CGL1- (H/F-N) hybridceller (C); CGL3- (D) og CGL4- (E) segreganter (begge H/F-T) og humane embryo-fibroblaster (F). 15 μg RNA ble separert på en 1,2% formaldehydgel og blottet over på en Hybond C supermembran (Amersham). MN cDNA *NotI*-proben ble merket ved "tilfeldig priming" (Multiprime DNA labelling system; Amersham). Hybridisering ble foretatt i nærvær av 50% formamid ved 42°C og den avsluttende vask foretatt i 0,1% SSPE og 0,1% SDS ved 65°C. En RNA-stige (0,24-9,5 kb) [Bethesda Research Laboratories (BRL); Bethesda, MD (USA)] ble benyttet som størrelses-standard.

Det ble påvist et 1,5 kb MN-spesifikt mRNA kun i to tumorogene segregantkloner, CGL3 og CGL4 (H/F-T), men ikke i den ikke-tumorogene hybridklon CGL1 (H/F-N) eller i normale humane fibroblaster. Dessuten ble det 1,5 kb mRNA funnet i de HeLa-cellene som vokste i tett, men ikke i sparsom, kultur.

Resultatet av northern blottingen var således i overensstemmelse med resultatene fra eksemplet ovenfor hva angår MN-relaterte proteiner som assosieres med tumorogenitet.

Eksempel 13

Southern blotting av genomisk DNA fra ulike hvirveldyrarter for å påvise MN-gen

MN-gener i det genomiske DNA til ulike hvirveldyr ble påvist ved Southern blotting. Kromosomalt DNA oppkuttet av SstI var som følger: (A) høns; (B) storfe; (C) katt; (D) MX-infiserte HeLa-celler; (E) NIH 3T3-celler fra mus; (F) humane placentalceller; (G) HeLa-celler; (H) sau; (I) humane melanomceller og (J) ape-Vero-celler. Retriksjonsfragmenter ble separert på en 0,7% agarose gel og ved alkali blottet over på en Hybond N membran (Amersham). Fremgangsmåten for merking og hybridisering av MN cDNA-proben var de samme som for northern blotting-analysene beskrevet i Eksempel 12.

Southern blottene fremstillet med SstI-retrijsjonsfragmenter av kromosomalt DNA viste i samtlige arter kun ett diskret bånd på ca. 1,5 kb. Slike hybridiseringer med retrijsjonsfragmenter som resultat av spaltning med XhoI og SalI ga dessuten bare et bånd på henholdsvis 4,5 kb og 4,7 kb i hver prøve av kromosomalt DNA. Disse resultatene tyder på at MN-genet foreligger som en enkeltkopi i hvirveldyrs-genomer. Resultatene tyder dessuten på at MN-genet sammen med dens flankerende sekvenser, er relativt konservativt.

Siden spaltningsssetene for SstI danner naturlige grenser i MN-genet og siden størrelsen av MN mRNA er den samme som størrelsen av MN-genet ved Southern blotting (sammenlign resultatene i Eksempel 12) ble det trukket den slutning at MN-genet ikke har introner. Denne konklusjonen ble også underbygget av det faktum at restriksjonsmønstrene av MN cDNA og av MN-spesifikke genomiske SstI-fragmenter er de samme.

Materialet angitt nedenfor ble deponert i American Type Culture Collection (ATCC) ved 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 (USA). Deponeringene ble foretatt i henhold til bestemmelsene i "the Budapest Treaty on the International Recognition of Deposited Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure and regulations thereunder" (Budapest-konvensjonen). Vedlikehold av en levende kultur er sikret i 30 år fra deponeringsdatoen. Organismen vil være tilgjengelig ved ATCC i henhold til betingelsene for Budapest-konvensjonen og gjenstand for en avtale mellom foreliggende søkere og ATCC som sikrer ubegrenset tilgang etter utstedelse av det angjeldende US-patent. At den deponerte stamme er tilgjengelig er ikke å oppfatte som en lisens til å praktisere

oppfinnelsen i strid med de rettigheter som en regjering har gitt i henhold til vedkommende stats patentlovgivning.

	<u>Hybridom</u>	<u>Deponeringsdato</u>	<u>ATCC #</u>
5	VU-M75	17. september, 1992	HB 11128

Beskrivelsen av de foran angitte utførelsesformer av oppfinnelsen er gitt med det formål å illustrere og beskrive. Utførelsesformene er valgt, og beskrevet, for å forklare prinsippene ved oppfinnelsen og dens praktiske anvendelse, for å
 10 gjøre det mulig for fagmannen å benytte oppfinnelsen i ulike utførelsesformer og med forskjellige modifikasjoner egnet for den spesielt tiltenkte bruk. Meningen er at oppfinnelsens ramme defineres av de ledsagende patentkrav.

Alle de her siterte referanser inkorporeres herved i foreliggende beskrivelse med hele sitt innhold.

PATENTKRAV

1. Sammensetning omfattende en nukleinsyresekvens som koder for MN-protein eller et MN-polypeptid som er serologisk
5 aktivt, immunogent og/eller antigen,
karakterisert ved at nukleotidsekvensen for nevnte nukleinsyre er valgt fra gruppen bestående av;
(a) SEKV ID NO:1,
(b) nukleotidsekvens som hybridiserer under stringente
10 betingelser med komplementet til SEKV ID NO:1,
(c) nukleotidsekvenser som skiller seg fra SEKV ID NO:1,
eller fra nukleotidsekvensene i (b) i kodonsekvens
forårsaket av degenerasjon av den genetiske koden.
- 15 2. Sammensetning ifølge krav 1,
karakterisert ved at den omfatter en nukleinsyresekvens tilnærmet komplementær til den cDNA-sekvens som er vist i Figur 1A-1B [SEKV ID NO:1]
eller et fragment derav.
- 20 3. Sammensetning ifølge krav 1,
karakterisert ved at MN-genet eller et fragment derav, eller en nukleinsyresekvens tilnærmet komplementær med nevnte MN-gen, eller et fragment
derav, inngår i en vektor.
- 25 4. Sammensetning ifølge krav 3,
karakterisert ved at nevnte nukleinsyresekvens er operativt forbundet med en ekspresjonskontrollsekvens i vektoren.
5. Encellet vert, karakterisert ved at den er enten prokaryot eller
30 eukaryot og er transformert eller transfektert med sammensetningen ifølge krav 4.

6. Sammensetning som omfatter et MN-protein eller et MN- polypeptid som er serologisk aktivt, immunogent og/eller antigen, karakterisert ved at nevnte MN-protein eller MN-polypeptid er kodet for av nukleotidsekvensen som er valgt fra gruppen bestående av;
- 5 (a) SEKV ID NO:1,
(b) nukleotidsekvensen som hybridiserer under stringente betingelser til komplementet av SEKV ID NO:1,
(c) nukleotidsekvensen som skiller seg fra SEKV ID NO.:1, eller nukleotidsekvensen i (b) i kodonsekvens forårsaket av degenerasjon av den
- 10 genetiske kode.
7. Sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at nevnte MN-protein eller MN-polypeptid har en aminosyresekvens fra SEKV ID NO:2, eller har aminosyresekvensen til
- 15 SEKV ID NO:2.
8. Sammensetning, karakterisert ved at den omfatter et MN-protein eller MN-polypeptid til hvilket et monoklonalt antistoff betegnet M75 binder, hvor nevnte M75-
- 20 monoklonale antistoff sekreteres fra en hybridoma som er deponert ved American Type Culture Collection (ATCC) i USA under ATCC nr. 11128.
9. Sammensetning ifølge krav 7, karakterisert ved at den er kodet for av pGEX-3X-MN.
- 25
10. Sammensetning, karakterisert ved at den omfatter antistoff som spesifikt bindes til et MN-protein eller MN-polypeptid, ifølge krav 6.
- 30
11. Sammensetning ifølge krav 10, karakterisert ved at antistoffet er monoklonalt.
12. Sammensetning ifølge krav 10, karakterisert ved at nevnte antistoff er polyklonalt.

13. Sammensetning ifølge krav 11,
karakterisert ved at de monoklonale antistoff er betegnet M75 og
dannes av hybridoma VU-M75 som er deponert ved ATCC under ATCC nummer
5 HB 11128.
14. Sammensetning omfattende en hybridoma,
karakterisert ved hybridomaen danner et monoklonalt antistoff som har
bindingsspesifisitet til et MN-protein eller MN-polypeptid, ifølge krav 6.
10
15. Sammensetning omfattende en hybridoma,
karakterisert ved at nevnte hybridoma er betegnet VU-M75 som er
deponert ved ATCC nr. HB 11128.
- 15 16. Sammensetning omfattende et MN-fusjonsprotein eller MN-fusjons-
polypeptid,
karakterisert ved at MN-proteinet eller -polypeptidet ifølge krav 6 er
fusjonert med et ikke-MN protein eller ikke-MN polypeptid, og hvor nevnte ikke-MN
protein eller ikke-MN polypeptid ikke er et MN-protein eller MN-polypeptid ifølge
20 krav 6.
17. Sammensetning ifølge krav 10,
karakterisert ved at antistoffene er bundet til et kjemoterapeutisk middel
eller et toksisk middel og/eller til et avbildningsmiddel.
25
18. Fremgangsmåte for ved rekombinant teknikk å danne et MN-protein eller
MN-polypeptid, karakterisert ved at den omfatter trinnene:
- a) transformering av en encellet vert med en sammensetning ifølge krav 4,
 - b) dyrking av nevnte encellede vert slik at MN-proteinet og/eller
30 MN-polypeptidet uttrykkes,
 - c) ekstrahering og isolering av nevnte MN-protein og/eller MN-polypeptid.

19. Fremgangsmåte for i en prøve av et virveldyr å påvise og/eller kvantifisere MN-antigen, som omfatter trinnene:

- (a) bringe nevnte prøve i kontakt med et antistoff ifølge krav 10, og
- (b) påvise og/eller kvantifisere binding av nevnte antistoff til antigen i nevnte prøve.

20. Fremgangsmåte for i en prøve av et virveldyr å påvise og/eller kvantifisere MN-spesifikke antistoff,

karakterisert ved at den omfatter trinnene:

- a) kontakte og inkubere hvirveldyrprøven med MN-protein eller MN-polypeptid, ifølge krav 6, og
- b) påvise og/eller kvantifisere binding av nevnte MN-protein eller MN-polypeptid til antistoff i prøven.

21. Vaksine,

karakterisert ved at den omfatter en immunogen mengde av en sammensetning av ett eller flere tilnærmet rene MN-proteiner og/eller MN-polypeptider ifølge krav 6, dispergert i en fysiologisk akseptabel, ugiftig bærer, hvor mengden effektivt immuniserer et hvirveldyr mot en neoplastisk sykdom som er assosiert med ekspresjon av MN-antigen.

22. Sammensetning som omfatter en antisense nukleinsyre som hybridiserer under stringente betingelser til mRNA transkribert fra en nukleinsyre som koder for et MN-protein eller et MN-polypeptid som er serologisk aktivt, immunogent og/eller antigen,

karakterisert ved at nukleotidsekvensen for nevnte antisense nukleinsyre er valgt fra gruppen bestående av;

- (a) nukleotidsekvensen som er komplementet til SEKV ID NO:1,
- (b) nukleotidsekvensen som hybridiserer under stringente betingelser til SEKV ID NO:1, og
- (c) nukleotidsekvensen som er ulik fra komplementet til SEKV ID NO:1, eller nukleotidsekvensen i (b) i kodon-sekvens forårsaket av degenerasjon av den genetiske koden.

23. Sammensetning,
karakterisert ved at den omfatter et MN-gen hvor MN-genet inneholder
nukleinsyren ifølge krav 1.

1	Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu Asp Ser Pro Leu Gly Gly Gly
1	CAG AGG TTG CCC CGG ATG CAG GAG GAT TCC CCC TTG GGA GGA GGC
16	Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser
46	TCT TCT GGG GAA GAT GAC CCA CTG GGC GAG GAG GAT CTG CCC AGT
31	Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp
91	GAA GAG GAT TCA CCC AGA GAG GAG GAT CCA CCC GGA GAG GAG GAT
46	Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu
136	CTA CCT GGA GAG GAG GAT CTA CCT GGA GAG GAG GAT CTA CCT GAA
61	Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu Asp
181	GTT AAG CCT AAA TCA GAA GAA GAG GGC TCC CTG AAG TTA GAG GAT
76	Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro Gln Asn
226	CTA CCT ACT GTT GAG GCT CCT GGA GAT CCT CAA GAA CCC CAG AAT
91	Asn Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg
271	AAT GCC CAC AGG GAC AAA GAA GGG GAT GAC CAG AGT CAT TGG CGC
106	Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala
316	TAT GGA GGC GAC CCG CCC TGG CCC CGG GTG TCC CCA GCC TGC GCG
121	Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala
361	GGC CGC TTC CAG TCC CCG GTG GAT ATC CGC CCC CAG CTC GCC GCC
136	Phe Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu
406	TTC TGC CCG GCC CTG CGC CCC CTG GAA CTC CTG GGC TTC CAG CTC
151	Pro Pro Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val
451	CCG CCG CTC CCA GAA CTG CGC CTG CGC AAC AAT GGC CAC AGT GTG
166	Gln Leu Thr Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly
496	CAA CTG ACC CTG CCT CCT GGG CTA GAG ATG GCT CTG GGT CCC GGG
191	Arg Glu Tyr Arg Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp Gly Ala Ala
541	CGG GAG TAC CGG GCT CTG CAG CTG CAT CTG CAC TGG GGG GCT GCA
196	Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr Val Glu Gly His Arg Phe Pro
586	GGT CGT CCG GGC TCG GAG CAC ACT GTG GAA GGC CAC CGT TTC CCT
211	Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val
631	GCC GAG ATC CAC GTG GTT CAC CTC AGC ACC GCC TTT GCC AGA GTT

FIG. 1A

226 Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala
 676 GAC GAG GCC TTG GGG CGC CCG GGA GGC CTG GCC GTG TTG GCC GCC

 241 Phe Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu
 721 TTT CTG GAG GAG GGC CCG GAA GAA AAC AGT GCC TAT GAG CAG TTG

 256 Leu Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser Glu Thr Gln
 766 CTG TCT CGC TTG GAA GAA ATC GCT GAG GAA GGC TCA GAG ACT CAG

 271 Val Pro Gly Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp Phe Ser
 811 GTC CCA GGA CTG GAC ATA TCT GCA CTC CTG CCC TCT GAC TTC AGC

 286 Arg Tyr Phe Gln Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ala
 856 CGC TAC TTC CAA TAT GAG GGG TCT CTG ACT ACA CCG CCC TGT GCC

 301 Gln Gly Val Ile Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser
 901 CAG GGT GTC ATC TGG ACT GTG TTT AAC CAG ACA GTG ATG CTG AGT

 316 Ala Lys Gln Leu His Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly
 946 GCT AAG CAG CTC CAC ACC CTC TCT GAC ACC CTG TGG GGA CCT GGT

 331 Asp Ser Arg Leu Gln Leu Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn
 991 GAC TCT CGG CTA CAG CTG AAC TTC CGA GCG ACG CAG CCT TTG AAT

 346 Gly Arg Val Ile Glu Ala Ser Phe Pro Ala Gly Val Asp Ser Ser
 1046 GGG CGA GTG ATT GAG GCC TCC TTC CCT GCT GGA GTG GAC AGC AGT

 361 Pro Arg Ala Ala Glu Pro Val Gln Leu Asn Ser Cys Leu Ala Ala
 1081 CCT CGG GCT GCT GAG CCA GTC CAG CTG AAT TCC TGC CTG GCT GCT

 376 Gly Asp Ile Leu Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr
 1126 GGT GAC ATC CTA GCC CTG GTT TTT GGC CTC CTT TTT GCT GTC ACC

 391 Ser Val Ala Phe Leu Val Gln Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly
 1171 AGC GTC GCG TTC CTT GTG CAG ATG AGA AGG CAG CAC AGA AGG GGA

 406 Thr Lys Gly Gly Val Ser Tyr Arg Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr
 1216 ACC AAA GGG GGT GTG AGC TAC CGC CCA GCA GAG GTA GCC GAG ACT

 421 Gly Ala
 1261 GGA GCC TAG AGG CTG GAT CTT GGA GAA TGT GAG AAG CCA GCC AGA

 1306 GGC ATC TGA GGG GGA GCC GGT AAC TGT CCT GTC CTG CTC ATT ATG

 1351 CCA CTT CCT TTT AAC TGC CAA GAA ATT TTT TAA AAT AAA TAT TTA

 1396 TAA T

FIG. 1B

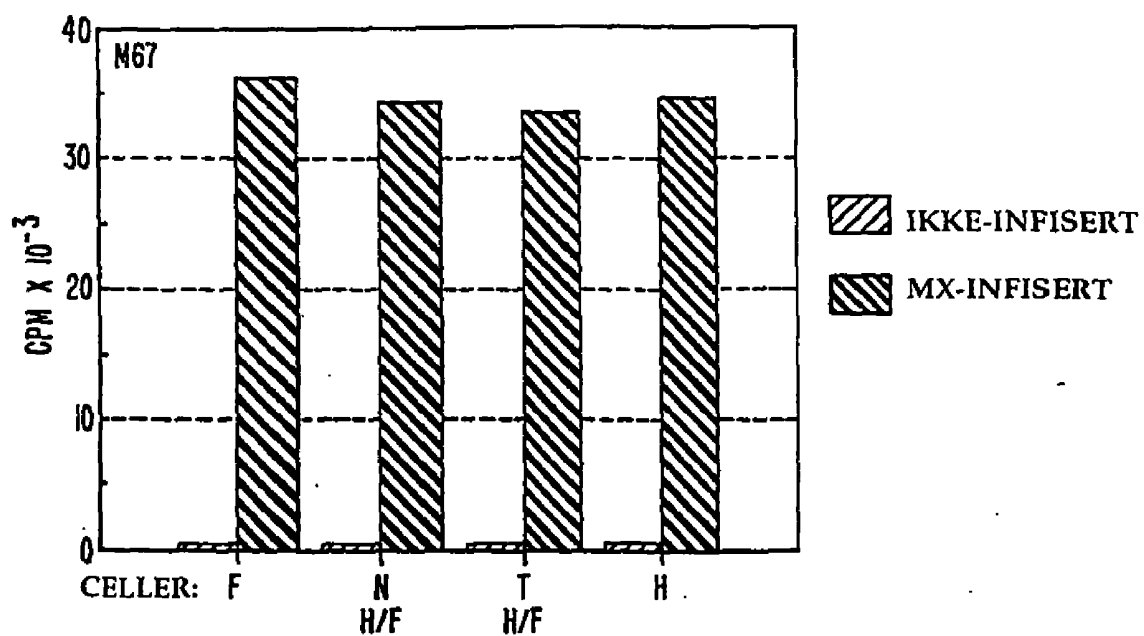


FIG. 2A.

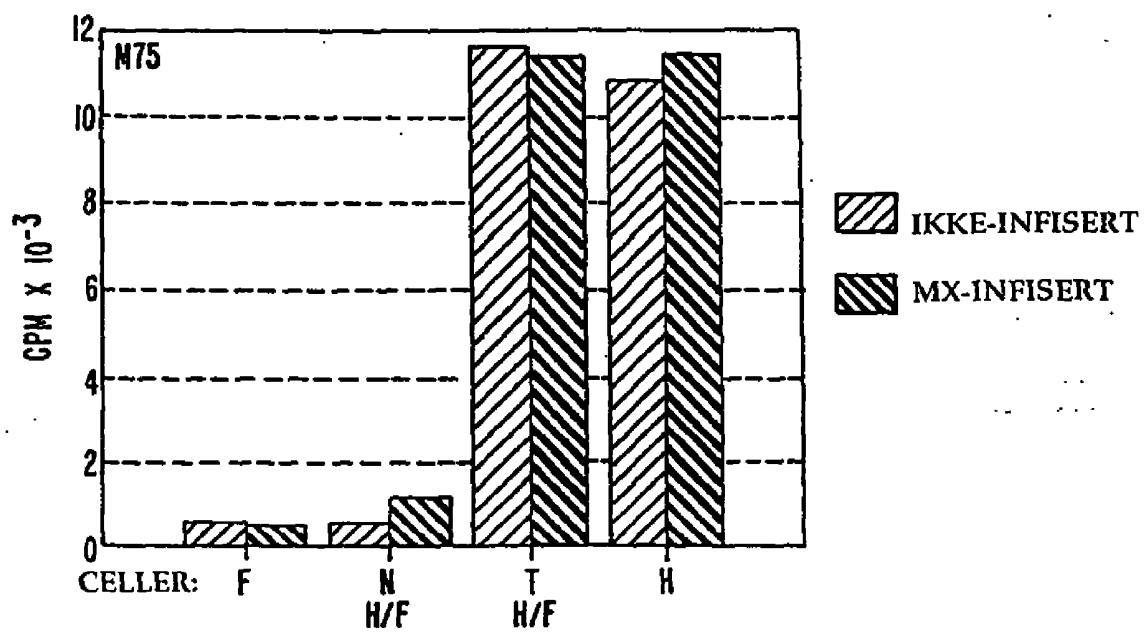
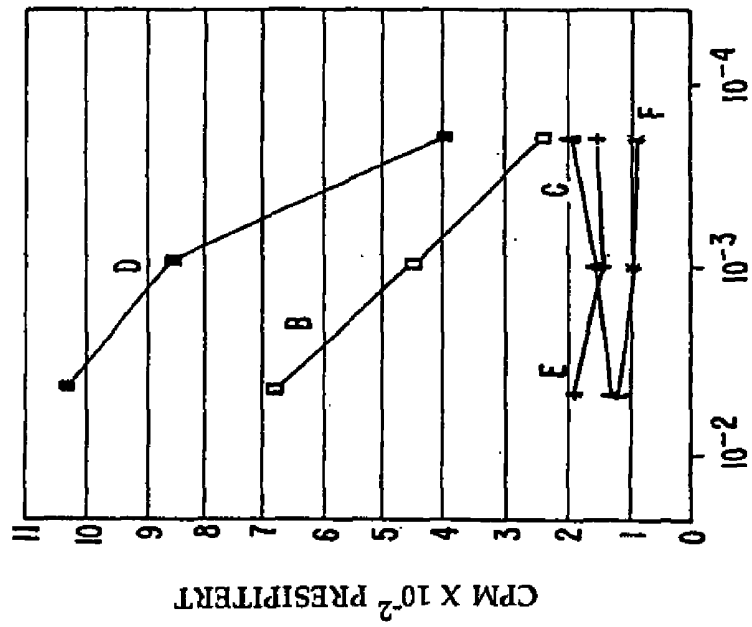
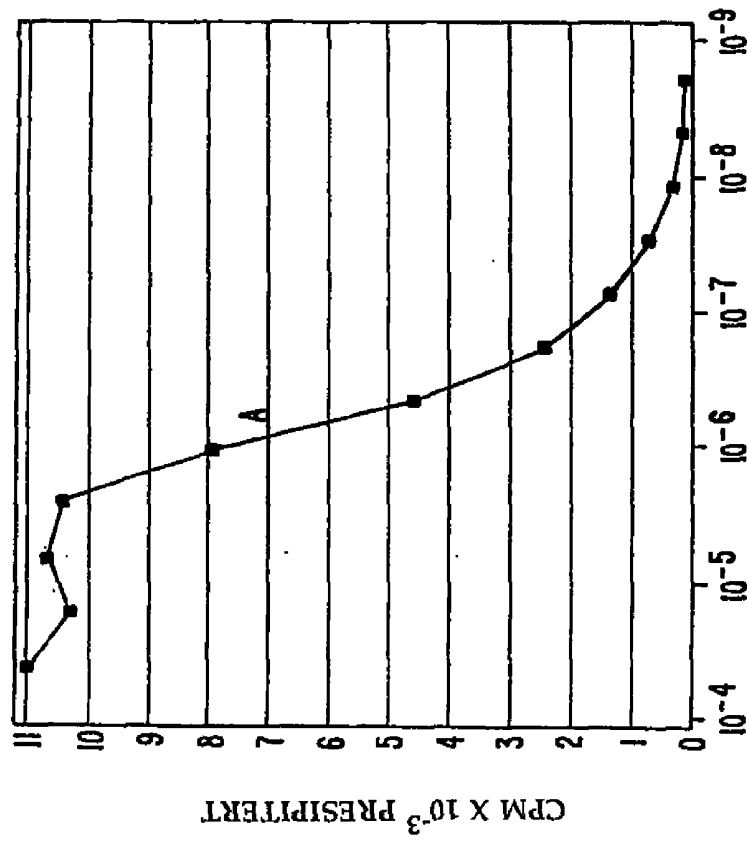


FIG. 2B.



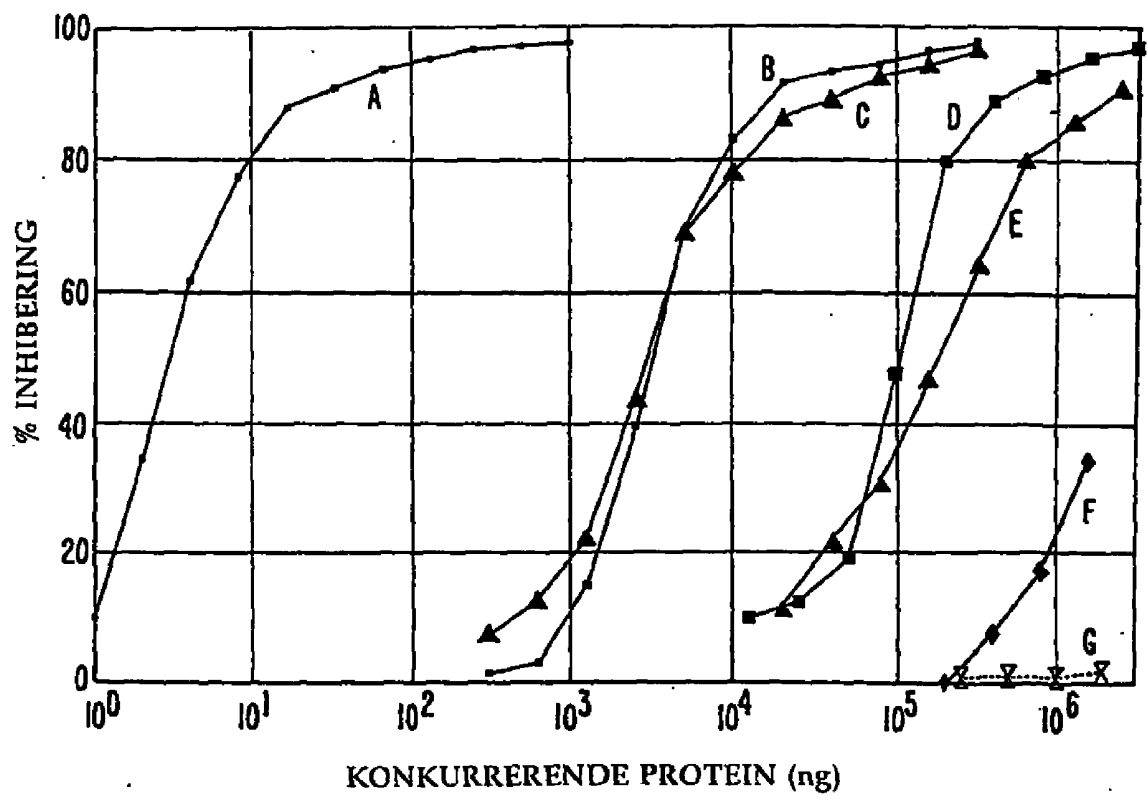
ANTISTOFF-FORTYNNING

FIG. 3B.



ANTISTOFF-FORTYNNING

FIG. 3A.

**FIG. 4.**