



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU 60567
UTLÄGGNINGSSKRIFT

C(45) Patentti myönnetty 10 02 1932
Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 07 G 7/00, A 61 K 39/00,
G 01 N 33/16

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentsökning	2099/73
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	29.06.73
(23) Alkuperäpäivä — Giltighetsdag	29.06.73
(41) Tulut julkiseksi — Blivit offentlig	11.01.74
(44) Nähtäväksiapanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.10.81
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	10.07.72
USA(US) 270273	

- (71) AB Bonnierföretagen, Torsgatan 21, S-105 44 Stockholm, Ruotsi-Sverige(SE)
- (72) Knut Bertil Björklund, Bromma, Ruotsi-Sverige(SE)
- (74) Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab
- (54) Syövän diagnostisoimiseksi käytettävä valmiste ja menetelmä sen valmistamiseksi - Preparat för användning vid diagnostisering av cancer och förfarande för dess framställning

Toistuvasti on yritetty osoittaa kasvainreaktiivisten vasta-aineiden läsnäolo seerumeissa, joita on saatu eläimistä, joille on annettu ihmisen syöpäkasvainpreparaatteja. Jos tällaiset kokeet olisivat aina toistettavia, tämä olisi osoitus siitä, että ihmisen syöpäkudoksessa esiintyy tärkeitä antigeenejä, joita ei ole normaaleissa kudoksissa, ja voisi siten johtaa neoplastisen prosessin luonteen parempaan ymmärtämiseen. Syöpäsairauksien paremmaksi ymmärtämiseksi ihmisen syöpäkudosta on tutkittu monospesifisen, syöpäkudoksessa läsnäolevan antigeenin olemassaolon toteamiseksi ja ennen kaikkea on pyritty toistettavan menetelmän aikaansaamiseen tämän antigeenin eristämiseksi ja puhdistamiseksi.

Paksunsuolen ja ruuansulatusjärjestelmän adenokarsinoomaan liittyvien antigeenien läsnäolon ovat osoittaneet Gold et al: J. expt. Med. 121 (1965) 439-462 ja J. expt. Med. 122, (1965) 467-487. Näissä julkaisuissa viitataan B. Björklund'in aikaisempiin töihin, joissa on osoitettu että on olemassa sellaista ihmissyövän yhteydessä esiintyvää antigeeniä, joka on yhteinen pääosalle kaikista

tunnetuista epiteelistä alkuperää olevista pahanlaatuisista kasvaimista, Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol. 1966, 8, 179 ja Internat. Arch. Allergy and Appl. Immunol. 1958, 12, 241. US-patenttijulkaisussa 3 663 684 selitetään karsinoembryonaalinen antigeeni, jolla on nk. "CEA-aktiviteettia". Tämä antigeeni on kuitenkin täysin erilainen kuin tämän keksinnön mukaisessa valmis- teessa käytettävä antigeeni, joka on syöpäkudoksessa läsnäoleva polypeptidiantigeeni, eli CAPA, ja tämän erilaisuuden osoittami- seksi esitetään seuraavassa yhdistelmä tietyistä konkreettisista erilaisuuksista sekä antigeenin eristysmenetelmässä että antigeenin ominaisuuksissa.

CEA	CAPA
Lähde: syöpä paksusuoleissa sikiö (lapsenpihka, suoli)	Lähde: kaikki syöpätyypit, syöpä- solulinjat <u>in vitro</u> , istukka. (sikiössä vähän jos lainkaan)
Uutto antigeenipitoisista kudok- sista glykoproteiiniliuottimel- la alhaisessa pH:ssa huoneenläm- pötilassa: uute otetaan talteen	Kudosten pesu vedellä neutraalis- sa pH:ssa, uutto etyylietterillä (mahd.), uute hyljätään, kiinteiden aineiden uutto korkeassa pH:ssa (9,5), uute otetaan talteen, läm- pötila vesikäsittelyssä : $\leq 0^{\circ}\text{C}$
Isoelektrinen piste: ei ole il- moitettu tai ei esiinny	Isoelektrinen piste: noin 5 (ennen loppuvaihetta)
UV-valon absorptio 280 nm:ssa	UV-valon absorptio 230 nm:ssa (hyvin pieni 280 nm:ssa)
Fluoresenssi : ei mainita	Fluoresenssi: aktivoituminen 288 nm:ssa. Säteily 350 nm:ssa
Molekyyllipaino 200 000 (voi olla niinkin alhainen kuin 70 000)	Molekyyllipaino $23\ 000 \pm 2\ 500$
Aktiivinen neutraalissa pH:ssa	Tuhoutuu neutraalissa pH:ssa
Sisältää sokeria (Glykoproteiini)	Ei sokeria kaasunestekromatogra- fi- ja massaspektrografi- analyysien mukaan
Ei CAPA:n vasta-aineiden inhiboi- tumista hemagglutinaatiokokeessa	Inhiboi spesifisen vasta-ainensa hemagglutinaatiokokeessa
Ei saa aikaan parkkihapolla käsi- teltyjen lampaan punaverisolujen merkitsemistä	Saa aikaan näiden verisolujen merkitsemisen

CEA	CAPA
Esiintyy syöpäsairauksissa muutamista nanogrammoista 100-200 nanogrammaan ml kohti olevissa pitoisuuksissa	Esiintyy seerumissa välillä 0,09-9 µg/ml (vastaa 90-8000 ng/ml) olevissa pitoisuuksissa, eli noin 20 kertaa suuremmissa pitoisuuksissa kuin CEA
Testimenettely: kallis, aikaa-vievä, vaatii radioaktiivisia isotooppeja	Helppo, nopea, halpa, ei isotooppeja, ei tarvita kallista kalustoa

Käytännöllistä ja kaupallisesti käyttökelpoista menetelmää antigeenin eristämiseksi per se ei tähän mennessä ole saatu aikaan, eikä antigeenin yhteyttä erilaisiin syöpäsairauksiin ole selvitetty. Niinpä tähän mennessä ei ole ollut mahdollista eristää ja karakterisoida ihmissyövän yhteydessä esiintyvää antigeenia käytännöllisillä ja toistettavilla menetelmillä, eikä myöskään ole ollut mahdollista määrittää tai edes osoittaa antigeenin läsnäoloa piileviä tai todettuja syöpäsairauksia potevien henkilöiden veressä diagnostisella testillä, joka sopii suurimittakaavaiseen tutkimukseen.

Jotta kasvaimessa esiintyvälle antigeenille spesifisten vasta-aineiden läsnäoloa eläin-antiseerumeissa voitaisiin käyttää hyväksi diagnostisesti on kehitettävä testi, joka osoittaa kasvain-antigeenin läsnäolon potilaan veressä. Tähän mennessä tunnetut menetelmät eivät ole osoittautuneet tehokkaiksi varman syöpädiagnoosin tekemiseksi.

Keksinnön tarkoituksena on näinollen saada aikaan syövän diagnostisoimiseksi käytettävä valmiste, joka sisältää ihmisen syöpäkudoksessa läsnäolevaa antigeeniä, sekoitettuna stabiloivan määrän kanssa inerttiä proteiiniä, kuten albumiinia, sekä tällaisen valmisteen valmistusmenetelmä, ja keksinnön tunnusmerkit ilmenevät oheisista patenttivaatimuksista.

Kuten jäljempänä selityksessä statistisista tutkimuksista selviää, sisältävät syöpäkasvaimet tyypistä ja sijaintipaista riippumatta CAPA:a ja tämä CAPA on yhteinen kaikille tunnetuille syöpätyypeille.

Aine, jolla on CAPA-aktiviteettia, eristetään ja puhdistetaan homogenoimalla ruumiinavauksista saatuja pahanlaatuisia kudoksia, jolloin eri tyyppisiä ja eri paikoista peräisin olevia karsinoma-kudoksia kerätään kasvainvarastoksi ("pool"). Esimerkkeinä tutkituista syöpätyypeistä mainittakoon paksusuoli-, peräsuoli-, keuhko-, ruokatorvi-, vatsa-, haima-, munuais-, virtsarakko-, rinta-, kohtu-, munasarja-, maksasyöpä, leukemia. Vaihtoehtoisesti lähtöaineina voidaan käyttää kudosta ihmisistukasta tai pahanlaatuisia soluviljelmiä in vitro (tällaisista viljelmistä tarkemmin katso B. Björklund, V. Björklund ja I. Hedlöf, J. Nat. Cancer. Instr. 26: 533-545, 1961, "Antigenicity of Pooled Human Malignant and Normal Tissues by Cytoimmunological Technique. III. Distribution of Tumor Antigen"). Myös normaalikudoksia kerätään samanaikaisesti pahanlaatuisten kudosten kanssa. Kuviossa 1 on esitetty uusi testimenetelmä käyttökelpoisen puhtaan antigeenin eristämiseksi. Biokemiallisten erotusmenetelmien soveltamista ohjattiin näin ollen herkällä immunologisella määritysmenetelmällä, jolla pystyttiin havaitsemaan alle 1 ng (nanogramma) suuruisia antigeenimääriä. Kuvion 1 mukaisen määritystekniikan suurin ansio on sen selektiivisyys. Verrattavien uutteen erot antigeenivaikutuksessa määritettiin mitättömien samanlaisuuksien muodostamaa taustaa vasten, jolloin määritysjärjestelmä toimii feedback-kontrollina sarjassa kemiallisia menetelmiä, joita vaihdeltiin niin, että saatiin

1. kasvainfraktio, jolla oli maksimaalinen antigeeninen reaktiiviteetti normaaliin antigeenien absorboimien anti-kasvainseerumien kanssa;
2. kasvainfraktio, jolla oli minimaalinen antigeeninen reaktiiviteetti kasvain-antigeenien absorboimien anti-kasvainseerumien kanssa. Lisäkontrollin vuoksi valmistettiin myös kasvainfraktioita, joilla oli minimaalinen reaktiiviteetti normaaliin tai kasvainantigeenien absorboimien anti-normaaliin seerumien kanssa.

Karsinomakudosta ja normaalia kudosta sekoitetaan jäätyneinä erikseen veteen, jonka lämpötila on noin 0°C, ja homogenoidaan kehittämättä liikaa kitkalämpöä, joka aiheuttaisi asianomaisen CAPA:n inaktivoitumisen. Suspension lämpötilan ei saa antaa nousta yli noin 0°C.

Saatuun nestemäisen homogenaatin ja kiinteiden aineosien kylmään seokseen sekoitetaan orgaanista liuotinta, joka pystyy liuottamaan lipidejä, kuten neutraaleja rasvoja, esimerkiksi asetonia tai

ettyylieetteriä, alle noin 0°C :n lämpötilassa, jonka liuotinkäsittelyn tarkoituksena on poistaa mm. lipidiaineet ja saattaa anti-geeniset ryhmät alttiimmiksi käsittelylle. Kiinteät aineet erotetaan seoksesta, sopivasti sentrifugoimalla, ja vesi- ja liuotinkerrokset hylätään. Lämpötila ei saa nousta yli noin $+4^{\circ}\text{C}$.

Talteenotetut kiinteät aineet lyofilisoidaan ja lyofilisoitu kudosjauhe jauhetaan, esim. ruostumatonta terästä olevassa kuulamylyssä, alhaisessa, mieluummin alle noin 0°C :n ja sopivasti alle noin -70°C :n lämpötilassa. Jauhamalla saadaan hienoa, harmaanruskeata jauhetta.

Saatu jauhe voidaan haluttaessa uuttaa jollakin suolaliuoksella, kuten fysiologisella keittosuolaliuoksella, neutraalissa pH:ssa, alhaisessa, sopivasti noin 0°C :n lämpötilassa ja sentrifugoida, jonka jälkeen sakan päällä oleva neste hylätään. Näin saatu liete voidaan suspensoida uudelleen kylmään veteen, jolloin sakka otetaan talteen ja lyofilisoidaan. Saatua jauhetta voidaan säilyttää vuosikausia suljetuissa pulloissa noin 4°C :ssa.

Kun edellämainittuja polypeptidipitoisia kasvain- ja normaali-jauheita uutetaan vedellä alkalisisessa pH:ssa, uutteen tulevat sameiksi kun niihin lisätään NaCl:a neutraalissa tai lievästi alkalisisessa pH:ssa. Tämä sameus johtuu pääasiassa nukleiinihappotyyppisten epäpuhtauksien läsnäolosta. Suolaliuoksella käsiteltyjen uutteen sentrifugoimisen jälkeen kaikki aktiiviteetti jää kirkkaaseen, sakan päällä olevaan nesteeseen. Tämä neste voidaan isoelektrisesti saostaa happamassa pH:ssa, sopivasti pH:ssa noin 4,8, ja saadut sakat liuottaa fosfaatilla puskuroituun vesiliuokseen, jonka pH on noin 7,0.

Edellä selitetyllä menettelyllä saadut liuokset suodatetaan sopivalla helmimäisellä molekyyliseulatyypillisellä geelillä, jolla voidaan fraktioida yhdisteet, joiden molekyylipaino on $10 \cdot 10^6$:sta $20 \cdot 10^6$:een, erityisesti noin $15 \cdot 10^6$, jolloin suodatusgeeli eluoidaan puskurilla, jonka pH on likimäärin neutraali, ja molekyylipainofraktio $10 \cdot 10^6 - 20 \cdot 10^6$, erityisesti noin $15 \cdot 10^6$, otetaan talteen. Geeli eli molekyyliseula voi olla polyakryyliamidigeeli, ristikytetty dekstraanigeeli, agar- tai agaroosigeeli tai vastaava, geeli tai molekyyliseula, kuten esim. Bio-Gel A-50m (kauppanimi agaroosigeelille jota valmistaa Bio-Rad Laboratories, München, Saksa-BRD; 100-200 mesh ($0,149-0,074$ mm) erotusraja $50 \cdot 10^6$ daltonia, fraktioimisalue $10^5 - 50 \cdot 10^6$ daltonia, likimääräinen agaroosipitoisuus 2 %) tai Sepharose 2B (kauppanimi agaroosigeelille jota valmistaa Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Ruotsi; 60-300 mikronia, helmiä, fraktioimis-

alue $10^5 - 20 \cdot 10^6$, likimääräinen agaroosipitoisuus 2 %), ja geeli tasapainotetaan sopivalla puskuriliuoksella, jonka pH on noin 7,0, kuten Sörensen'in puskurilla ($1/15$ M puskuriliuos, joka perustuu natrium- ja kaliumfosfaatteihin), laimennettuna suhteessa 1:10. Tähän geelisuodatukseen käytetyn seulan eli geelin tyyppi ei ole kriittinen, ja ainoa vaatimus tässä suhteessa on se, että sen on pystyttävä saamaan aikaan edellä mainitulla molekyylipainoalueella olevien yhdisteiden fraktioiminen. Vielä eräs keksinnön tarkoitukseen käyttökelpoinen geeli on Bio-Gel A-150m (Bio-Rad Laboratories; 100-200 mesh, erotusraja $150 \cdot 10^6$ daltonia, fraktioimisalue $10^6 - >150 \cdot 10^6$ daltonia). Lisätietoja geelisuodatustekniikasta saa H. Determann'in teoksesta "Gelchromatographie", Springer Verlag, Berliini, Heidelberg, New York 1967. Suodatukseen käytetty eluentti on puskuriliuos, jonka pH on noin 7, ja eluaatissa antigeeniaktiviteetti on siinä fraktiossa, joka sisältää mainitun molekyylipainoalueen ja joka otetaan talteen.

Edellä selitetystä geelisuodatuksesta saadut saostetut aktiiviset fraktiot liuotetaan sopivaan puskuriin, jonka pH on noin 7,0, kuten Sörensen'in puskuriin, laimennettuna suhteessa 1:10, ja saadut liuokset suodatetaan kolonnin läpi, joka on täytetty molekyyliseulatyypillisellä heikolla ioninvaihtogeelillä, jolla on heikot ioninvaihto-ominaisuudet, esimerkiksi jollakin polyakryyliamidi-geelillä, kuten Bio-Gel P-2:lla (määritellään jäljempänä), ja kolonni tasapainotetaan samanlaisella puskurilla, jonka pH on noin 7,0. Fraktioksi, jolla on antigeeniaktiviteettia, todetaan liuoksen se fraktio, joka poistuu kolonnista ensimmäisenä, ja tämä fraktio otetaan talteen.

Edellä selitetystä Bio-Gel P-2:lla suoritetusta kromatografias- ta talteenotettua fraktiota käsitellään sitten CAPA:n edelleen puhdistamista varten. Periaatteessa tässä käsittelymenetelmässä on seuraavat vaiheet: proteiinien tai konjugoitujen proteiinien seos saostetaan säätämällä pH isoelektriseen pisteeseen. Näin saatu sakka sekoitetaan sopivaan geeliin, joka valitaan kyseessä olevan proteiinin mukaan. Näin saatu sakan ja geelin seos kerrostetaan kolonnin yläpäähän joka sisältää samaa geeliä samassa isoelektrisessä pH:ssa, so. siinä pH:ssa, joka on isoelektrinen proteiinien saostamiseksi edellisessä vaiheessa. Kolonni eluoidaan sitten vähitellen suurentaen tai pienentäen pH-arvoa. Eluaatista otetaan talteen se fraktio tai ne fraktiot, jotka sisältävät haluttua proteiinia tai proteiineja. Vaikkakaan tätä menetelmää ei haluta sitoa mihinkään nimenomaiseen teoriaan, pidetään todennäköisenä, että proteiiniseoksen erottuminen eri molekyylilajeihinsa on selitettävissä seuraavasti:

Saostetut proteiinit joutuvat ionivirtaukselle alttiiksi, joka saattaa yhden proteiinin toisensa jälkeen liukenemaan. Eri proteiinien solubilisointiseksi tarvittava aika riippuu ioniväkevyydestä, pH:sta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta. Koska kunkin liuenneen proteiinin jakaantumiskerroin on alempi kuin ionigradientin jakaantumiskerroin, proteiini liikkuu geelissä nopeammin kuin ionigradientti. Tämän johdosta proteiini saostuu uudelleen ja jää liikkumattomaksi, kunnes sen liuottaa uudelleen lähestyvä ionirintama. Tämä prosessi toistuu lukemattomia kertoja saaden aikaan toisiinsa nähden vain hiukan poikkeavien molekyyllilajien erottumisen toisistaan.

Bio-Gel P-2 on ristikytetty polyakryyliamidi (100-200 mesh), jonka molekyyllipainon erotusraja on noin 2000, mutta tämä erotusraja ei ole kriittinen. Muita käyttökelpoisia geelejä ovat ristikytetyt dekstraanigeelit, kuten Sephadex G-25, jonka molekyyllipainon erotusraja on noin 25000, mutta tämäkään erotusraja ei ole kriittinen. Nämä geelit ovat molekyylliseulatyyppejä ja niitä käytetään tavallisesti helmimäisinä. Mitä tahansa tällaista molekyylliseulatyypistä geeliä, jonka molekyyllipainon erotusraja on vähintään noin 2000-3000, voidaan tyydyttävästi käyttää. Molekyylliseulatyyppejä geelejä, jotka sopivat geelisuodatuksen tämän gradientteluoinnin yhteydessä on selitetty Gellotte'n artikkelissa "Fractionation of Proteins, Peptides and Amino Acids by Gel Filtration", teoksessa "New Biochemical Separations", Van Nostrand, London/New York, 1964.

Edellä mainitusta kromatografoimista talteenotetuille normaalille ja CAPA-fraktiolle suoritetaan aktiivisen aineen saostus pH:ssa noin 5, jolloin sakka otetaan talteen ja liuotetaan veteen, jonka pH on noin 8,5. Kirkkaiden liuosten pH saatetaan sitten happamalle puolelle sopivasti arvoon noin 5,0 muurahaishapolla, mistä aiheutuu saostuminen. Kukin sakka sekoitetaan samanlaiseen geelilietteeseen kuin edellä, ja joka on saatettu tasapainoon HCOOH-HCOONH_4 :lla pH:ssa noin 5,0. Kukin seos siirretään sitten edellisen mukaisesti tasapainotetun geelikolonnin yläpäähän.

Sakkojen eluoimiseen käytetään pH-gradienttia, tässä tapauksessa progressiivisesti alenevaa pH:ta. Sopiva puskurijärjestelmä on HCOOH-HCOONH_4 tai $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-NH}_3$. Antigeeniaktiviteettia esiintyy eluaatissa alkuperäisen pH:n ja pH-arvoon noin 3 välillä.

Edellämainitulla pH-alueella talteenotettu eluaattifraktio sisältää halutun CAPA:n, joka voidaan ottaa talteen kylmäkuivaamalla. Mainitun eluaattifraktion CAPA:n molekyyllipainon määrittämiseksi fraktio voidaan suodattaa geelikolonnilla, joka on tasapainotettu HCOOH-HCOONH_4 :lla pH:ssa noin 3,0, jolloin geeli on jokin edellä-

mainituista geeleistä. Bio-Gel P-30 (kauppanimi polyakryyliamidi-geelille, jota valmistaa Bio-Rad Laboratories, München, Saksa-BRD; 100-200 mesh, erotusraja 40000 daltonia, fraktiominisalue 2500-40000 daltonia) ja Sephadex G-75 tai G-50 (kauppanimi dekstraani-geeleille, joita valmistaa Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Ruotsi; 40-120 ja 50-150 mikronia, fraktiominisalueet 3-70000 ja vastaavasti 1-30000) ovat erityisen sopivia geelejä tähän suodatukseseen. Eluoidut CAPA-fraktiot joiden spektrofotometrinen absorptiohuippu on aaltopituus-alueella noin 229 - noin 233 nm ja molekyylipaino välillä 20000-27000, otetaan talteen.

CAPA voidaan ottaa talteen aktiivisesta fraktiosta suodatuksen jälkeen kylmäkuivaamalla ja voidaan säilyttää pitkän aikaa tyhjössä, kylmässä ja pimeässä.

Eristetty aine koostuu polypeptidista, joka perustuu yksinkertaiseen peptidiketjuun, mikä voidaan osoittaa permuurahaishappokäsittelyllä. CAPA reagoi emäksisesti ja se on liukoinen pH-välillä noin 1-3,5. Suojaamaton polypeptidi denaturoituu palautumattomasti neutraalissa pH:ssa, s.o. pH:n ylittäessä noin 4,5. Antigeeni on hygroσκοoppinen, muuttuu keltaiseksi, inaktivoituu ja tulee tahnamaiseksi kostuessaan.

Puhdistettu CAPA sisältää fluorisoivan ryhmän joka aktivoituu noin 288 nm:n aaltopituudessa ja lähettää valoa noin 350 nm:n aaltopituudessa. Fluoresenssi on suhteellinen CAPA:n määrään, joten sitä voidaan käyttää polypeptidin läsnäolon määrittämiseen sen eristämisen vaiheen aikana.

CAPA:lla on spektrofotometrinen absorptiohuippu aaltopituus-alueella noin 229-233 nm. Sillä on voimakas taipumus aggregoitumiseen eikä se ole suodatettavissa normaaleilla steriloimisessa käytetyillä suodatuskeinoilla. On osoitettu, että CAPA on peräisin syöpäsolujen seinästä, koska vasta-aineet, joita on kehitetty ruiskuttamalla CAPA:a elävän eläimen kehoon, aiheuttavat syöpäsolujen täydellisen lyysin eli hajaantumisen in vivo kun nämä solut joutuvat näiden vasta-aineiden vaikutukselle alttiiksi.

Niin kuin edellä on mainittu, polypeptidin molekyylipaino on välillä 20000-27000, tarkemmin sanottu noin 24000. Analyysit osoittavat, että se ei sisällä hiilihydraatteja, ja spektrofotometria osoittaa että siinä ei ole nukleiinihappoja. Aminohappo-analysaattorilla sekä hapetusta käyttäen että sitä käyttämättä suoritettut analyysit varmistavat sitä molekyylipainoa, joka on määrätty suodattamalla Bio-Gel P-30:lla tai vastaavalla geelillä.

Eristettyä CAPA:a voidaan käyttää moniin tarkoituksiin, kuten

monospesifisten vasta-aineiden valmistukseen, diagnostisiin tarkoituksiin, immunoimismenetelmiin, ja aktiivisena aineosana seoksiin, joita voidaan käyttää immunoimisaineina.

Antigeenin aktiviteetti in vitro neutraaleissa pH-arvoissa säilytetään kompleksoimalla CAPA:a jonkin inertin proteiinin, kuten ihmis- tai nauta-albumiinin kanssa, jolloin saadaan muodostetuksi kompleksi, joka on liukoinen neutraalilla pH-alueella samalla kun se säilyttää antigeenin aktiviteetin in vitro.

Syöpädiagnoosia varten on kehitetty modifioitu hemagglutinaatio-inhibitiotekniikka. Tällä tekniikalla voidaan määrittää CAPA:n läsnäolo syövän eri kehitysvaiheissa tutkimalla esimerkiksi potilaan seerumia, kudoksia, eritteitä ja uutteita elävistä eläimistä, myös esimerkiksi ruuminavaus- ja leikkausnäytteitä, punktioita ja sivelyvalmisteita. Tämä modifioitu hemagglutinaatioinhibitiotekniikka käsittää menetelmän, jossa on seuraavat vaiheet:

- a) tutkittavasta aineesta valmistetaan sarja näytteitä laimennussarjana;
- b) jokaiseen näytteeseen lisätään ennaltamäärätty määrä anti-seerumia, joka sisältää CAPA:an nähden spesifisia vasta-aineita;
- c) inkubaation jälkeen jokaiseen inkuboituun näytteeseen lisätään ennaltamäärätty määrä CAPA:a, käyttäen hienojakoista kantaja-ainetta;
- d) näin saatua käsiteltyjen näytteiden sarjaa verrataan sarjaan vertausnäytteitä, joissa on pienenevät, tunnetut inhibition aikaansaavat määrät CAPA:a ja ennaltamäärätyt määrät mainittuja vasta-aineita sisältävää antiseerumia, ja sen jälkeen jokaiseen näytteeseen lisätään ennalta määrätty määrä CAPA:a samaa hienojakoista kantaja-ainetta käyttäen; ja
- e) verrataan mainittua näytesarjaa ja mainittua vertausnäyte-

sarjaa tutkittavan aineen sisältämän CAPA-määrän määrittämiseksi ja syövän osoittamiseksi ja sen kehitysvaiheen selville saamiseksi.

Sanonnalla "eläviä eläimiä" ymmärretään tässä selityksessä myös ihmistä.

Keksintöä kuvataan tarkemmin seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1:

Puhtaan antigeenin eristäminen

Koska on osoitettu (Int. Arch. Allergy 36; 191-203 (1969), "Systematic Antigenic Change in Human Carcinoma Tissues by Hemagglutination Techniques", kirj. B. Björklund), että suurin osa syöpäkudoksesta sisältää tämän keksinnön mukaisessa valmisteessa käytettävää antigeeniä, eri tyyppisiä ja eri paikoista peräisin olevia syöpäkudoksia kerättiin kasvainvarastoksi eli pooliksi. Tässä tapauksessa pooli koostui makroskooppisesti puhtaista, histologisesti verifioiduista syöpäkudoksista, jotka olivat peräisin seuraavista elimistä (ruumiinavauksista): rinta, keuhkoputki, umpisuoli, paksusuoli, pohjukaissuoli, sappirakko, munuainen, kurkunpää, maksa, keuhko, ruokatorvi, munasarja, haima, eturauhanen, peräaukko, maha, emä. Normaaleja kudoksia kerättiin lukuisilta yksilöiltä isoantigeeni-, kudosan- ja yksilöantigeenipoolin muodostamiseksi. Käytettiin ruumiinavaustapauksia, ja kasvaindiagnoosit todettiin histologisesti. Lisäksi varmistettiin immunologisen ristireaktiiviteetin perusteella tuoreiden kasvainkudosten ja elävien kasvainsolujen kanssa että asianomainen kasvainantigeeni oli vahingoittumaton. Aseptisuutta ylläpidettiin aina kun se oli mahdollista. Ruumiinavauksista saadut syöpä- ja normaalkudokset leikattiin puhtaiksi naapurikudoksesta ja paloiteltiin 2-3 cm:n kuutioiksi, joita pestiin 0,9 % NaCl:ssa 0°C:ssa, kunnes niistä ei enää lähtenyt veriväriä. Pestyt kuutiot jäädytettiin ja säilytettiin -24°C:ssa.

Vielä jäätyneinä kudoskuutioihin sekoitettiin 10 ml H₂O 0°C:ssa kutakin jäätyneen kudoksen grammaa kohti, ja homogenoitiin jäähdetyssä MSE Ato-Mix-homogenoimislaitteessa (Measuring and Scientific Equipment Ltd, Lontoo, Englanti). jossa oli pyörivät terät, "puolella nopeudella", kolmen kulloinkin yhden minuutin pitkän jakson aikana. Tässä yhteydessä huomattakoon, että suspension lämpötila on pysytettävä noin 0°C:ssa, mieluummin hiukan sen alapuolella.

Kylmä homogenaatti kaadettiin kylmiin 1000 ml:n polyeteeni-pulloihin, 400 ml suspensiota ja 400 ml etyylicetteriä -20°C :ssa (Aether ad narcosin pH Nord." sis. 0,002 % difenyyliamiinia, Skånska Bomullskrutfabriken AB:lta, Dösjebro, Ruotsi) sekoitettiin kussakin pullossa ja hämmennettiin -2°C :ssa 120 minuuttia International PR-2 sentrifugi-täristyslaitteessa (International Equipment, Needham Ltd, Mass, USA) moottorin pyöriessä nopeudella 300 kierrosta minuutissa. Seosta sentrifugoitiin $1000 \times G$:ssa -2°C :ssa 5 minuuttia. Tämän vaiheen aikana lipidikerros ei sekoitu kudoskerroksen kanssa. Etyylicetteri ja lipidikerros hylättiin, ja uutettiin toisen kerran 60 minuuttia, sentrifugoitiin 5 minuuttia, ja etteri-lipidikerros poistettiin. Lopuksi sentrifugoitiin $1000 \times G$:ssa -2°C :ssa 30 minuuttia, ja vesikerros poistettiin, vaikka se sisälsi jonkin verran CAPA:a. Jäljellä olevat liukenemattomat aineet otettiin talteen. Jäljellä oleva ettylicetteri poistettiin käyttämällä alipainetta 5 minuuttia.

Antigeenia sisältävä aines suspendoitiin 50 ml:aan H_2O 0°C :ssa, siirrettiin 500 ml:n infuusiopulloihin ja jäädytettiin -70°C :ssa kuivajäällä ja etanolilla.

Lyofilisointi suoritettiin Texvac Type IV A lyofilisaattorissa (Textor, Bad Soden, Taunus, Saksa-BRD), säädetyssä lämpötilassa.

Lyofilisoitua kudosjauhetta jauhettiin ruostumatonta terästä olevassa kuulamylyssä ("Cytolator", Lars Ljungberg Company, Tukholma, Ruotsi) noin -70°C :n lämpötilassa 1 tunti nopeudella 40 kierrosta minuutissa. Jauhamalla saatiin hienoa, harmaanruskeaa jauhetta. Tätä jauhetta uutettiin esijäähdytetyllä ettylicetterillä -2°C :ssa PR-2 tärytyslaitteessa nopeudella 300 kierrosta minuutissa 60 minuuttia ja sentrifugoitiin $1000 \times G$:ssa -2°C :ssa 30 minuuttia. Eetterikerros poistettiin ja sedimentti kuivattiin tyhjössä. Saatua raakaa kudosjauhetta (CTP) voidaan säilyttää vuosikausia 4°C :ssa suljetuissa pulloissa aktiviteetin mainittavasti alenematta.

5 g CTP:tä suspendoitiin pH-arvon ollessa neutraali 500 ml:aan suolaliuosta, joka sisälsi steriilejä jääkuutioita. Suspensio homogenoitiin MSE Ato-mix:issä "puolella nopeudella" kolmen, kulloinkin yhden minuutin pituisen jakson aikana. Lämpötila pysytettiin 0°C :ssa. Seos pidettiin 0°C :ssa 30 minuuttia samalla hitaasti hämmentäen. Sentrifugoitiin $1000 \times G$:ssa 0°C :ssa 40 minuuttia. Sakan päällä oleva neste hylättiin.

Sedimentti suspendoitiin uudelleen 500 ml:aan kylmää, tislattua vettä ja hämmennettiin hitaasti 0°C :ssa 30 minuuttia. Sentrifugoitiin $1000 \times G$:ssa 0°C :ssa 40 minuuttia ja sakan päällä oleva neste hylättiin. Jäljellä oleva sedimentti suspendoitiin 25 ml:aan kylmää tislattua vettä ja jäädytettiin -70°C :ssa (kuivajäätä ja

etanolia). Lyofilisoimalla saatiin pesty kudosjauhe (WTP), jota voidaan säilyttää vuosikausia suljetuissa pulloissa 4°C:ssa.

Valmistettiin vesiuutteet CAPA:sta ja normaalista WTP:stä pH:ssa 9,5 ja väkevöitiin 10 kertaisiksi isoelektrisellä saostuksella pH:ssa 4,8 ja liuottamalla sakka pH:ssa 9,5 kymmenesosaan käytetyn veden tilavuudesta. Saatu väkevöity liuos stabiloitiin lämmittämällä se nopeasti 98-100°C:n lämpötilaan ja ylläpitämällä tämä lämpötila 5-10 minuuttia. Tämä lämpökäsittely hävittää entsyymit, jotka muutoin inaktivoisivat CAPA:n. Stabiloitu uute tuli sameaksi kun siihen lisättiin suolaliuosta pH:ssa 7,5, jäljellä olevien nukleiinihappotyyppisten epäpuhtauksien saostumisen johdosta. Näiden jäljellä olevien epäpuhtauksien saostamiseksi saostettiin erikseen 8,0 ml CAPA:a ja normaaleja vesiuutteita lisäämällä 0,8 ml 10 %:sta NaCl-liuosta. Sentrifugoitiin 27000 x G:ssa 0°C:ssa 1 tunti, minkä jälkeen kirkkaat, sakan päällä olevat nesteet saostettiin isoelektrisesti pH:ssa 4,8 (pH säädettiin 0,1-n HCl:lla tai 0,1-n HCOOH:lla). Sakat liuotettiin 2-3 ml:aan M/150-fosfaattipuskuria, pH 7,0.

Näin saadut kasvain- ja normaalista WTP:stä peräisin olevat liuokset suodatettiin jäädytetyissä Bio-Gel A-50m (joka on määritelty sivulla 5), kolonneissa, joiden sisäläpimitta oli 2,50 cm ja pituus 138 cm, virtausnopeudella 6,3 ml/cm²/h. Geeli tasapainotettiin M/150-fosfaattipuskurilla, pH 7,0, 2 % n-butanolilla, ja eluoitiin samalla puskurilla. Jokaisessa ajossa käytettiin 4-8 ml uutetta, joka sisälsi yhteensä 50-100 mg proteiinia.

Antigeeniaktiviteetti löytyi kasvainuutteen keskifraktiosta. 1,0 ml:n näytemäärä tästä jakeesta, yhteensä 160-180 ml, laimennettiin kolme kertaa ja saatettiin eri pH-arvoihin välillä 2,0-9,0. Viiden minuutin kuluttua huoneen lämpötilassa näytteet siirrettiin kyvetteihin ja niiden valonhajoitus 500 nm:ssa mitattiin 90° kulmassa. Hajoitusintensiteetit piirrettiin pH:n funktiona, jolloin todettiin maksimi pH:ssa 4,8, joka on fraktion isoelektrinen piste. Tämä menettely edustaa uutta tekniikkaa, joka on kehitetty jotta voitaisiin määrittää tarkat ja tarpeelliset olosuhteet CAPA:n puhdistamiselle. Tavanomaista tekniikka isoelektrisen pisteen määrittämiseksi ei voida käyttää alhaisen peptidipitoisuuden takia.

Aktiivisen keskijakeen jäljellä oleva osa saostettiin pH:ssa 4,8 0,1-normaalilla HCl:lla. Sentrifugoitiin 3800 x G:ssa 0°C:ssa 5 minuuttia, jolloin aktiviteetin saanto oli kvantitatiivinen.

CAPA:n edelleen puhdistamiseksi sedimentoidut, aktiiviset keskifraktiot viidestä Bio-Gel A-50m-kolonnista liuotettiin M/150-fosfaattipuskuriliuokseen, jonka pH oli 7,0 (Sörensen'in puskuri 2 %

n-butanolissa), 5 %:iin alkuperäisestä eluaattitilavuudesta. Tämä liuos, joka sisälsi 130 mg proteiinia 8,5 ml:ssa, suodatettiin (edellä määritellyn) Bio-Gel P-2-kolonnin läpi jonka läpimitan suhde korkeuteen oli $1/35$ virtausnopeuden ollessa $35/\text{cm}^2/\text{h}$. Kolonni oli tasapainotettu M/150-fosfaattipuskurilla, jonka pH oli 7,0 (Sörensen'in puskuri 2 % n-butanolissa). Kutakin proteiinin mg kohti sallittiin 10 ml:n kerrostilavuus.

Ensimmäinen fraktio oli aktiivinen ja se eluoitiin eluoimispuskurilla, jonka pH oli 7,0, samalla kun epäpuhtaudet absorboituivat geeliin käytetyssä alhaisessa ioniväkevyydessä. Aktiivinen aine saostettiin pH:ssa 4,8 0,1-M HCOOH :lla ja sentrifugoitiin $3800 \times G$:ssa 0°C :ssa 5 minuuttia. Sedimentti liuotettiin 8,5 ml:aan vettä ja pH saatettiin arvoon 8,5 0,1-M NH_4OH :lla. Kirkas liuos saostettiin uudelleen kolme kertaa 0,1-M HCOOH :lla pH:ssa 4,8, pestiin sentrifugissa samassa pH:ssa ja liuotettiin pH:ssa 8,5. N-butanolin häviämistä seurattiin kaasu-neste-kromatografialla. Lopullinen liuos varastoitettiin ampulleihin, jäädytettiin ja lyofilisoitiin. Saatu tuote oli kuivaa, melkein valkeaa jauhetta ja tämä jauhe varastoitiin -24°C :ssa evakuoiduissa ja suljetuissa ampulleissa.

Identtistä menettelyä sovellettiin normaalista kudoksesta peräisin olevaan uutteeeseen, eikä tällöin todettu aktiviteettia.

Edellä selitetystä kromatografoinnista saadun tuotteen edelleen puhdistamiseksi kehitettiin pH-gradientti-eluointimenetelmä. Tämä menetelmä koostuu periaatteessa seuraavista vaiheista. Proteiinisos, joka on puhdistettava aktiiviseen komponenttiinsa nähden, saostetaan säätämällä pH isoelektriseksi. Sakka sekoitetaan sopivaan geeliin kuten Sephadex G-25:een (edellä määriteltä) tai Bio-Gel P-2:een (edellä määriteltä). Tämä seos kerrostetaan samaa geeliä samassa isoelektrisessä pH:ssa sisältävän kolonnin yläpäähän. Sitten kolonni pH-gradientti-eluoidaan pysyttäen virtausnopeus ja lämpötila vakioina. Kolonni eluoidaan täten väliaineella jonka pH nousee tai laskee jatkuvasti tai portaittain.

Puheena olevassa tapauksessa gradientti-eluointi suoritettiin 15 mg:lle lyofilisoitua, suolatonta CAPA-jauhetta ja aikaisemmin selitetyllä tavalla puhdistettua normaalia antigeenijauhetta, tässä tapauksessa alenevaa pH:ta käyttäen. Jauheet liuotettiin erikseen veteen, jolloin pH asetettiin arvoon 8,5 0,1-n NH_4OH :lla. Kirkkaat liuokset saatettiin sitten pH-arvoon 5,0 0,1-M HCOOH :lla, mistä aiheutui saostuminen. Molemmat sakat sekoitettiin 10 ml:aan Bio-Gel P-2-lietettä, joka oli tasapainotettu vesiliuoksella joka oli valmistettu 0,02-M HCOOH :sta ja 0,02-M HCOONH_4 :sta niin että pH oli 5,0.

Molemmat seokset pantiin 15 ml silikonilla käsitellyn, sisäläpimitaltaan 16 mm ja pituudeltaan 150 mm olevan, edellä selitetyllä tavalla tasapainotetun Bio-Gel P-2-kolonnin yläpäähän. Geeliä kannatti pieni määrä lasivillaa.

Sakkojen eluoimiseen käytettiin pH-gradienttia. Gradienttisekoittimen (Ultrograd, LKB, Ruotsi) avulla pH pysytettiin arvossa noin 5 vähän aikaa sakan pesemiseksi, minkä jälkeen pH vähitellen alennettiin arvoon 2,8. Lopuksi pH korotettiin arvoon 9. Puskurijärjestelmässä oli 0,02-M $\text{HCOOH} - \text{HCOONH}_4$ ja 0,02-M $\text{NH}_4\text{HCOO}_3 - \text{NH}_3$, ja eluointi suoritettiin huoneen lämpötilassa. Virtausnopeus pysytettiin arvossa 27,1 ml kolonnin poikkileikkauksen cm^2 kohti tunnissa.

Kasvainuutteen eluaatti analysoitiin fluoresenssi-spektrometrisesti (aktivoitiin 288 nm:ssa, fluoresenssi 350 nm:ssa). Alkuperäisen pH:n ja pH-arvon noin 3 välinen fraktio otettiin talteen edelleen käytettäväksi. Tuote lyofilisoitiin, kylmäkuivattiin, ja varastoitettiin suljettuihin, evakuoituihin ampulleihin -24°C :seen.

Molekyylikoon karakterisoinniseksi ja puhtauden varmistamiseksi antigeeniaineen liuos suodatettiin Bio-Gel P-30:lla (edellä määritetty) joka oli tasapainotettu puskurilla 0,02-M $\text{HCOOH} - \text{HCOONH}_4$, pH 3,0. pH-eluoitu CAPA liuotettiin pieneen määrään samaa puskuria. Virtausnopeus oli $3,25 \text{ ml/cm}^2/\text{h}$ ja kerätyt fraktiot olivat 1,24 ml. Aktiivisilla fraktioilla oli spektrofotometrinen absorptiomaksimi aaltopituudessa 229-233 nm ja fluoresenssi 350 nm:ssa, aktivoituna 288 nm:ssa.

Tyypillisessä ajossa 10,4 mg:sta CAPA:a, joka oli liuotettu 3,0 ml:aan edellämäinittua puskuria, saatiin silikonoidusta Bio-Gel P-30 kolonnista (sisähalkaisija 2,54 cm, pituus 50 cm) talteen sekä aine että aktiviteetti täydellisesti. Eluointitilavuus varmistaa molekyylipainoalueen 22000-24000. Nämä molekyylipainoluvut saatiin vertaamalla eluointitilavuuksia molekyylipainoltaan tunnettujen yhdisteiden, kuten ribonukleaasin ja insuliinin eluointitilavuuksiin. Kylmäkuivaamisen jälkeen saadaan valkea, hygroskooppinen jauhe, joka saadaan säilymään kylmässä, hapettomassa ja pimeässä tilassa. Tuotetta analysoitaessa ei löytynyt hiilihydraatteja eikä nukleiinihappoja. Aminohappo-analysaattorilla suoritettut analyysit antoivat geelisuodatuksella määritettyjen molekyylipainojen kanssa yhtäpitävät tulokset. Aminohappo-analyyyseillä saatiin seuraavat prosenttiluvut, joiden tarkkuus on $\pm 5 \%$. Laskettu molekyylipaino oli 23200 ± 2500 (standardipoikkeama).

Alaniinia	8,62
Arginiinia	4,57
Asparagiinihappoa	10,39
Kysteiinia	0,95
Glutamiinihappoa	17,04
Glysiiniä	6,87
Histidiiniä	1,00
Isoleusiinia	4,75
Leusiinia	10,49
Lysiiniä	3,69
Merioiiniä	1,91
Fenyylialaniinia	2,75
Proliniä	3,79
Seriiniä	7,74
Treoniinia	5,92
Tyrosiinia	3,21
Valiinia	6,36

Tämä aminohappopitoisuus vastaa teoreettista typpipitoisuutta 16,2-17,8 %. Kokonaistypen määrittäminen Dumas'in mukaan viittaa arvoon 17,0 + 0,5 %. Permuurahaishappokäsittely osoittaa, että tämä polypeptidi pohjautuu yhteen ainoaan peptidiketjuun. Lisäksi tämä polypeptidi, ellei sitä suojata albumiinilla kompleksoimalla, denaturoituu palautumattomasti pH-arvossa yli noin 5.

Tarkalleen samalla tavoin kuin edellä on selitetty, polypeptidi valmistetaan ihmisen istukkakudoksesta.

Esimerkki 2:

CAPA-albumiini-kompleksin valmistus

Edellä selitetyn mukaisesti valmistettua CAPA:a liuotetaan muurahaishappoon (esimerkiksi 0,05-M; pH:n on oltava välillä 2-3). Saadaan kirkas liuos. Tähän liuokseen lisätään albumiinijauhetta tai albumiiniliuosta samassa pH:ssa kuin edellämainittu muurahaishappoliuos (200 paino-osaa albumiinia yhtä CAPA-paino-osaa kohti), jolloin saadaan kirkas CAPA-albumiiniliuos. Sitten liuoksen pH korotetaan hitaasti lisäämällä jotakin emästä (esimerkiksi natriumhydroksidi- tai ammoniakki-vesiliuosta) kunnes pH nousee noin 7,5:een. Tällöin saadaan kirkas liuos, joka sisältää CAPA:n ja albumiinin, kompleksin muodossa.

Tätä liuosta, joka sisältää 12 µg CAPA/ml, voidaan käyttää suoraan jäljempänä selitettävässä diagnoosimenetelmässä, tai kompleksi voidaan eristää valkeana jauheena kylmäkuivaamalla. Jauhe on stabiili kylmässä (+4°C) pitkän aikaa.

Kokeilla on osoitettu, että CAPA-aktiviteetti saadaan maksimaalisesti hyväksi käytetyksi, kun albumiinin ja CAPA:n painosuhde on yhtä suuri tai suurempi kuin noin 200:1.

Esimerkki 3:

Parkittujen ja merkittyjen punaverisolujen valmistus

Tuoretta lampaanverta (1 tilavuusosa) lisätään steriiliin Alsever'in liuokseen (1,2 tilavuusosaa) (Alsever'in liuos valmistetaan 250 g:sta glukoosia, 80 g:sta natriumsitraattihydraattia, 42 g:sta NaCl ja vedestä 10 litraan asti ja pH saatetaan arvoon 6,1 10 % sitruunahappo-monohydraatilla). Seos sentrifugoidaan ja punaverisolut suspensoidaan uudelleen kerran Alsever'in liuokseen ja kaksi kertaa puskuriliuokseen jonka pH on 6,8. Lopuksi valmistetaan punaverisolujen suspensio puskuriin jonka pH on 6,8, niin että punasolupitoisuudeksi tulee 10^9 solua/ml.

Yksi tilavuusosa edelläolevan mukaan valmistettua punaverisolususpensiota lisätään hämmentäen yhteen tilavuusosaan puskuriliuosta, jonka pH on 6,8 ja joka sisältää noin 18 µg parkkihappoa/ml. Tällä tavoin parkitut punaverisolut sentrifugoidaan ja suspensoidaan uudelleen kahdesti puskuriin jonka pH on 7,5. Lopuksi punaverisolut suspensoidaan puskuriin, jonka pH on 7,5 niin, että solupitoisuudeksi tulee 10^9 solua/ml.

Edellä selitetyn esimerkin mukaan valmistettua CAPA-kompleksia liuotetaan puskuriliuokseen, jonka pH on 7,5, niin että CAPA-pitoisuudeksi tulee 3 µg/ml (puhtaana CAPA:malaskettuna). Yksi tilavuusosa edellisen kappaleen mukaan valmistettua parkittua punaverisolususpensiota lisätään tiipoittain 0°C:ssa yhteen tilavuusosaan CAPA-kompleksiliuosta 10 minuutin aikana. Merkityt solut sentrifugoidaan ja suspensoidaan uudelleen puskuriliuokseen jonka pH on 7,5 ja joka sisältää stabiloivan määrän (noin 1,2 til/til) inerttiä ihmisen seerumia, niin että saadaan suspensio, joka sisältää $1,6 \times 10^8$ merkittyä solua ml kohti. Näitä merkittyjä soluja käytetään, niin kuin jäljempänä selitetään diagnoosimenetelmässä.

Esimerkki 4:Diagnostinen menettely

a) Yksinkertainen sokeatutkimus

Eskilstunan Keskussairaalaasta, Ruotsi, saatiin verinäytteitä, joista 42 oli peräisin infektioکلینیکان potilaista; yksi kirurgiselta کلینیکalta; kaksi radioterapiasta; 10 näytettä vastasyntyneistä äideistä; 10 napanuoraverestä ja 10 naisista, jotka olivat raskaina 1-trimesterissä, ja 6 näytettä naisista, jotka olivat raskaana 2-trimesterissä. Lisäksi saatiin 20 verinäytettä 10-vuotiaasta lapsesta Slottsskolan'ista ja 10 näytettä vanhemmista, terveistä henkilöistä tri Lundström'in yksityiskلینیکalta, Eskilstunassa, Ruotsi. Erstan sairaalan kirurgiselta ja sisätautikلینیکalta, Tukholma, Ruotsi, saatiin näytteet 44 potilaasta, Åkeshov'in sairaalasta saatiin näytteet 45 potilaasta ja Karolinska Sjukhuset-nimisen sairaalan kirurgiselta کلینیکalta, Tukholma, Ruotsi, saatiin näytteet 72 potilaasta, jotka oli otettu sairaalaan mahdollista leikkausta varten. Karolinska Sjukhuset-nimisen sairaalan verenluovutuskeskus, Tukholma, Ruotsi, antoi käytettäväksi 118 näytettä 20-67 vuoden, keski-ikältään 37,2 vuoden ($SD \pm 11,3$ vuotta) ikäisistä luovuttajista, ja sairaaloiden klinisistä keskuslaboratoriosta saatiin seerumit 29 potilaasta, jotka olivat hoidossa Radiumhemmet'in yleisillä osastoilla ja 12 potilaasta sen gynekologisilta osastoilta.

Verinäytteiden kokonaismäärä oli 431. Eskilstunasta olevat 111 tapausta tutkittiin klinisesti ja laadittiin sairaskertomus, ei kuitenkaan ilmeisen terveistä yksilöistä. Tukholman tapauksista tehtiin yksityiskohtaiset sairaskertomustutkimukset 101 tapauksessa. Muissa tapauksissa esiintyi muita kuin pahanlaatuisia klinisiä diagnooseja, eikä mitään epäilyä esiintynyt pahanlaatuisista sairauksista.

Laskimoveri siirrettiin Wasserman-putkiin ilman lisäainetta ja lähetettiin laboratorioon, eräissä tapauksissa ensin poistaen hyttymä ja verisolut sentrifugoimalla.

Verianalyysi perustui CAPA:n osoittamiseen modifioidulla hemagglutinaation inhibitiotekniikalla (mikromenetelmä). Periaatteessa käytettiin seuraavaa menettelyä;

25 μ l potilaan seerumia, joka oli absorboitu punaisiin lampaan verisoluihin, titrattiin 8 vaiheessa laimennuksen ollessa 2-kertainen (kertakäyttöisiä mikrotitrauslevyjä) Linbro IS-MRC-96 laimennuslaatoissa, minkä jälkeen 25 μ l spesifistä antiseerumia rajalaimennuksessa (noin 1:2000) lisättiin jokaiseen kuoppaan. Inkuboitiin 22°C:ssa 10 minuuttia, minkä jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin 50 μ l parkittuja ja eristettyjä, ihmisalbumiiniin sidotulla CAPA:lla merkittyjä, noin 6-8 miljoonaa punaisia lampaan verisoluja

sisältävää suspensiota, niinkuin edellä on selitetty (noin $2-4 \mu\text{g}/10^9$ verisolua). Muitakin hienojakoisia kantaja-aineita kuten lateksia, bentoniittia ja kollodiumia, voidaan käyttää punaverisolujen sijasta. Reaktiotulos määritettiin kaltevan peilin ja standardisarjan avulla 4-24 tunnin inkubaation jälkeen $1-2^\circ\text{C}$:ssa. Kontrollia varten käytettiin:

1. CAPA:lla merkittyjä verisoulja ynnä antiseerumia;
2. CAPA:lla merkittyjä verisoluja ilman antiseerumia;
3. Potilaan seerumia ynnä ihmisalbumiinilla merkittyjä verisoluja;
4. Potilaan seerumia ja käsittelemättömiä verisoluja;
5. CAPA:lla merkittyjä verisoluja ja vasta-aineita sarjassa, jossa inhibointi saadaan aikaan portaittain pienenevillä, tunnetuilla CAPA-määrillä.

Verisolujen stabiloimiseksi käytetyt laimennusnesteet sisälsivät kerättyä (so. monista yksilöistä yhdistettyä), inaktivoitua, neutraalia ihmisseerumia.

CAPA-reagenssi valmistettiin kerätystä ihmisyyöpäkudoksesta ja puhdistettiin niin kuin edellä on selitetty käyttäen geelisuodatusta, pH-gradientti-eluointia, suodatusta Bio-Gel P-30:n läpi ja kompleksinmuodostusta albumiinin kanssa.

Antiseerumina käytettiin hevos-anti-HeLa:a 19 päivästä marraskuuta 1962, joka oli absorboitu normaaliin kudokseen, ja poolattua ihmisseerumia. Immunointi suoritettiin pestyllä HeLa-solumurskalla, mitkä solut oli viljelty litteissä lasipulloissa Eaglen väliaineessa, joka sisälsi 20 % inaktivoitua ihmisseerumia. Solut oli otettu talteen EDTA:lla, sentrifugoitu ja pesty kolme kertaa vedellä.

CAPA:n läsnäollessa potilasseerumissa hevos-vasta-aineet neutrauloituivat, mikä johti agglutinaation poisjäämiseen, kun lisättiin polypeptidilla merkittyjä verisoluja. Arvostelu suoritettiin nousevan asteikon 0-6 mukaan, jossa 0 merkitsi inhibition poissaoloa ja 6 merkitsi agglutinaation maksimaalista inhibitiota. Asteikkoarvojen suhde CAPA:n pitoisuuteen seerumi-ml kohti käy ilmi taulukosta 1, joka on saatu kalibroimalla ennaltamäärättyjen CAPA-määrien laimennuksia neutraalissa seerumissa.

Taulukko 1

Likimääräinen asteikon ja CAPA-määrän kalibrointi

Asteikkoarvo	CAPA, $\mu\text{g/ml}$
0	0,03
1	0,04 - 0,08
2	0,09 - 0,12
3	0,13 - 0,24
4	0,25 - 0,49
5	0,50 - 0,99
6	$\geq 1,0$

Lukeminen suoritettiin tietämättä potilaiden terveydentilaa. Tutkimuksen kohteena ollut aines on ryhmitetty niin kuin seuraavasta taulukosta 2 näkyy.

Taulukko 2

CAPA-pitoisuus 431 seerumissa eri ryhmiin kuuluvista yksilöistä numeroasteikon 0-6 mukaan sekä keskimääräiset asteikkoarvot (M) ja standardipoikkeamat (SD). "Radikaalisesti" tarkoittaa tässä yhteydessä, että syöpäkudos on pyritty poistamaan täydellisesti.

Ryhmät	Numeroasteikko							Lukumäärä	M	±	SD
	0	1	2	3	4	5	6				
1. Primäärisyöpä metastaseineen			5	4	1	2		12	3,00	±	1,13
2. Levinnyt syöpä	4	2	1	4	8	2	1	22	2,91	±	1,82
3. Radikaalisesti hoitamaton syöpä	6	10	15	8				39	1,64	±	0,99
4. Hoitamaton primäärisyöpä	3	1	4	2				10	1,50	±	1,18
5. Radikaalisesti poistettu syöpä	19	1	1					21	0,14	±	0,19
6. Muu pahanlaatuinen sairaus kuin syöpä	7	3	1					11	0,45	±	0,68
7. Ei-pahanlaatuinen sairaus	118	3	3	7	1			132	0,26	±	0,22
8. Terveet aikuiset (M = 71 vuotta)	8	2						10	0,20	±	0,42
9. Verenluovuttajat (M = 39 vuotta)	116	2						118	0,02	±	0,13

a) Erojen tilastolliset merkitykset määrättiin likimäärin normaalisti jakautuneen muuttujan Z avulla, joka määritellään seuraavasti:

$$Z = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2}}}$$

- b) jos $Z > 1,96$, eron merkitys on *, mikä merkitsee $0,01 < P < 0,05$
 " $Z > 2,6$, eron merkitys on **, mikä merkitsee $0,001 < P < 0,01$
 " $Z > 3,5$, eron merkitys on ***, $P < 0,001$

c) Tämä ryhmä käsittää 11 positiivista testiä, joista 8 koskee epäiltyä, mutta ei todettua syöpää.

Ylläolevasta taulukosta ilmenee että, ryhmissä "primäärisyöpä metastasaaseineen" ja "levinnyt syöpä" on merkitsevästi korkeammat keskimääräiset asteikkoarvot kaikkiin muihin ryhmiin verrattuna, paitsi vastasyntyneisiin (katso myös taulukkoa 2).

Ryhmissä "radikaalisesti hoitamaton syöpä" ja "hoitamaton primäärisyöpä" keskimääräiset asteikkoarvot ovat merkitsevästi korkeammat kuin kaikissa muissa ryhmissä paitsi kahdessa edellä mainitussa ja ryhmässä "muu pahanlaatuinen sairaus kuin syöpä", johon verrattuna erotus on merkitsevä ($0,01 < P < 0,05$).

Ryhmissä 5-9 ei esiinny keskinäisiä merkitseviä eroja, paitsi ryhmien 7 ja 9 välillä. Tämän eron selityksenä voi olla se, että aitoja, piileviä syöpätapauksia voi esiintyä niiden tapauksien joukossa, joiden asteikkoarvot ovat välillä 1-4.

Positiivinen indikaatio napanuoraveressä ansaitsee tiettyä huomiota. Sen määrittämiseksi, onko CAPA peräisin istukasta, uutettiin palasia tästä kudoksesta. 300 mg:n erä jäädytettyä istukka-kudosta ml kohti puskuroitua fysiologista NaCl-liuosta pH:ssa 7,5 homogenoitiin 0°C :ssa ja sentrifugoitiin $1000 \times G$:ssa 30 minuuttia 0°C :ssa kartiomaisesti laajenevissa putkissa (Markham'in mukaan). Sakan päällä olevat liuokset testattiin CAPA:aan nähden edelläselitetyllä hemagglutinaatiotekniikalla. Sen mahdollisuuden poissulke-miseksi, että saadut inhibitioreaktiot olisivat johtuneet verisoluihin lisätyn CAPA:n epäspesifisestä inaktivoitumisesta, mainittuja veri-soluja ravistettiin jokaisen mittauksen jälkeen ja niihin lisättiin standardimäärä CAPA:aan nähden spesifisiä vasta-aineita. Missään tapauksessa ei todettu antigeenin inaktivoitumista. Vertailuaineksena käytettiin eri lähteistä ja eri paikoista peräisin olevista ihmis-

syöpäkudoksista valmistetun antigeenijauheen uutetta. Tulokset osoittavat, että 26 istukkaa yhtä monesta henkilöstä kaikki poikkeuksetta sisälsivät merkitseviä määriä CAPA:a. Näiden 26 istukan keskiarvo (geometrinen) oli 297 ± 8 mikrogrammaa määrän kudoksen grammaa kohti (0,03 %).

Koska, kuten edelläselitetystä tutkimuksesta käy ilmi, tässä keksinnössä käytettyä CAPA:a syntetisoituu istukassa, ja koska niiden geenien, jotka sisältyvät istukkaan, täytyy myös sisältyä samasta munasolusta kehittyneeseen yksilöön, on taipumus tai kyky valmistaa CAPA:a normaali ilmiö. Normaalisti tämä taipumus on tukahtunut, koska normaalit solut eivät sisällä mitattavia määriä CAPA:a. Syöpäsoluissa sensijaan on tapahtunut taipumuksen aktivoituminen, jolle on ominaista merkitsevä CAPA:n esiintyminen solujen sisässä ja ympärillä. Istukan trofoblastisolujen ja syöpäsolujen antigeeninen ja tietyissä suhteissa funktionaalinen yhtäläisyys ja niiden erilaisuus verrattuna yksilön muihin soluihin näyttää pitävän yhtä sen käsityksen kanssa, että syöpä on ilmaus siitä, että normaalisti esiintyvien taipumustan hallinta on muuttunut.

Koetulosten tilastollinen analyysi osoittaa, että on olemassa varsin merkitsevä korrelaatio todetun syövän ja suurentuneen CAPA-pitoisuuden ($P < 0,001$) välillä. Sama pitää paikkansa kyseessä olevan kasvainmassan suuruuden ja suurentuneen CAPA-pitoisuuden väliseen suhteeseen nähden samoissa ikäryhmissä ($P < 0,001$). Suurentunut CAPA-pitoisuus on todettu lukuisien erilaisten syövänsijaintipaikkojen yhteydessä. Tyypistä ja sijaintipaikasta riippumatta syöpäkasvaimet ovat osoittautuneet CAPA:a sisältäviksi, minkä perusteella näyttää siltä, että mainittu CAPA on yhteistä kaikille tunnetuille syöpätyypeille, so. pahanlaatuisille, epiteelistä alkuperää oleville kasvaimille.

b) Kaksinkertainen sokeatutkimus

Edellä mainittujen johtopäätösten edelleen vahvistamiseksi suoritettiin kaksinkertainen sokeatutkimus, erittäin tarkasti valvotuissa olosuhteissa. Koodattuja verinäytteitä saatiin Eskilstunan Keskussairaalan eri osastoilta, Ruotsi. Tässä tapauksessa mitattiin kvantitatiivisesti potilaiden seerumin CAPA-pitoisuudet.

Tämän kaksinkertaisen sokeatutkimuksen, samoin kuin edellä selitetyn yksinkertaisen sokeatutkimuksen tulokset on yhdistetty seuraaviin taulukkoihin 4-8. Taulukot esittävät seuraavaa:

Taulukko 4 tutkittujen henkilöiden kokonaislukumäärää ja niiden henkilöiden lukumäärää, joilla on syöpädiagnoosi;

Taulukko 5 henkilöiden lukumäärää eri ryhmissä sekä heidän keski-ikänsä sekä tämän poikkeamaa;

Taulukko 6 CAPA:n läsnäoloa kaikkien tutkittujen potilaiden seerumeissa;

Taulukko 7 niiden henkilöiden prosenttimäärää joiden CAPA-pitoisuus oli $\geq 0,15 \mu\text{g/ml}$ seerumia, taulukon 5 ryhmät 9, 10 ja 12 poisjätettyinä;

Taulukko 8 CAPA:n läsnäoloa kasvainten sijaintipaikkojen mukaan taulukon 5 ryhmissä 1-3. "Site nr" tarkoittaa teosta "Cancer Incidence in Sweden 1968".

Taulukko 4

Tutkittujen yksilöiden lukumäärä

Tutkimus	Yksilöiden lukumäärä	Niiden yksilöiden lukumäärä, joiden diagnoosi osoitti syöpää
Yksinkertainen sokea	431	104
Kaksinkertainen sokea	503	49
	934	153

Taulukko 5

Yksilöiden lukumäärä eri ryhmissä sekä keski-ikä ja sen poikkeama

Ryhvät	Yksinkertainen sokeatutkimus				Kaksinkertainen sokeatutkimus			
	Luku- määrä	Keski- ikä v.	±	Poikkeama	Luku- määrä	Keski- ikä v.	±	Poikkeama
1. Syöpä metastasoineen	34	72	±	9	14	66	±	10
2. Hoitamaton syöpä ilman metastaatioita sekä radikaalisesti hoitamaton syöpä	49	67	±	11	14	66	±	12
3. Radikaalisesti poistettu syöpä	21	66	±	15	21	64	±	12
4. Muu pahanlaatuisen sairaus kuin syöpä	11	70	±	7	5	58	±	18
5. Ei-pahanlaatuisen sairaus	132	61	±	22	186	46	±	21
6. Terveet aikuiset	10	71	±	5	46	36	±	14
7. Verenluovuttajat	118	38	±	11	-	-		-
8. 10-vuotiaat ja sitä nuoremmat yksilöt	20	10	±	0	62	2	±	1.5
9. Napanuoraveri	10	0	±	0	20	0	±	0
10. Vastasyntyneet	10	21	±	3	20	25	±	4
11. Raskaana olevat naiset	16	26	±	4	110	26	±	4.5
12. Syöpä in situ	-	-		-	5	27	±	6
Yhteensä	431				503			

Taulukko 6

CAPA-pitoisuus 934 yksilöstä saaduissa seerumeissa

Ryhmät	CAPA $\leq 0,08 \mu\text{g/ml}$ Lukumäärä (%)		CAPA $\geq 0,09 \mu\text{g/ml}$ Lukumäärä (%)		Yhteensä Lukumäärä (%)	
1. Syöpä metastaseineen	9	(19)	39	(81)	48	(100)
2. Hoitamaton syöpä ilman metastaasioireita sekä radikaalisesti hoitamaton syöpä	28	(44)	35	(56)	63	(100)
3. Radikaalisesti poistettu syöpä	36	(86)	6	(14)	42	(100)
4. Muu pahanlaatuinen sairaus kuin syöpä	15	(94)	1	(6)	16	(100)
5. Ei-pahanlaatuinen sairaus	269	(85)	49	(15)	318	(100)
6. Terveet aikuiset	54	(96)	2	(4)	56	(100)
7. Verenluovuttajat	118	(100)	0	(0)	118	(100)
8. 10-vuotiaat ja sitä nuoremmat yksilöt	79	(96)	3	(4)	82	(100)
9. Napanuoraveri	21	(70)	9	(30)	30	(100)
10. Vastasynnyttäneet	25	(83)	5	(17)	30	(100)
11. Raskaana olevat naiset	123	(98)	3	(2)	126	(100)
12. Syöpä in situ	4	(80)	1	(20)	5	(100)
Yhteensä	781	(84)	153	(16)	934	(100)

Taulukko 7

Niiden yksilöiden lukumäärä prosenteissa, joilla CAPA-pitoisuus oli ≥ 0.15 . Taulukon 5 ryhmät 9, 10 ja 12 on jätetty pois.

Ryhmät	%	Lukumäärä
1. Syöpä metastaaseineen	64	48
2. Hoitamaton syöpä ilman metastaasioireita sekä radikaalisesti hoitamaton syöpä	21	63
3. Radikaalisesti poistettu syöpä	10	42
4. Muu pahanlaatuinen sairaus kuin syöpä	0	16
5. Ei-pahanlaatuinen sairaus	6	318
6. Terveet aikuiset	0	56
7. Verenluovuttajat	0	118
8. 10-vuotiaat ja sitä nuoremmat yksilöt	0	82
11. Raskaana olevat naiset	1	126
Yhteensä		869

Taulukko 8

CAPA-pitoisuus ryhmien 1-3 kasvaimen sijaintipaikan mukaan

Sijaintipaikka	Site No ^{x)}	1.Syöpä meta- staaseineen		2.Hoitamaton syöpä ilman metastaasi- oireita sekä radikaalisesti hoitamaton syöpä		3.Radikaali- sesti pois- tettu syöpä		Yh- teen- sä
		≤0.08	≥0.09	≤0.08	≥0.09	≤0.08	≥0.09	
Gingivae mandib.	144			1		1		2
Nasopharynx	146			2	1			3
Oesophagus	150		1	3	1	1		6
Ventricle	151	1	2	1	2	2		8
Intestinum tenui	152	1						1
Colon	153		2	1	7	6		16
Rectum	154		4	1	5	3	1	14
Ves.Fellea, etc.	155		1	1	1			3
Hepar	156		1					1
Pancreas	157		3		1	2		6
Vestibul. nasi, etc.	160				1	1		2
Trachea, pulm etc.	162		4	2	3	5		14
Mammae	170	2	7	1	3	3	2	18
Cervix uteri	229		2	3	1			6
Corpus uteri	198	1	1	1	1	1	2	7
Ovarii, etc.	175	1	4	1	1	2		9
Prostate	177	2	3	3				9
Testis	178		1		1	1		3
Penis, etc.	179				1	1		2
Renes	180	1		3		1		5
Ves.urinaria, etc.	181		1	2	3	3	1	10
Malignant melanoma	190			1	1			2
Thyreoidea	194		1	1	1	2		5
Primäärinen kas- vain, tuntematon alkuperä			1					1
Yhteensä		9	39	28	35	36	6	153

x) Julkaisun "Cancer Incidence in Sweden 1968" mukaan.

Tämän kaksinkertaisen sokeatutkimuksen tulosten tilastollinen analyysi osoittaa sekin varsin merkitsevää korrelaatiota syöpädiagnoosin ja suurentuneen CAPA-pitoisuuden ($P < 0,001$) välillä. Tämä kaksinkertainen sokeatutkimus vahvistaa myös kysymyksessä olevan kasvaimen suuruuden ja suurentuneen CAPA-pitoisuuden välisen yhteyden samoissa ikäryhmissä ($P < 0,001$). Seerumin suurentunut CAPA-pitoisuus on todettu noin 20 erilaisen syöpätyypin ja sijaintipaikan yhteydessä. Kaksinkertainen sokeatutkimus vahvistaa näin ollen täydellisesti nämä uudet havainnot ja niiden käytännöllisen käyttökelpoisuuden.

Seuraavassa esitetään yhdistelmänä lyhyet määritelmät keksintöön liittyvästä polypeptidi-antigeenista ja diagnostisesta menetelmästä.

CAPA:n määritelmä

HeLa-soluja (peräisin v. 1952 esiintyneestä kohtusyöpätapauksesta), viljellään in vitro. Näitä soluja käytetään antigeenin lähteenä. Saatua soluja ruiskutetaan hevosiin jolloin kehittyy spesifinen vasta-aine, jota käytetään antigeenin tunnistamiseen kasvaimissa, seerumeissa, istukassa jne. Viimemainitulla antigeenilla on oltava ja sillä on identtinen immunologinen reaktiokohta (kuin HeLa-antigeenilla) vaikka-kin se voi luonnollisesti olla toisenlainen muissa suhteissa, kun se esiintyy luonnossa.

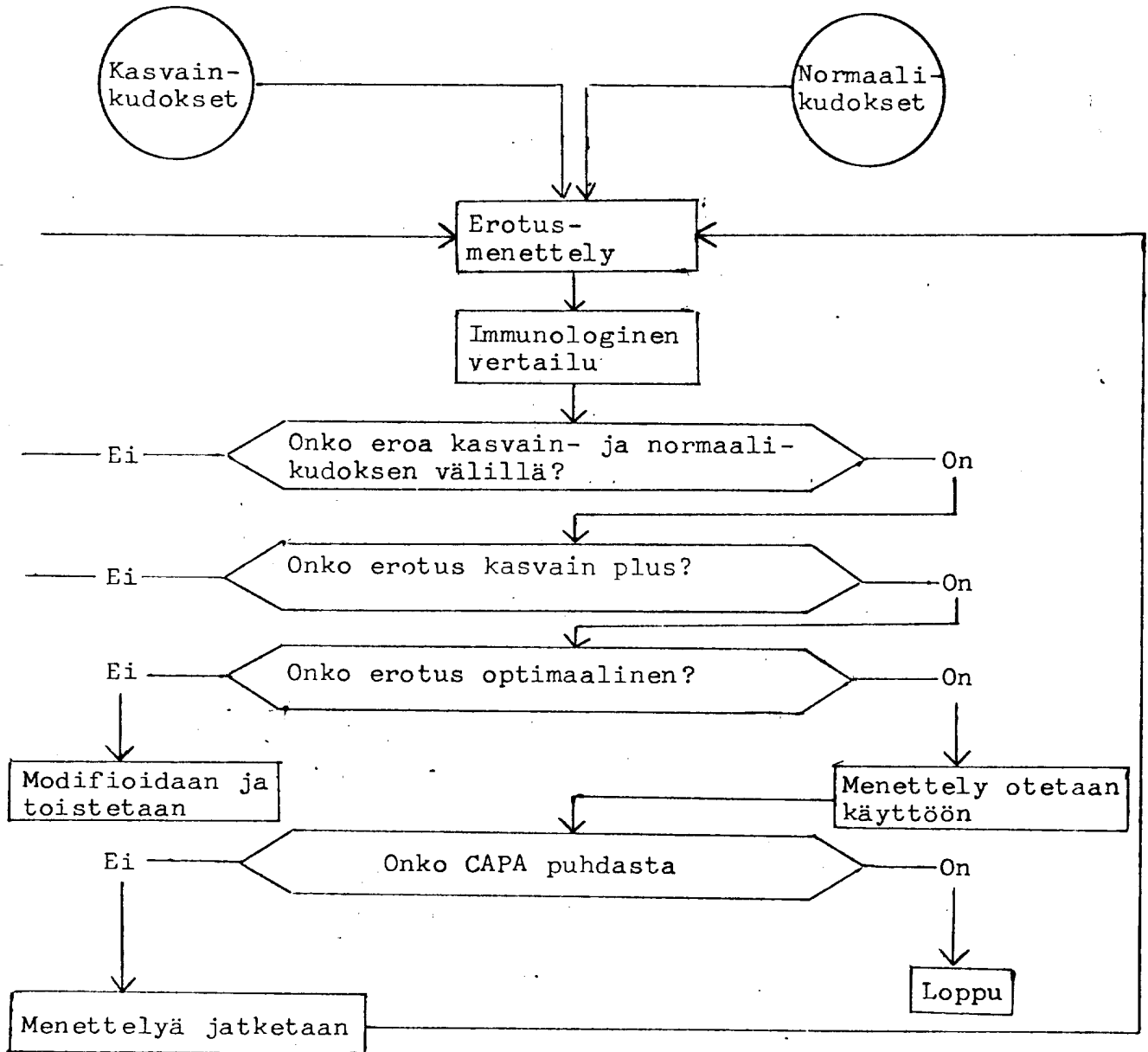
Diagnostisen menettelyn määritelmä

HeLa-soluviljelmistä in vitro saatua antigeenia käytetään vasta-aineen kehittämiseen hevosissa. Ei-toivottujen vasta-aineiden absorption jälkeen hevosseerumia käytetään kasvaimista (tai istukasta tai HeLa- tai HEp-2- tai Detroit-6-viljelmistä) otetulla antigeenilla merkittyjen punasolujen agglutinoimiseen. Tämä on indikaattorijärjestelmä. Jos tuntematon näyte sisältää antigeenista aktiviteettia, se vaikuttaa vasta-aineeseen ja inhiboi agglutinaation.

Kuvio 1.

Kasvaimeen liittyvän antigeenin puhdistus

Virtauskaavio haarautumiseen, joka esittää puhdistusmenettelyn yleistä periaatetta



Patenttivaatimukset:

1. Syövän diagnostisoimiseksi käytettävä valmiste, t u n n e t -
t u siitä, että se aktiivisena aineosana sisältää ihmisen syöpäku-
doksessa läsnäolevaa polypeptidiantigeenia (CAPA), jonka molekyyli-
paino on 20 000 - 27 000 daltonia suodatettuna geelikolonnilla, joka
on tasapainoitettu HCOOH-HCOONH_4 :llä pH-arvossa noin 3,0, geelin ol-
lessa polyakryyliamidigeeli, jonka raekoko on 100-200 mesh (0,149-
0,074 mm), ekskluusioraja 40 000 daltonia ja fraktioimisalue 2500-
40 000 daltonia, jolloin polypeptidin spektrofotometrinen absorptio-
huippu on aaltopituusalueella 229-233 nm ja se perustuu yksinkertai-
seen polypeptidiketjuun, sisältää asparagiinihappoa, glutamiinihap-
poa, leusiinia, fenyylialaniinia ja tyrosiinia oleellisina rakennus-
osina, muodostaa monospesifisesti antigeenin kanssa reagoivia vasta-
aineita, ja denaturoituu eristetyssä tilassa palautumattomasti pH-
arvossa yli 5, jolloin polypeptidiantigeeni on eristetty siten, että
- a) CAPA-pitoista ainetta homogenoidaan nesteessä lämpötilassa, joka
ei ylitä 0°C , ja mahdollisesti käsitellään orgaanisella liuotti-
mella, kuten etyylietterillä tai asetonilla, kylmässä,
 - b) kiinteät aineosat erotetaan vaiheesta a) peräisin olevasta neste-
mäisestä homogenaatin ja kiinteiden aineosien seoksesta,
 - c) mainitut kiinteät aineosat uutetaan alkalisella vesiliuoksella,
 - d) vaiheesta c) saadut uutteen suodatetaan helmimäisellä molekyyli-
seulatyypisellä suodatusgeelillä, joka kykenee fraktioimaan yh-
disteet joiden molekyyli-painoalue on $10 \cdot 10^6 - 20 \cdot 10^6$, erityisesti
noin $15 \cdot 10^6$, geeli eluoidaan ja $10 \cdot 10^6 - 20 \cdot 10^6$ -fraktio, erityi-
sesti noin $15 \cdot 10^6$ -fraktio otetaan talteen,
 - e) vaiheesta d) saatu fraktio kromatografoidaan molekyyliseula-tyyp-
pisellä heikolla ioninvaihtajalla epäpuhtauksien absorboimiseksi
siihen, ja mainitusta ioninvaihtajasta ensiksi poistuva fraktio
otetaan talteen,
 - f) mainittu ensimmäinen fraktio saostetaan isoelektrisesti,
 - g) saatu sakka sekoitetaan molekyyliseulatyypiseen geeliin ja sakan
ja geelin seos pH-gradienttieluoidaan geelikolonnissa,
 - h) pH:ta alentaen otetaan talteen pH-arvoon 3 saakka fraktio, joka
sisältää CAPA:a, ja joka mahdollisesti geelisuodatetaan kolonnissa
ja otetaan talteen antigeenifraktio, jonka spektrofotometrinen
absorptiohuippuaaltopituus on 229-233 nm ja molekyyli-paino 20 000 -
27 000,

yhdessä polypeptidin denaturoitumista estävän määrän kanssa inerttiä proteiinia, mieluummin albumiinia, jolloin inertin proteiinin ja CAPA:n välinen painosuhde on vähintään 200:1.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi sisältää seuraavia aminohappoja, joiden moliprosenttimäärät ovat seuraavat:

Alaniini	8,62
Arginiini	4,57
Asparagiinihappo	10,39
Kysteiini	0,95
Glutamiinihappo	17,04
Glysiini	6,87
Histidiini	1,00
Isoleusiini	4,75
Leusiini	10,49
Lysiini	3,69
Metioniini	1,91
Fenyylialaniini	2,75
Prolini	3,79
Seriini	7,74
Treoniini	5,92
Tyrosiini	3,21
Valiini	6,36

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen valmiste, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi sisältää fluorisoivan ryhmän, joka lähettää fluorisoivaa valoa alueella 350 nm, kun se on aktivoitunut 288 nm aaltopituudella.

4. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen, ihmisen syöpäkudoksessa läsnäolevaa polypeptidiantigeeniä (CAPA) sisältävän valmisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

- CAPA-pitoista ainetta homogenoidaan nesteessä lämpötilassa, joka ei ylitä 0°C , ja mahdollisesti käsitellään orgaanisella liuottimella, kuten etyylicetterillä tai asetonilla, kylmässä,
- kiinteät aineosat erotetaan vaiheesta a) peräisin olevasta, nestemäisestä homogenaatin ja kiinteiden aineosien seoksesta,
- mainitut kiinteät aineosat uutetaan alkalisella vesiliuoksella,
- vaiheesta c) saadut uutteen suodatetaan helmimäisellä molekyyli-seulatyypisellä suodatusgeelillä, joka kykenee fraktioimaan yhdisteet joiden molekyylipainoalue on $10 \cdot 10^6 - 20 \cdot 10^6$, erityisesti

noin $15 \cdot 10^6$, geeli eluoidaan ja $10 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$ -fraktio, erityisesti noin $15 \cdot 10^6$ -fraktio otetaan talteen,

- e) vaiheesta d) saatu fraktio kromatografoidaan molekyyliseula-tyyppisellä heikolla ioninvaihtajalla epäpuhtauksien absorboimiseksi siihen, ja mainitusta ioninvaihtajasta ensiksi poistuva fraktio otetaan talteen,
- f) mainittu ensimmäinen fraktio saostetaan isoelektrisesti,
- g) saatu sakka sekoitetaan molekyyliseulatyyppiseen geeliin ja sakan ja geelin seos pH-gradienttieluoidaan geelikolonnissa,
- h) pH:ta alentaen otetaan talteen pH-arvoon 3 saakka fraktio, joka sisältää CAPA:a, ja joka mahdollisesti geelisuodatetaan kolonnissa ja otetaan talteen antigeenifraktio, jonka spektrofotometrinen absorptiohuippuaaltopituus on 229-233 nm ja molekyylipaino 20 000 - 27 000, ja

näin valmistettu CAPA sekoitetaan polypeptidin denaturoitumista estävän määrän kanssa inerttiä proteiinia, mieluummin albumiinia, niin että proteiinin ja CAPA:n välinen painosuhde on vähintään 200:1.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että homogenointi a) suoritetaan vedessä.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheesta b) saadut kiinteät aineosat lyofilisoidaan ja jauhetaan sitten teräksisessä kuulamylyssä kylmässä.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että jauhaminen suoritetaan -70°C :n lämpötilassa.

8. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen d) suodatus suoritetaan fosfaattipuskurilla pH:ssa 7 tasapainoitettua polyakryyliamidigeeliä, ristikytettyä dekstraanigeeliä, agar- tai agarosigeeliä sisältävässä kylmässä kolonnissa.

9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen e) kromatografointi suoritetaan neutraalissa pH:ssa, kuten fosfaattipuskurilla pH:ssa 7 tasapainoitettussa kolonnissa.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografointi suoritetaan polyakryyliamidigeelikolonnissa.

11. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isoelektrinen saostus f) suoritetaan pH:ssa 5.

12. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa g) käytetään polyakryyliamidigeeliä, ristikyt-

kettyä dekstraanigeeliä, agar- tai agarosigeeliä.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että geelin molekyylipainon eksklusioraja on ainakin 2000 ja on tasapainoitettu HCOOH-HCOONH_4 :llä pH:ssa 5, ja pH-gradienttieluointi suoritetaan kolonnissa, joka on panostettu samalla tavoin tasapainoitettulla, samanlaisella geelillä.

14. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheesta c) saatu vesiute lämmitetään nopeasti lämpötilaan, joka on välillä $95-100^\circ\text{C}$, entsyymien tuhoamiseksi.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesiute lämmitetään $98-100^\circ\text{C}$:seen ja pysytetään tässä lämpötilassa 5-10 minuuttia.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kuumennettu vesiute käsitellään natriumkloridin vesiliuoksella epäpuhtauksien saostamiseksi.

17. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että CAPA:a ja albumiinia sekoitetaan happamassa liuoksessa ja että liuoksen pH:ta korotetaan komponenttien välisen vuorovaikutuksen aikaansaamiseksi.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmiste lyofilisoidaan.

Patentkrav:

1. Preparat för användning vid diagnostisering av cancer, k ä n n e t e c k n a t därav, att det som aktiv beståndsdel innehåller ett i humankancervävnad närvarande polypeptidantigen (CAPA) med en molekyylvikt av 20 000 - 27 000 dalton vid filtrering på en gelkolonn som bringats i jämvikt med HCOOH-HCOONH_4 vid ett pH-värde av ca 3,0, varvid gelet är ett polyakrylamidgel med en kornstorlek av 100-200 mesh (0,149-0,074 mm), en exklusionsgräns av 40 000 dalton och ett fraktioneringsintervall av 2500 - 40 000 dalton, varvid polypeptiden har en spektrofotometrisk toppabsorption inom våglängdsintervallet 229-233 nm, och baserar sig på en enkel polypeptidked, innehåller asparaginsyra, glutaminsyra, leucin, fenylalanin och tyrosin såsom väsentliga byggstenar, bildar antikroppar som reagerar monospecifikt med antigenet, och vilken i isolerat tillstånd denatureras irreversibelt vid pH över 5, varvid polypeptidantigenet isolerats genom att

a) CAPA-haltigt material homogeniseras i en vätska vid en temperatur

av högst 0°C, och eventuellt behandlas med organiskt lösningsmedel, såsom etyleter eller aceton, i kyla,

- b) de fasta beståndsdelarna från blandningen av vätskeformigt homogent och fasta beståndsdelar från steget a) avskiljes,
- c) nämnda fasta beståndsdelar extraheras med en alkalisk vattenlösning,
- d) extrakten från steget c) filtreras på ett filtreringsgel av molekylsikttyp i pärlform med förmåga att fraktionera föreningar med ett molekylviktsintervall av $10 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$, speciellt ca $15 \cdot 10^6$, gellet elueras och $10 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$ -fraktionen, speciellt fraktionen ca $15 \cdot 10^6$, tillvaratages,
- e) fraktionen från steget d) kromatograferas på en svag jonbytare av molekylsikttyp för absorption av kontaminanterna på densamma, och den första fraktionen som lämnar nämnda jonbytare, tillvaratages,
- f) nämnda första fraktion utfälles isoelektriskt,
- g) nämnda fällning blandas med ett gel av molekylsikttyp och blandningen av fällning och gel pH-gradientelueras på en gelkolonn,
- h) genom sänkning av pH ned till pH 3 tillvaratages fraktionen innehållande CAPA och vilken fraktion eventuellt gelfiltreras på en kolonn och den antigenfraktion tillvaratages som har en spektrofotometrisk toppabsorptionsvåglängd av 229-233 nm och en molekylvikt av 20 000 - 27 000,

tillsammans med en polypeptidens denaturering förhindrande mängd av ett inert protein, företrädesvis albumin, varvid viktförhållandet inert protein till CAPA är minst 200:1.

2. Preparat enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att polypeptiden innehåller följande aminosyror med följande molprocenttal:

Alanin	8,62
Arginin	4,57
Asparaginsyra	10,39
Cystein	0,95
Glutaminsyra	17,04
Glycin	6,87
Histidin	1,00
Isoleucin	4,75
Leucin	10,49
Lysin	3,69
Metjonin	1,91
Fenylalanin	2,75
Prolin	3,79

Serin	7,74
Treonin	5,92
Tyrosin	3,21
Valin	6,36

3. Preparat enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att polypeptiden innehåller en fluorescent grupp utgivande fluorescent ljus vid 350 nm vid aktivering vid en våglängd av 288 nm.

4. Förfarande för framställning av ett preparat enligt patentkravet 1, innehållande i humankancervävnad närvarande polypeptidantigen (CAPA), k ä n n e t e c k n a t därav, att

- CAPA-haltigt material homogeniseras i en vätska vid en temperatur av högst 0°C, och eventuellt behandlas med organiskt lösningsmedel, såsom etyleter eller aceton, i kyla,
- de fasta beståndsdelarna från blandningen av vätskeformigt homogenat och fasta beståndsdelar från steget a) avskiljes,
- nämnda fasta beståndsdelar extraheras med en alkalisk vattenlösning,
- extrakten från steget c) filtreras på ett filtreringsgel av molekylsikttyp i pärlform med förmåga att fraktionera föreningar med ett molekylviktsintervall av $10 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$, speciellt ca $15 \cdot 10^6$, gellet elueras och $10 \cdot 10^6$ - $20 \cdot 10^6$ -fraktionen, speciellt fraktionen ca $15 \cdot 10^6$, tillvaratages,
- fraktionen från steget d) kromatograferas på en svag jonbytare av molekylsikttyp för absorption av kontaminanterna på densamma, och den första fraktionen som lämnar nämnda jonbytare, tillvaratages,
- nämnda första fraktion utfälles isoelektriskt,
- nämnda fällning blandas med ett gel av molekylsikttyp och blandningen av fällning och gel pH-gradientelueras på en gelkolonn,
- genom sänkning av pH ned till pH 3 tillvaratages fraktionen innehållande CAPA och vilken fraktion eventuellt gelfiltreras på en kolonn och den antigenfraktion tillvaratages som har en spektrofotometrisk toppabsorptionsvåglängd av 229-233 nm och en molekylvikt av 20 000 - 27 000, och

så framställt CAPA blandas med en polypeptidens denaturering förhindrande mängd av ett inert protein, förträdesvis albumin så, att viktförhållandet protein till CAPA är minst 200:1.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att homogeniseringen a) utföres i vatten.

6. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att de från steg b) erhållna fasta beståndsdelarna lyofiliseras och sedan males i en stålkulkvarn i kyla.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att malningen äger rum vid en temperatur av -70°C .

8. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att under steg d) filtreringen utföres på en kall kolonn innehållande polyakrylamidgel, förnätat dextrangel, agar- eller agarosgel och bringad i jämvikt med en fosfatbuffert vid pH 7.

9. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att under steg e) kromatograferingen utföres vid neutralt pH t.ex. på en kolonn bringad i jämvikt med fosfatbuffert vid pH 7.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att kromatograferingen utföres på en polyakrylamidgelkolonn.

11. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att den isoelektriska utfällningen f) sker vid pH 5.

12. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att under steg g) användes en polyakrylamidgel, förnätat dextrangel, agar- eller agarosgel.

13. Förfarande enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att gelen uppvisar en molekylviktsexklusionsgräns av minst 2000 och är bringad i jämvikt med HCOOH-HCOONH_4 vid pH 5, och pH-gradientelueringen sker i en kolonn innehållande en identisk gel bringad i jämvikt på samma sätt.

14. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att vattenextrakt från steg c) upphettas snabbt till en temperatur inom intervallet $95-100^{\circ}\text{C}$ för förstöring av enzymer.

15. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att vattenextraktet upphettas till en temperatur inom intervallet $98-100^{\circ}\text{C}$ och hålles vid nämnda temperatur under 5-10 minuter.

16. Förfarande enligt patentkravet 15, k ä n n e t e c k n a t därav, att det uppvärmda vattenextraktet behandlas med en natriumkloridvattenlösning för utfällning av kontaminanter.

17. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att man i sur lösning blandar CAPA och albumin och höjer lösningens pH för åstadkommande av samverkan mellan komponenterna.

18. Förfarande enligt patentkravet 17, k ä n n e t e c k n a t därav, att man lyofiliserar preparatet.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 126 680 (A 61 k 17/00).

Muita julkaisuja:-Andra publikationer: GRUR 1973, 463-465.

- J. Exp. Med. 128 (1968) 387-398
- 121 (1965) 439-462
- Nature 215 (1967) 67-68
- Cancer Res. 29 (1969) 1961-1964
- The Proteins, ed. H. Neurath, Vol III (1965), chapter 12, 1-97
- Adv. Clin. Chem. 13 (1970) 383-449
- Ann. Rev. Microbiol. 23 (1969) 199-218
- Amer. Rev. Respiratory Diseases 90 (1964) no 5, 694-699
- L Å Hanson: Immunologi 1968 194-196
- Ugeskrift for Laeger 134 1972, 2363-2370
- Hersh E M - J U Gutterman - G Mavligit: Immunotherapy of Cancer in Man, C.C. Thomas, USA 1973
- Ann. Rev. Biochem. 35 (1966) 896-908
- Br. J. Cancer 26 (1972) 141-153.