

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 832899 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **832899**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -  
International patent classification  
**G01N**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **11.08.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.08.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.02.1984**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

14.08.1982 DE P\_3230299.1

(71) Hakija - Sökande - Applicant

**1 •Hoechst Aktiengesellschaft**, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

**1 •Lamerz, Rolf**, TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Kolster Oy Ab**, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**Karsinoembryonaalinen antigeeni, menetelmä sen eristämiseksi ja sen käyttö.**

**Karcinoembryonal antigen, förfarande för dess isolering och dess användning.**

Karsinoembryonaalinen antigeeni, menetelmä sen eristämiseksi ja sen käyttö

5 Kasinoembryonaalinen antigeeni (CEA) on glykoproteiini, jolla on elektroforeesissa  $\beta_1$ -mobilitaetti ja näennäinen molekyylipaino noin 200 000 Daltonia; sen konsentraation on terveiden koehenkilöiden seerumissa ja/tai plasmassa voitu osoittaa olevan alhainen, joitakin ng/ml, ja potilailla, joilla on pahanlaatuisia kasvaimia, ennen kaikkea suolistossa, maksassa ja haimassa, 10 sen on voitu osoittaa olevan tilapäisesti kohtalaisesti kohonneella tasolla ja tyypillisesti potilailla, joilla on useita pahanlaatuisia kasvaimia (pääasiallisesti ruuansulatuselinten, haiman ja keuhkosyöpä ja metastaaseja muodostava rintasyöpä), sitä muodostuu kasvaimessa, jolloin sen konsentraatio veressä ja muissa kehon nesteissä on selvästi tai vahvasti kohonnut (jopa yli 10 000 ng/ml tasolle asti). Sen olennainen kliininen merkitys perustuu 15 syöpäpotilaiden terapian ja sairauden kulun kontrolliin (leikkaus-, hormoni-, säteily- ja kemoterapia), koska 20 suurella osalla näistä potilaista esiintyy CEA-tason muutoksia, joita saattaa usein ilmetä jo kuukausia ennen taudin kliinistä kehitystä (katsaus julkaisussa Klin. Wschr. 53, 193-203, 1975).

25 Tieteellisessä kirjallisuudessa on kuvattu monia menetelmiä CEA:n uuttamiseksi, puhdistamiseksi ja eristämiseksi (Klin. Wschr. supra). Useimmiten kasvainkudoksen uuttamiseen käytetään perkloorihappoa. Useimmissa menetelmissä jatkopuhdistukseen käytetään geelisuodatus- ja 30 elektroforeesivaiheiden yhdistelmää, joissakin menetelmissä myös lisäksi immunoabsorptiota.

Lähtöaineeksi sopii myös vastaavasta soluviljelmästä saatu CEA.

35 Nyt on keksitty, että erittäin puhtaasta CEA:ta saadaan ilman elektroforeesivaihetta CEA:ta sisältävistä

perkloorihappouutteista siten, että

a) suurimolekyylipainoiset proteiinit erotetaan geelisuodatuksella,

5 b) eluaatista erotetaan selektiivisesti immuno-adsorptiolla proteiinit, joilla on CEA-antigeenisyyttä, ja

c) niistä erotetaan nestekromatografialla suuri-erotuskykyisiä kolonneja käyttäen (nimitetään seuraavassa "suuritehokromatografiaksi") CEA.

10 Näin saatu CEA on elektroforeettisesti heterogeenistä, mutta immunologisesti kuitenkin yhtenäistä. Se soveltuu diagnostisiin tarkoituksiin käytettävien radiojodilla merkittyjen johdannaisten valmistukseen.

15 Seuraavassa selvitetään lähemmin keksinnön edullisia suoritusmuotoja:

Korkea molekyylipainoisten proteiinien erottaminen sopivissa kolonneissa suoritetaan geelisuodatuksella käyttäen verkkoutettuja dekstraaneja, joiden proteiinifraktiointialue on sellainen, että molekyylipainoltaan 20 myös merkittävästi CEA:n molekyylipainon ylittävät proteiinit erottuvat. Eluaatti kerätään fraktioina, CEA-pitoisuus määritetään tavanomaisin analyysimenetelmin, CEA-positiiviset fraktiot yhdistetään ja konsentroidaan.

25 Riippuen uutteen sisältämien CEA:n kanssa ristiin reagoivien komponenttien (pääasiassa NCA = nonspecific cross reacting antigen) pitoisuudesta suoritetaan jo tässä vaiheessa esipuhdistus ja myöhemmin eluoituvan NCA:n (koska alempimolekyylipainoinen) erottaminen.

30 On mahdollista, joskaan ei välttämätöntä, puhdistaa eluaatit lisäkromatografiavaiheella. Tähän voidaan käyttää kolonna, jonka proteiinifraktioiden erotusalue on kapeampi, esimerkiksi fraktiointialue  $5 \cdot 10^3$  -  $5 \cdot 10^5$  D. Näin saadaan usein parempi CEA:n ja NCA:n erotus.

35 CEA-positiiviset fraktiot, joista tällä tavalla on poistettu korkeampimolekyylipainoiset sekä myös alempi-

molekyylipainoiset proteiinit, erotetaan seuraavassa keksinnön mukaisessa vaiheessa immunoadsorptiolla. Tähän tarkoitukseen täytetään sopiva adsorptiokolonni polyklonaalisen anti-CEA-antiseerumin esipuhdistetuilla IgG-globuliineilla, joka anti-CEA-antiseerumi on saatu esimerkiksi immunoimalla kaniineja tai vuohia, tai monoklonaalisella anti-CEA-antiseerumilla. Edellä olevasta vaiheesta saadut CEA-positiiviset fraktiot viedään tähän affiniteettikromatografiakolonnin, josta aluksi eluoidaan ei-sidotut proteiinit. Tämän jälkeen eluoidaan vasta-aineisiin sidotut proteiinit desorptiopuskurilla, ja eluaatti konsentroidaan.

Voidaan myös valmistaa toinen affiniteettikromatografiakolonni, joka sisältää normaalia perkloorihappo-keuhkouutetta kytkettynä polyklonaalisen anti-CEA-antiseerumin kanssa, jolloin NCA:n vasta-aineet sitoutuvat ja saadaan poistetuksi antiseerumista.

Edelleen on mahdollista valmistaa lisäksi affiniteettikromatografiakolonni, jossa on ihmisen seerumiproteiinin, kuten albumiinin, alfa<sub>1</sub>-antitrypsiinin tai happamen alfa<sub>1</sub>-glykoproteiinin vastaisia kytkettyjä IgG-vastaaineita. Kromatografoimalla CEA-pitoisia preparaatteja tällä kolonnilla on mahdollista poistaa sellaisia seerumiproteiiniepäpuhtauksia, jotka adsorboituivat ensimmäisessä affiniteettikromatografiassa epäspesifisinä.

Näin saadut fraktiot sisältävät intaktin CEA:n ja NCA:n ohella vielä CEA-pilkkoutumia, jotka myös olivat reagoineet immunoadsorptiokolonnin anti-CEA-vasta-aineiden kanssa. Lisäerotuksena käytetään senvuoksi vielä HPLC-vaihetta.

Tässä viimeisessä vaiheessa erotetaan suurierotuskykyisellä HPLC-kolonnilla edellisistä vaiheista saadut CEA-positiiviset fraktiot. Näin saadaan seuraavat fraktiot:

I. molekyylipainoalue 250 000 - 150 000: puhdas intakti CEA,

II. molekyylipainoalue 150 000-80 000:immunoreaktiivisia CEA-pilkkoutumia (sopivat vielä immunointiin) ja

III. molekyylipainoalue 60 000-40 000:intakti NCA ja alempi molekyylipainoisia CEA-pilkkoutumia.

5 Fraktiota I voidaan konsentroida jälkeen käyttä suoraan CEA:n radiojodimerkitsemiseen kloramiini-T-menetelmällä.

Konsentroidut fraktiot voidaan sopivaa kolonnia käyttäen tehdä suolattomiksi ja sitten lyofilisoida.

10 Seuraavissa esimerkeissä valaistaan keksintöä lähemmin. Prosentit tarkoittavat paino-%:teja, jollei muuta ilmoiteta.

Esimerkeissä käytetty CEA-uute saatiin Krupeyn et al. (Immunochem. 9, 617, 1972) menetelmän muunnoksella:

15 Useasta kasvaimesta otettua kudosta (primaarikasvaimet: paksusuolen syöpä ym.; maksametastaaseja; uutto-kertaa kohti kostean paino noin 500-1000 g) säilytetään  $-70^{\circ}\text{C}$ :ssa, ennen käyttöä kudot sulatetaan, leikellään saksilla ja veitsellä kappaleiksi ja hienonnetaan sitten koneellisesti (Braun-Multimix, Virtis-homogenizer "60" firmasta Cenco: 30 000 r/min, 1 h,  $4^{\circ}\text{C}$ ) yhtä suuren tilavuuden kanssa steriiliä tislattua vettä ja lopuksi homogenoidaan Potter-Elvehjem-laitteessa (60 ml astia, firma Braun) ja lasisurvoimella hienodisperssiseksi vel-

20 liksi. Tähän kudovelliseksi tai vahvasti CEA-pitoiseen kehon nesteeseen (esim. keuhkojen tai vesivatsan tulehdus-neste, CEA-pitoisuus yli 1000 ng/ml) lisätään yhtä suuri tilavuusmäärä 1,2-m perkloorihappoa, ja seosta sekoitetaan 30 minuuttia huoneen lämpötilassa. Seos lingotaan

30 (1000 g, 20-30 minuuttia, huoneen lämpötila), sakka hyljätään ja päällä oleva neste viedään suoraan, jos se on kirkasta, tai sen ollessa sameata (rasvapitoista) esisuodatuksen jälkeen ("Blauband"-suodatin no. 589, Schleicher & Schü 11) dialyysiletkuihin (firma Kalle, Hoechst AG:n haaraliike; kaliiperi 38, pituus aina 100 cm:iin asti)

35

ja dialysoidaan niissä 24 tunnin ajan, jolloin letkut ovat säiliöissä, joissa vesijohtovesi virtaa jatkuvasti koko ajan vaihtuen (1-3 l/min). Tämän jälkeen dialysaattiin (noin 1-3 l) lisätään  $\text{NaN}_3$ :a (0,02 %) ja seos konsentroidaan noin 100 ml:ksi konsentrintilaitteessa (firma Amicon, ultrasuodatuskenno UF 400 dialysointimembraanilla PM 10, säiliö 4 l), laimennetaan jälleen 10-kertaiseen tilavuuteen steriilillä kahdesti tislatussa vedellä ja konsentroidaan taas 100 ml:ksi. Tämä loppukonsentraatti lingotaan (10 000 g, 1 h,  $4^\circ\text{C}$ ), päällä oleva neste ultrasuodatetaan (Sartorius-suodatin  $\varnothing$  25 mm, 0,2, 0,6 ja 3,0  $\mu\text{m}$ ) ja lyofilisoidaan. Lähtöaineesta, kosteasta kudoksesta (500-1000 g) saadaan perkloorihappoutetta 500-5000 mg.

#### Esimerkit

##### 1. Geelisuodatus

250-350 mg uutetta geelisuodatettiin kolonnissa (2,5 . 80 cm), joka oli täytetty N,N'-metyleeni-bisakryyliamidilla verkkoutetulla allyyli-dekstraanilla, jonka helmien läpimitta on 40-105  $\mu\text{m}$  ja jonka proteiinifraktiointialue on  $2 \cdot 10^4 - 8 \cdot 10^6$  (Sephacryl S 400, firma Pharmacia) (kolonni 1) käyttäen eluointiin 0,05-m tris-HCl-puskuria, pH 6,5 (tris-(hydroksimetyyli)amino-metaani-hydrokloridi; puskuri 1). Eluointinopeus oli 20-25 ml/h; koottiin 5 ml:n fraktioita. Saatiin seuraava eluutiodiagrammi (transmissio mitattu aaltopituudella 280 nm:

1. pieni esipiikki (fraktio 1),
2. välivyöhyke (fraktio 2),
3. leveä pääpiikki, joka nousee jyrkästi (fraktio 3) ja
4. laskee loivasti (fraktio 4).

Kootuille 5 ml:n yksittäisfraktioille suoritettiin immunodiffuusiokoeanti-CEA-vertailuantiseerumilla ja vastaavasti CEA-RIA-koe, ja fraktiot yhdistettiin edellä mainituiksi kootuiksi fraktioiksi.

Fraktio 1 ei sisältänyt CEA:ta (eikä NCA:ta), fraktioissa 2-4 CEA:n osuus väheni tasaisesti ja NCA:n osuus kasvoi fraktiosta 3 lähtien.

Haluttaessa fraktiot 2-4 (erikseen tai yhdessä) voidaan kromatografoida uudelleen paremman CEA- ja NCA-pitoisten yksittäisfraktioiden erotuksen saamiseksi. Tähän käytetään Sephacryl S 200-kolonnia (2,5 . 80 cm, proteiinifraktiointialue  $5 \cdot 10^3$ - $2,5 \cdot 10^5$ ; kolonni 2). Tällöin saadaan fraktiot 5-7, joista fraktio 5 sisältää pääasiallisesti CEA:ta ja fraktiot 6 ja 7 pääasiallisesti NCA:ta.

Fraktiot 2-4 tai 5-7 dialysoitiin konsentroidi/-dialysointi-laitteessa (konsentroidiastia, jossa on kolloidiumhylsyjä, firma Sartorius) puskuria (0,15-m natriumkloridia 0,02-m natriumfosfaattipuskurissa, pH 7,3, jossa 0,02 % natriumatsidia; puskuri 2) ja konsentroidiin 0,5-1,5 ml:ksi.

Jos kolonni 1:n sijasta käytetään agarosikolonnia <sup>®</sup>Sepharose 6 B (firma Pharmacia; kolonni 3), saadaan myös hyviä tuloksia.

Jos kolonni 2:n sijasta käytetään <sup>®</sup>Sephadex G 200-kolonnia (firma Pharmacia; kolonni 4), saadaan vertailukelpoinen erotus.

## 2. Affiniteetti-kromatografia (immunoadsorptio)

Immunoadsorptiokolonniin tarvittava anti-CEA-antisээрumi valmistettiin immunoimalla kaniineja erittäin puhtaalla CEA:lla tai esipuhdistetulla CEA-pitoisella perkloorihappouutteella. Se absorboitiin lyofilisoidulla normaaliseerumilla (noin 10 mg/ml) ja pestyllä ihmisen A/B-punasoluilla (antiseerumin dekomplementaation jälkeen), kunnes saavutettiin reagoimattomuus (immunodiffuusio, mikroskooppikoe).

Antiseerumin absorption päätyttyä seurasi IgG-valmistus jatkuvalla anioninvaihtokromatografialla DEAE-Sephacel <sup>®</sup>-kolonnissa (dietyyliaminoetyyliselloosa, firma Pharmacia; kolonni 5). Lähtöpuskurina käy-

tettiin 0,01-m natriumfosfaattipuskuria, pH 8,0 (puskuri 3) ja rajapuskurina 0,5-m natriumfosfaattipuskuria, pH 4,5 (puskuri 4), ja eluointi suoritettiin erittäin koveralla pH- ja molariteettigradientilla (esim. käyttäen Ultrograd-gradienttisekoitinta, firma LKB). CEA-reaktiiviset puhtaat anti-CEA-IgG-fraktiot (alkufraktiot; fraktio 8) valittiin immunodiffuusio- tai immuno-elektroforeesikokeen perusteella, ajallisesti myöhemmin eluoituvat CEA-reaktiiviset vasta-aineet, joissa oli kuitenkin epäpuhtautena muita proteiineja, kerättiin erikseen ja käytettiin antiseerumeina immunodiffuusiossa tai immuno-elektroforeesissa (fraktio 9).

Immuno-adsorptiokolonnin valmistamiseksi kolonni (1,5 . 20 cm) täytettiin 10-20 g:lla verkkoutettua dekstraania (bromisyaani-aktivoitu Sepharose 4 B, firma Pharmacia; kolonni 6) ja siihen kytkettynä olevalla 100-200 mg:lla kromatografisesti puhdistettua anti-CEA-antiseerumin (fraktio 8) IgG-globuliinia. Tähän kolonniin vietiin 2-4 ml fraktioita 2-4 tai 5-7 ja eluointi hitaasti (20 sek/tippa) puskurilla 2 2-4 tunnin aikana (transmissiomittaus 280 nm:llä). Sitoutumattomien proteiinien täydellisen eluoitumisen jälkeen eluointi (10 sek/tippa) vasta-aineisiin sidotut proteiinit desorptiopuskurilla (puskuri 2, jossa 2,0-m KSCN, pH 7,3; pus-kuri 5). Tällöin eluutiogrammissa nähtiin korkea terävä gradientti, joka edelleen eluotaessa vähitellen asettui tasoksi, joka KSCN:n vaikutuksesta transmissioon 280 nm:llä oli selvästi korkeammalla kuin lähtötaso (100 %:n transmissiolinja). Eluution tapahduttua täydellisesti (tasolinja on yhdensuuntainen 100 %:n linjan kanssa) kolonni regeneroitiin puskurilla 2, jolloin eluutiogrammissa tasolinja aleni jälleen transmissiomittauksen 100 %:n lähtölinjalle.

Saatiin seuraavat fraktiot:

35 fraktio 10 (sitoutumattomat proteiinit),  
fraktio 11 (välifraktio) ja  
fraktio 12 (sidotut proteiinit). Fraktio 12 sisälsi

intaktia CEA:ta, CEA-pilkkoutumia ja NCA:ta.

Fraktio 10 konsentroidtiin 0,5-1,0 ml:ksi dialysoimalla puskuria 2 vastaan (kolloidiumhylsy), ja sen CEA/NCA kokeiltiin. Fraktio 11 hyljättiin. Fraktio 12 dialysoitiin 0,05-m natriumfosfaattipuskuria, pH 7,5 (puskuri 6), vastaan ja konsentroidtiin 50-200  $\mu$ l:ksi.

Kun kolonniin 6 oli lisäksi käytetty täytteenä sellaisen antiseerumin anti-CEA-IgG-vasta-aineita, joka oli aikaisemmin absorboitu normaalilla perna- tai keuhkokuodosuutteella (vahvasti NCA-pitoinen) eikä siten sisältänyt vasta-aineita NCA:ta vastaan, niin fraktio 12 ei tässä tapauksessa sisältänyt enää NCA:ta.

Jos fraktiossa 12 johtuen epäspesifisestä adsorptiosta kolonnissa 6 on vielä seerumiproteiiniepäpuhtauksia (esim. albumiinia, alfa<sub>1</sub>-antitrypsiiniä, hapanta alfa<sub>1</sub>-glykoproteiinia), nämä epäpuhtaudet voidaan poistaa immunoadsorptiolla käyttäen vielä lisänä kolonnia 7, joka sisältää ihmisen seerumiproteiinien vastaisia kytkettyjä IgG-vasta-aineita, tai perkloorihappouutetuilla seerumiproteiineilla, jolloin ensiksi eluoitunut fraktio (fraktio 13) sisältää CEA/NCA:ta, jossa ei ole seerumisproteiineja.

Jatkokäsittelyyn käytetyt fraktiot sisältävät intaktin CEA:n ja NCA:n ohella vielä CEA-pilkkoutumia.

### 3. Suuritehokromatografia

Lopullinen CEA:n, NCA:n ja CEA-pilkkoutumien eristäminen tapahtuu suurierotuskykyisellä steerisellä pois-sulkemiskromatografialla HPLC-kolonnissa (Ultrapac TSK G 4000 SW, 7,5 . 600 mm, proteiinifraktiointialue 5000-1 000 000, firma LKB; kolonni 8). Tällöin käytettiin LKB:n HPLC-laitteistoa (Multi-Perpex-pumppu, UV-läpivirtausfotometri Uvicord S, fraktionkerääjä ultrorac II, 2-kanava-tasopiirturi), konsentroitua fraktiota 12 käytettiin 50-250  $\mu$ l, joka määrä sisälsi 50-500  $\mu$ g proteiinia. Eluointiin puskurilla 6 eluutionopeudella 6 ml/tuntia keräten 350  $\mu$ l:n fraktioita 5 tunnin kokonaiserotusaikana.

Eluutiogrammissa (mitattu transmissio ja absorptio vaihtelevilla herkkyyksillä 0,01:stä 0,1:een aaltopituudella 280 nm) oli 3 pääasiallista piikkiä, joista keskimmissä oli olake, so. se koostui vähintään kahdesta alafraktiosta.

Eluutiogrammin mukaisesti koottiin seuraavat fraktiot:

fraktio 14 (pääfraktio, CEA-reaktiivinen),

fraktio 15 (CEA-reaktiivinen) ja

fraktio 16 (NCA-reaktiivinen ja CEA-reaktiivinen).

HPLC-kolonne kalibroitiin vertailuproteiineilla (molekyyli-painosta 330 000 (tyroglobuliini) molekyypainoon 14 400 (~~α~~-laktalbumiini)), jolloin saatujen fraktioiden molekyylipainot voitiin arvioida seuraaviksi:

fraktio 14: 250 000 - 150 000 D

fraktio 15: 150 000 - 80 000 D

fraktio 16: 80 000 - 40 000 D.

Konsentroituna 100 - 200  $\mu$ l:ksi puskurissa 6 voidaan fraktioita välittömästi käyttää radiojodimerkitsemiseen kloramiini-T-menetelmällä. Ne voidaan myös suolanpoiston jälkeen (Sephadex G 25-kolonne 2,0 . 20 cm; kolonne 9) lyofilisoida, jolloin lopulliset proteiini-määrät ovat 100 - 1000  $\mu$ g.

Fraktio 14 sisälsi erittäin puhdasta intaktia CEA:ta ja fraktio 16 intaktia NCA:ta, kun taas fraktio 15 sisälsi immunoreaktiivisia CEA-pilkkoutumia, joita voidaan esimerkiksi vielä käyttää immunointiin.

#### 4. Jodin liittäminen CEA:han

20  $\mu$ g CWA:ta 20  $\mu$ l:ssa 0,05-m natriumfosfaattipuskuria, pH 7,4 (seuraavassa "puskuri 7") sekoitettiin  $\text{Na}^{125}\text{J}$ :n (1,5 mCi) (puskuroitu 10  $\mu$ l:lla 0,5-m puskuri 7:ää) kanssa, seokseen lisättiin kloramiini-T-liuosta (20  $\mu$ g kloramiini T:tä 100  $\mu$ l:ssa 0,05-m puskuria 7) ja reaktioseosta sekoitettiin 60 sekuntia. Reaktio pysäytettiin sitten lisäämällä natriummetabisulfiittia (20  $\mu$ g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  50  $\mu$ l:ssa 0,05-m puskuria 7), sekoit-

tettiin vielä 30 sekuntia ja seokseen lisättiin sen stabiloimiseksi 0,2 ml nautaseerumialbumiiniliuosta (1 % nautaseerumialbumiinia, 0,05-m puskuria 7, 0,01 %  $\text{NaN}_3$ ).

5            $^{125}$ :llä merkityn CEA:n puhdistus tapahtui erottamalla jodattu seos suurisuorituskykyisellä kromatografi-alla kolonnissa 8. Eluointipuskuri: 0,05-m puskuri 7, 0,1 %  $\text{NaN}_3$ : 0,1 ml/min.

10           Ominaisaktiviteetti: noin 30 mCi/mg, immunoreakti-  
viteetti: noin 90 %.

## Patenttivaatimukset

1. Karsinoembryonaalinen antigeeni (CEA) saatuna  
CEA-pitoisesta perkloorihappouutteesta

5 a) erottamalla suurimolekyylipainoiset proteiinit  
geelisuodatuksella,

b) selektiivisesti erottamalla eluaatista immuno-  
adsorptiolla CEA-antigeeniset proteiinit, ja

10 c) erottamalla nestekromatografialla suurierotus-  
kykyisiä kolonneja käyttäen CEA.

2. Menetelmä CEA:n eristämiseksi CEA-pitoisista  
perkloorihappouutteista, t u n n e t t u siitä, että

a) suurimolekyylipainoiset proteiinit erotetaan  
15 pois geelisuodatuksella,

b) eluaatista erotetaan selektiivisesti immuno-  
adsorptiolla CEA-antigeeniset proteiinit, jotka

c) jaetaan nestekromatografialla suurierotuskykyi-  
siä kolonneja käyttäen eri fraktioiksi.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,  
20 t u n n e t t u siitä, että suurimolekyylipainoiset pro-  
teiinit erotetaan geelisuodatuksella käyttäen verkkoutet-  
tuja dekstraaneja.

4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetel-  
mä, t u n n e t t u siitä, että immunoadsorptioon käyte-  
25 tään kolonnia, jonka täytteenä on anti-CEA-antiseerumin  
IgG-globuliineja.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 2-4 mukainen me-  
netelmä, t u n n e t t u siitä, että CEA erotetaan nes-  
tekromatografialla käyttäen suurierotuskykyisiä kolonne-  
30 ja fraktioina, joiden molekyylipainoalue on 250 000-  
150 000.

6. Yhden tai useamman patenttivaatimuksen 2-5  
mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neste-  
kromatografian CEA-pitoinen eluaatti konsentroidaan ja  
35 merkitään radio-jodilla.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että radiojodimerkitseminen tapahtuu kloramiini-T-menetelmällä.

5 8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukaisella menetelmällä valmistettu radiojodimerkitty CEA.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen CEA:n käyttö diagnostisten valmisteiden valmistukseen.

10 10. Diagnostinen valmiste, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 8 mukaista radiomerkittyä CEA:ta.

## Patentkrav:

1. Karcinoembryonal antigen (CEA), vilken erhålls ur CEA-haltiga perklorsyraextrakt genom
  - 5 a) separering av högmolekylära proteiner genom gefiltrering,
  - b) selektionering av proteinerna med CEA-antigenitet ur eluatet genom immunadsorption och
  - 10 c) separering genom vätskekromatografi med högupplösande kolonner.
2. Förfarande för isolering av CEA ur CEA-haltiga perklorsyraextrakt, k ä n n e t e c k n a t därav, att
  - 15 a) högmolekylära proteiner separeras genom gefiltrering,
  - b) proteiner med CEA-antigenitet selektioneras ur eluatet genom immunadsorption, varefter
  - 20 c) dessa åtskiljs genom vätskekromatografi med högupplösande kolonner.
3. Förfarande enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att de högmolekylära proteinerna separeras genom gefiltrering på tvärförnätade dextraner.
4. Förfarande enligt patentkravet 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att för immunadsorption fylls en kolonn med IgG-globuliner av ett anti-CEA-anti-  
25 serum.
5. Förfarande enligt ett eller flera av patentkraven 2-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att genom vätskekromatografi med högupplösande kolonner separeras CEA som fraktion med ett molviktsområde av 250 000 -  
30 150 000.
6. Förfarande enligt ett eller flera av patentkraven 2-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att det CEA-haltiga eluatet från vätskekromatografen insätts efter koncentration för en radiojodmarkering.
- 35 7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att radiojodmarkeringen sker genom

kloramin T-förfarandet.

8. Radiojodmarkerat CEA, vilket erhålls enligt patentkravet 6 eller 7.

5 9. Användning av CEA enligt patentkravet 1 för framställning av diagnostika.

10. Diagnostikum, k ä n n e t e c k n a t därav, att det innehåller ett radiojodmarkerat CEA enligt patentkravet 8.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggings- och patentskrifter:

FI \_\_\_\_\_

CH \_\_\_\_\_

DE \_\_\_\_\_

DK \_\_\_\_\_

FR \_\_\_\_\_

GB P 1 321 997 (A 61 K 23/00)

P 1 321 998 - " -

P 1 321 999 (G 01 N 33/16)

NO \_\_\_\_\_

SE \_\_\_\_\_

US \_\_\_\_\_

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saks. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

*Ritva Karanen*

Allekirjoitus