



F 1000092832B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****92832****C (15) Patentti myönnetty**
Patent mottat 10 01 100 5

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 07K 7/08, 1/00, G 01N 33/574, A 61K 37/02**SUOMI-FINLAND****(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	894220
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	06.09.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	04.03.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	06.09.89
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.09.94
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/US88/00568
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
06.03.87 US 022759 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Cercek, Boris, 4318 Camphor Avenue, Yorba Linda, Cal. 92686, USA, (US)
2. Cercek, Lea, 4318 Camphor Avenue, Yorba Linda, Cal. 92686, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Cercek, Boris, 4318 Camphor Avenue, Yorba Linda, Cal. 92686, USA, (US)
2. Cercek, Lea, 4318 Camphor Avenue, Yorba Linda, Cal. 92686, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä, menetelmä sen valmistamiseksi ja sen käyttö
Allmän kancer-associerad SCM-igenkännande faktor, förfarande för dess framställning och
dess användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Yleinen syöpään liittyvä SCM-tekijä on eristetty, puhdistettu homogeeniseksi ja karakterisoitu ja sen käyttömenetelmät on kuvattu. SCM-tekijä on peptidi, jonka molekyylipaino on alhainen ja joka kykenee läpäisemään suodattimen, jonka nimellisen molekyylipainon läpäisyraja on 1000 daltonia, mutta ei suodatinta, jonka nimellisen molekyylipainon läpäisyraja on 500 daltonia. Tekijän likimääräinen aminohappokoostumus on seuraava: Asx₂, Glx₃, Ser, His, Gly₅, Thr, Arg, Ala₃, Tyr, Met, Val₃, Phe₃, Ile, Leu₃, Lys₂ ja se voi aiheuttaa ainakin 10 %:n laskun syöpää sairastavien luovuttajien verinäytteistä saatujen potentiaalisesti SCM-vasteen antavien lymfosyyttien solun sisäisessä fluoreseiinin fluoresenssipolarisaatioarvossa. Viidentoista ja kuudentoista aminohapon tryptisiä peptidejä, joihin ei kuulu SCM-tekijän aminopää, on myös puhdistettu ja niillä on myös todettu olevan SCM-aktiivisuutta. SCM-tekijä voi muuttaa lymfosyyttien SCM-vastetta sellaisilla luovuttajilla, joilla ei ole syöpää, sellaisten

luovuttajien lymfosyyttien vasteen suuntaan, joilla on syöpä. Tekijä voi myös pienentää tappajalymfosyyttien luonnollista in vitro -sytotoksisuutta kasvainsolujen suuntaan. Menetelmä SCM-tekijän puhdistamiseksi verestä, joka menetelmä antaa tuloksena tekijän, joka on puhdistettu käytännöllisesti katsoen homogeeniseksi käänteisfaasi-korkeapainenestekromatografiolla, on kuvattu. SCM-tekijä on käyttökelpoinen verinäytteiden seulontaan pahanlaatuisuuden osoittamiseksi

SCM-testillä antajassa. Menetelmät SCM-tekijän in vivo -aktiivisuuden vähentämiseksi, kuten dialyysi tai vasta-aineneutralisaatio, voi myös olla käyttökelpoinen syövän hoidossa.

En allmän, cancerforenad SCM-faktor har isolerats, renats till homogenitet och karakteriserats, och förfaranden för dess användning har beskrivits. SCM-faktorn är en peptid med låg molekylvikt och den kan passera genom ett filter med en nominell avgränsning för molekylvikten 1000 dalton men ej genom ett filter med en nominell avgränsning för molekylvikten 500 dalton. Faktorn har den ungefärliga aminosyrasammansättningen Asx_2 , Glx_3 , Ser, His, Gly_5 , Thr, Arg, Ala_3 , Tyr, Met, Val_3 , Phe_3 , Ile, Leu_3 , Lys_2 och har förmåga att producera en minskning av åtminstone 10 % i det intracellulära fluoresceinfluorescenspolarisationsvärdet hos potentiellt med SCM-reagerande lymfocyter från blodprov, vilka tagits från individer som lider av cancer. Tryptiska peptider av femton och sexton aminosyror, vilka ej inkluderar aminoterminalen hos SCM-faktorn, har även renats och de har SCM-aktivitet. SCM-faktorn kan modifiera SCM-gensvaret hos lymfocyter från individer, vilka är fria från cancer, till gensvars-karakteristiken hos lymfocyter från individer, vilka lider av cancer. Faktorn kan även minska den naturliga in vitro-cytotoxiteten hos mördarlimfocyter i förhållande till tumörceller. Ett förfarande för rening av SCM-faktorn från blod beskrivs och det leder till en faktor, vilken renats till väsentlig homogenitet genom högtrycksvätskekromatografi i motfas. SCM-faktorn är användbar för genomsökning av blodprov visavi närvaron av elakartad cancer hos blodprovsgivaren genom SCM-testet. Förfaranden för reducering av in vivo-aktiviteten hos SCM-faktorn, såsom dialys eller antikroppneutralisering, kan även vara användbara vid hanteringen av cancer.

Keksinnön tausta

20 Esimerkiksi erilaisten ihmisiä ja eläimiä vaivaa-
vien pahanlaatuisten tautien, joihin viitataan yleisesti
syöpänä, hoidossa on huomattu, että taudin aikainen ha-
vaitseminen on olennaisen tärkeätä taudin hoidossa erityi-
25 sesti, koska useimmat terapeuttiset menetelmät tehoavat
paremmin ja ovat turvallisempia syövän sushteellisen var-
haisessa vaiheessa kuin myöhemmin. Esimerkiksi monet kemo-
terapeuttiset lääkkeet, jotka ovat myrkyllisiä pahanlaa-
tuisille soluille, ovat myrkyllisiä myös normaaleille so-
luille ja näin ollen tarvitaan suurempia annoksia pidem-
30 mälle edenneen syövän parantamiseen tai pysäyttämiseen,
jolloin seurauksena voi olla epämiellyttäviä ja vakavia
sivuoireita. Myös kirurginen hoito on useimmiten tehokasta
vain ennen kuin tauti on levinnyt tai lähettänyt etäis-
pesäkkeitä. Aivan liian moni syöpätapaus on havaittu te-
35 hokkaan hoidon kannalta liian myöhään.

Näin ollen on ollut ja tulee olemaan suuri tarve luotettavien testien, joilla voidaan diagnosoida syöpä sen varhaisessa vaiheessa, aikaansaamiseksi ja tällä alueella onkin tehty runsaasti tutkimustyötä. Tässä yhteydessä on
5 kehitteillä uusia testejä ja menetelmiä syövän varhaiseksi toteamiseksi.

Yksi sellaisen testin eniten halutuista ominaisuuksista on sen kyky joko osoittaa yleisesti kaikki syöpätyypit tai tietyt syövän tyypit käytetystä materiaalista riippuen. Tällaisen testin ensin mainittu käyttömuoto on
10 hyvin tärkeä suurien potilasryhmien massaseulonnoissa kuten rutiininomaisissa tarkastuksissa. Sellaisissa massaseulonnoissa tietyistä syöpätyypeistä riippuvainen testi ei olisi toivottava, koska sananmukaisesti on olemassa satoja, jos ei tuhansia, syöpätyyppejä ja testillä, jolla voitaisiin osoittaa vain yksi tai muutama tautityyppi, jäisi havaitsematta monia syöpätyyppejä. Yleisesti ottaen näillä
15 potilailla ei esiintyisi ollenkaan tai vain heikkoja yleisiä oireita, jotka voitaisiin helposti liittää tiettyyn syöpätyyppiin ja näin ollen ei olisi perusteita epäillä jotakin tiettyä syöpätyyppiä eikä käyttää juuri tälle tyyppille spesifistä testiä.
20

Sitä vastoin kun pahanlaatuisuus on voitu osoittaa tai sitä voidaan vahvasti epäillä, olisi edullista, jos
25 olisi olemassa testi, jolla voitaisiin osoittaa pahanlaatuisuuden tyyppi. Sellainen testi lisäisi huomattavasti hoidon tehokkuutta, koska monet tehokkaimmista syöpähoidoista, kuten kemoterapeuttiset aineet, ovat tehokkaita vain yhtä tai parhaimmillaan kapeata tyyppiryhmää vastaan ja vääränlaisesta kemoterapiasta voi olla enemmän haittaa
30 kuin hyötyä.

Tämän tarpeen tyydyttämiseksi ja syövän diagnosoinnin ja varhaisen toteamisen parantamiseksi ihmis- ja eläin-ruumiissa on kehitetty testausmenetelmä, joka käsittelee elävien lymfosyyttien sytoplasma-aineen (SCM) raken-
35

teen muutosten mittaamisen, kun ne on altistettu joko fytohemagglutiinille tai syöpään liittyville antigeeneille. Tämä menetelmä on kuvattu L. Cercekin, B. Cercekin ja C.I.V. Franklinin julkaisussa "Biophysical Differentiation
5 Between Lymphocytes from Healthy Donors, Patients with Malignant Diseases and Other Disorders", Brit J. Cancer 29, 345-352 (1974) ja L. Cercekin ja B. Cercekin julkaisussa "Application of the Phenomenon of Changes in the Structuredness of Cytoplasmic Matrix (SCM) in the
10 Diagnosis of Malignant Disorders: a Review", Europ. J. Cancer 13, 903-915 (1977).

Tämän menetelmän mukaan potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien alapopulaatio erotetaan testattavan potilaan verinäytteestä ja lymfosyyttejä inkuboidaan yhdessä pahanlaatuisen kudoksen tai sen uutosten kanssa. Jos verinäytteen luovuttajalla on pahanlaatuinen tauti, tuloksena on tyypillinen SCM-vaste, joka voidaan erottaa sellaisten lymfosyyttien SCM-vasteesta, jotka on saatu luovuttajilta, joilla ei ole pahanlaatuista tautia.
15 SCM-vaste määritetään mittaamalla SCM-vasteen antavien lymfosyyttien solunsisäisen fluoreseiinin fluoresenssipolarisaation muutokset.

SCM-testissä havaittujen muutosten uskotaan kuvastavan muutoksia lymfosyytin sisärakenteessa, kun lymfosyytti aktivoidaan synteesiä varten. Nämä muutokset havaitaan solujen fluoresenssipolarisaation laskuna, kun polarisoitua valoa käytetään läsnä olevan fluoreseiinin aktivoimiseen. Fluoresenssipolarisaatio mittaa solun sisäisen kiinteyden; mitä suurempi solun sisäinen liikkuvuus on sitä vähemmän voidaan havaita fluoresenssipolarisaatiota.
25 Fluoresenssipolarisaation havaitun vähenemisen uskotaan johtuvan muutoksista mitokondrioiden, solun energiaa tuottavien organellien, muodossa. Mitokondrion muutoksen uskotaan johtuvan kristojen tai mitokondriomembraanin sisäpölmujen kokoon vetäytymisestä. SCM kuvastaa makromolekyylien
30
35

ja pienten molekyylien kuten vesimolekyylien, ionien, adenosiniinitrifosfaatin ja syklisen adenosiinifosfaatin välisiä vuorovaikutussuhteita. Näiden vuorovaikutussuhteiden häiriöt johtavat muutoksiin SCM:ssa.

5 SCM-testi voi reagoida suhteellisen pieniin pahanlaatuisten solujen määriin. Noin 10^9 solua 70 kg painavassa henkilössä on tarpeeksi aiheuttaakseen lymfosyyttien vasteen SCM-testissä pahanlaatuisuudelle ominaisella tavalla. Kun hiiriin siirretään vain $7,5 \times 10^5$ Ehrlichin vesivatsa
10 (kasvain) -soluja, vastemalli SCM-testissä muuttuu; syöväälle tyypillisten antigeenien vaste indusoituu, kun taas fytohemagglutiinin normaalivaste käytännöllisesti katsoen eliminoituu (L. Cercek ja B. Cercek, "Changes in SCM-responses of Lymphocytes in Mice After Implantation with Ehrlich Ascites Cells", Europ. J. Cancer 17, 167-171 (1981)).
15

SCM-testin avulla syöpä voidaan havaita jo varhaisessa vaiheessa, usein paljon nopeammin kuin mitä on mahdollista käytössä olevilla menetelmillä niin että potilaalle tuotetaan suhteellisen vähän epämukavuutta rajoit-
20 tuen lähinnä vain verinäytteen ottamiseen liittyvään epämukavuuteen.

Kuitenkin tällä menetelmällä on haittapuolensa. Esimerkiksi se vaatii raakauutteiden valmistamista kasvainkudoksista tai sen kaltaisista kudoksista tai kasvainkudoksen itsensä käyttämistä syöpään liittyvien antigeenien lähteenä. Pahanlaatuisen kudoksen tai sellaisen kudoksen
25 utteiden käyttöön SCM-testissä liittyy useita huomattavia ongelmia. Joskus on vaikeata saada vaadittua kudospäästä. Myös kokonaisten kudosten tai kudosuutteiden käyttöön voi
30 liittyä häiritsevien ainesosien joutuminen testiin mukaan. Nämä häiritsevät ainesosat voivat vaikuttaa haitallisesti testin herkkyyteen tai itse testituloksiin. Näiden häiritsevien ainesosien läsnäolo tai puuttuminen voi vaihdella pahalaatuisen kudoksen erästä toiseen aiheuttaen epätoivottua muuntelua SCM-testissä. Lisäksi koska häiritsevät
35

ainesosat ovat läsnä kokonaisessa kudoksessa tai raakauut-
teissa, niitä on hyvin vaikeata identifioida tai mitata
niiden määrää.

5 Näin ollen on hyvin toivottavaa identifioida, erot-
taa ja puhdistaa tekijä tai tekijät, jotka aiheuttavat
vasteen SCM-vasteeseen kykenevillä lymfosyyteillä. Sellai-
sen puhdistetun tekijän tai puhdistettujen tekijöiden
käyttö parantaisi SCM-seulontatestiä, koska häiritseviä
10 ainesosia ei olisi läsnä ja edesauttaisi syövän tutkimus-
ta, sen syitä ja vaikutuksia ihmisen ja eläimen ruumiin-
seen.

Keksinnön tiivistelmä

Me olemme löytäneet syövän tunnistustekijöitä eläin-
men ja ihmisen ruumiinnesteistä, nimenomaan veriplasmasta
15 ja virtsasta, jotka, jos luovuttajaruumiissa on syöpä,
antaa vasteen SCM-vasteeseen kykenevissä lymfosyyteissä,
joka vaste on samanlainen kuin tällaisten lymfosyyttien
vaste syöpään liittyviin uutteisiin ja/tai kasvainkudok-
seen SCM-testissä. Kuten tässä on kuvattu tekijät on ni-
20 metty yksikkömuodossaan ja niihin viitataan "yleisenä syö-
pään liittyvänä SCM-tunnistustekijänä", "SCM-tunnistuste-
kijänä" tai mieluiten "SCM-tekijänä".

SCM-tekijän uskotaan olevan peptidi tai peptidin
kaltaista materiaalia ja käsittävän useita lähisukuisia
25 peptidejä. SCM-tekijän uskotaan sisältävän kolmentoista
aminohapon fragmentin, jonka sekvenssi on R_1 -Lys-Pro-Phe-
 R_2 -Phe- R_3 -Met- R_4 - R_5 - R_6 - R_7 , jossa R_1 on valikoitu ryhmästä,
joka käsittää Asn:n ja Gln:n, R_2 , R_3 ja R_4 jokainen erikseen
on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Val:n, Leu:n ja
30 Ile:n, R_5 on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Asp:n ja
Glu:n ja R_6 ja R_7 on molemmat erikseen valikoitu ryhmästä,
joka käsittää Asn:n ja Gln:n. Tämä sekvenssi ei sisällä
SCM-tekijän aminopäätä.

Yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä käsit-
35 tää olennaisena osanaan molekyylipainoltaan alhaisen pep-

tidin, joka kykenee läpäisemään suodattimet, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia mutta ei suodattimia, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 500 daltonia, ja joka aiheuttaa ainakin kymmenen prosentin vähennemisen SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatioarvossa tavanomaisessa SCM-testissä, jotka lymfosyytit on eristetty syöpää sairastavilta luovuttajilta. Edellä kuvatun menetelmän mukaisesti puhdistetun tekijän likimääräinen aminohappokoostumus on

10 Asx₂, Glx₃, Ser, His, Gly₅, Thr, Arg, Ala₃, Tyr, Met, Val₃, Phe₃, Ile, Leu₃, Lys₂.

Perustuen SCM-tekijän tryptisten tekijöiden aminohapposekvenointiin yhden tekijävalmisteen kuudentoista aminohapon segmentin aminohapposekvenssi on seuraava: Phe-

15 Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys, johon sekvenssiin ei sisälly tekijän aminopäätä.

Vaihtoehtoisesti toisessa tekijävalmistuksessa viidentoista aminohapon segmentti on seuraava: Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys, johon

20 segmenttiin ei myöskään kuulu tekijän aminopäätä.

Nämä kaksi tryptistä fragmenttia ovat täysin aktiivisia SCM-testissä. Uskotaan, että ensimmäiset kolmetoista aminohappoa, jotka ovat yhteisiä molemmille fragmenteille, ovat tärkeimmät SCM-aktiivisuuden tuottajat. Näin ollen

25 tärkeä lisätekijä keksinnössä on SCM-tekijä, joka käsittää vain tarkkaan määritellyn sekvenssin peptidit, joilla on joko suoraan osoitettu olevan SCM-aktiivisuutta tai joilla uskotaan sellaista olevan. Laajimmin ilmaistuna sellainen tekijä käsittää olennaiselta osaltaan vain peptidit, johon

30 kuuluu ainakin kolmetoista aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇, jossa R₁ on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Asn:n ja Gln:n, R₂, R₃ ja R₄ ovat jokainen erikseen valikoitu ryhmästä, joka käsittää Val:n, Leu:n ja Ile:n, R₅ on valikoitu ryhmästä,

35 joka käsittää Asp:n ja Glu:n ja R₆ ja R₇ ovat molemmat

erikseen valikoitu ryhmästä, joka käsittää Asn:n ja Gln:n. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

5 Kun molempien tryptisten fragmenttien koko sekvenssi-informaatio käytetään, tuloksena on kaksi erillistä ja rinnakkaista SCM-tekijäluokkaa, joissa kummassakin on edellä määritelty kolmentoista aminohapon fragmentti.

Laajimmin ilmaistuna ensimmäinen luokka käsittää olennaiselta osaltaan vain peptidit, joissa on ainakin
10 viisitoista aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇-R₈-Lys, jossa R₁-R₇ on edellä määritelty ja R₈ on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Ser:n ja Thr:n. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

15 Tässä luokassa tarkemmin määritelty tekijä käsittää olennaisena osanaan vain peptidit, jotka sisältävät sekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys. Nämä peptidit voivat sisältää lisäksi reunasekvenssejä spesifioidun sekvenssin kummallakin sivulla.
20 Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

Tämän luokan tarkimmin määritelty tekijä käsittää olennaisena osanaan puhtaan peptidin, joka pääosaltaan käsittää aminohapposekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-
25 Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys.

Laajimmin ilmaistuna toinen luokka käsittää olennaisena osanaan vain peptidit, joissa on ainakin kuusitoista aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇-Phe-R₈-Lys, jossa R₁-R₇ on
30 määritelty edellä ja R₈ on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Ser:n ja Thr:n. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

Tässä luokassa tarkemmin määritelty tekijä käsittää olennaisena osanaan vain peptidit, jotka sisältävät sekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-
35 Asn-Phe-Thr-Lys. Nämä peptidit voivat sisältää lisäksi

reunasekvenssejä spesifioidun sekvenssin jommalla kummalla sivulla. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

5 Tämän luokan tarkimmin määritelty tekijä käsittää
pääosaltaan puhtaan peptidin, joka käsittää olennaisena
osanaan aminohapposekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-
Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Thr-Lys. Edullisessa muodos-
saan tämän peptidin aktiivisuus SCM-testissä on sellainen,
että 5×10^{-2} femtogrammaa peptidiä tuottaa ainakin 30 %:n
10 laskun polarisaatioarvossa kun käytetään syöpää sairasta-
vilta luovuttajilta saatuja SCM-vasteeseen kykeneviä lym-
fosyyttejä.

SCM-tekijä voidaan tuottaa ultrasuodattamalla syö-
pää sairastavan luovuttajan ruumiinneste ruumiinnesteen
15 ensimmäisen fraktion, joka käsittää näennäiseltä molekyyli-
lipainoltaan yli 1000 daltonin molekyylit, erottamiseksi
toisesta fraktiosta, joka käsittää näennäiseltä molekyyli-
painoltaan alle 1000 daltonin molekyylit. Ruumiinneste on
valikoitu ryhmästä, joka käsittää ääreisveren, virtsan ja
20 plasman. Edullisessa tapauksessa tekijä läpikäy ultrasuo-
datuksen jälkeen vielä lisäpuhdistusprosessin, joka käsit-
tää useita vaiheita niin että jokaisen vaiheen jälkeen
tuloksena on edellistä puhtaampi tekijä.

Tämän puhdistusprosessin ensimmäinen vaihe käsittää
25 eluoimisen geelisuodatinkolonnista, jonka fraktiointias-
teikko ulottuu 0:sta noin 700 daltoniin ja joka kykenee
erottelemaan suolat ultrasuodoksesta tekijän eluoituessa
eluaatiotilavuudessa noin 0,3-0,5 kertaa kromatografia-
alustan koko tilavuus.

30 Toinen vaihe käsittää eluoimisen geelisuodatusko-
lonnista, jonka fraktiointiasteikko ulottuu noin 1500 dal-
tonista noin 30 000 daltoniin tekijän eluoituessa kolon-
nista eluaatiotilavuudessa noin 0,4-0,6-kertaa kromatogra-
fia-alustan koko tilavuus.

Puhdistusprosessin seuraava vaihe käsittää eluoinnin dietyyliaminoetyyliselluloosa-anioninvaihtokolonnista ammoniumbikarbonaatin noin 0,28-0,31 M:n pitoisuudessa.

5 Viimeinen vaihe käsittää tekijän puhdistamisen pääosaltaan homogeeniseksi käänteisfaasi-korkeapainenestekromatografialla.

10 Vaikka SCM-testissä on edullisinta käyttää puhtaimpia tekijävalmisteita, niin mistä tahansa puhdistusvaiheesta otettua tekijää, sisältäen myös ensimmäisen ultra-suodoksen, voidaan käyttää testissä.

15 SCM-tekijä antaa positiivisen vasteen potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevissä lymfosyyteissä, jotka ovat peräisin luovuttajilta, jotka kärsivät monista erilaisista pahanlaatuisista taudeista, riippumatta luovuttajan, josta SCM-tekijä on eristetty, sairastamasta syöpätyypistä; tästä johtuu termin "yleinen" käyttö. Tekijä ei aiheuta ollenkaan tai vain heikon SCM-vasteen lymfosyyteissä, jotka on eristetty luovuttajilta, joilla ei ole pahanlaatuista sairautta. Tämä kyky toimia yleisenä syöpään 20 liittyvänä antigeeninä, tekee tekijästä käyttökelpoisen verinäytteiden seulontavälineen pahanlaatuisten sairauksien osoittamiseksi.

25 Tekijällä on muitakin mielenkiintoisia ominaisuuksia. Yksi niistä on kyky muuttaa SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien, jotka on saatu syöpää sairastamattomilta luovuttajilta, SCM-vastetta, kun tekijä saatetaan sellaisen lymfosyyttien yhteyteen, jolloin lymfosyytit reagoivat SCM-testissä syöpään liittyviin antigeeneihin mutta eivät reagoi mittoosia aiheuttaviin aineisiin kontaktin jälkeen. 30 Toinen ominaisuus on niiden kyky vähentää potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien spontaania in vitro -toksisuutta ihmisen myeloidisolulinjaa K 562 vastaan ainakin 90 %:lla mitattuna ⁵¹Cr:n vapautumisena.

35 Esillä olevan keksinnön toinen puoli kohdistuu menetelmiin, joissa hyödynnetään yleistä syöpään liittyvää

SCM-tekijää SCM-testissä. Yleisimmin tämä menetelmä käsittää nisäkäsluovuttajan lymfosyyttien testaamisen pahanlaatuisen sairauden toteamiseksi luovuttajassa (1) saattamalla lymfosyytit kosketuksiin yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän kanssa; ja (2) määrittämällä lymfosyyttien sytoplasma-aineen rakentuneisuuden lujuuden väheneminen, joka on seurausta lymfosyyttisuspension saattamisesta kosketuksiin SCM-tekijän kanssa.

Edullinen menetelmä rakentuneisuuden lujuuden vähenemisen määrän mittaamiseksi käsittää seuraavat vaiheet: (1) mittaamalla fluoresenssipolarisaatio, P_s , lymfosyyttimäärästä, joka on ollut kosketuksissa yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän kanssa; (2) mittaamalla fluoresenssipolarisaatio, P_c , kontrollilymfosyyttimäärästä, joka ei ole ollut kosketuksissa SCM-tekijän kanssa; ja (3) määrittämällä P_s :n suhde P_c :hen. Jos P_s :n suhde P_c :hen on pienempi kuin noin 0,9, se on osoituksena positiivisesta vasteesta SCM-tekijään ja pahanlaatuisesta sairaudesta lymfosyyttien luovuttajassa.

Vielä edullisempi menetelmä käsittää P_s :n vertaamisen toisen lymfosyyttimäärän, joka on ollut kosketuksissa mitoosia aiheuttavan aineen, P_m , kanssa, fluoresenssipolarisaatioon SCM-vastesuhteen, RR_{scm} , määrittämiseksi, jossa:

$$RR_{scm} = P_s/P_m.$$

Jos RR_{scm} on vähemmän kuin 0,9, se on osoituksena siitä, että lymfosyyttien luovuttajalla on pahanlaatuinen sairaus.

Vaihtoehtoisesti menetelmä SCM-tekijän käyttämiseksi SCM-testissä voi käsittää seuraavat vaiheet: (1) potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien erottamisen verinäytteestä; (2) saattamalla erotetut lymfosyytit kosketuksiin yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän kanssa lymfosyyttien stimuloimiseksi; (3) saattamalla stimuloidut lymfosyytit kosketuksiin fluorogeenisen tekijän prekursorin kanssa, määriteltynä ei-fluorogeeni-

seksi yhdisteeksi, joka voidaan hydrolysoida solunsisäisesti fluorogeeniseksi yhdisteeksi, jotta prekursori tunkeutuisi lymfosyyttien sisään, jotta tapahtuisi solunsisäinen entsyymaattinen hydrolyysi fluorogeenisen yhdisteen
 5 aikaan saamiseksi, tällä tavalla synnyttäen stimuloituja fluoria sisältäviä lymfosyyttejä; (4) virittämällä stimuloitua fluoria sisältävät lymfosyyttejä polarisoidulla valolla saattaen ne tällä tavalla fluorisoimaan; (5) mittaamalla vertikaalisesti ja horisontaalisesti polarisoidut
 10 fluoresenssiemissiöt fluoresoivista lymfosyyteistä polarisaatioarvon määrittämiseksi fluoresoiville lymfosyyteille; ja (6) vertaamalla stimuloitujen fluoria sisältävien lymfosyyttien määritettyä polarisaatioarvoa saman luovuttajan kontrollilymfosyyttimäärän polarisaatioarvoon tällä tavalla osoittaen, onko lymfosyyttien luovuttajassa syöpä.
 15 Vaiheet (3) ja (4) voivat tapahtua samanaikaisesti.

Lymfosyytit voidaan virittää vertikaalisesti polarisoidulla valolla. Polarisaatioarvot käytettäessä vertikaalisesti polarisoitua valoa määritetään fluoresenssispektrofotometrillä seuraavan suhteen mukaan:
 20

$$P = \frac{I_v - GI_H}{I_v + GI_H}$$

25

jossa I_v ja I_H ovat polarisoituja fluoresenssiarvoja vertikaalisessa ja horisontaalisessa tasossa, mainitussa järjestyksessä; ja G on korjauskerroin polarisoidun valon horisontaalisten ja vertikaalisten komponenttien spektrofotometrin optisen systeemin epätasaisen läpäisyn huomioimiseksi.
 30

Lisäksi esillä oleva keksintö käsittää menetelmän syöpäsolujen paikallistamiseksi. Tämä menetelmä käsittää:
 (1) vasta-aineen liittämisen yleiseen syöpään liittyvään
 35 SCM-tunnistustekijään yhdessä paikallistamisaineen kanssa;

ja (2) liitetyn vasta-aineen käytön syöpäsolujen paikallistamiseen.

5 Esillä oleva keksintö käsittää vielä lisäksi menetelmän yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän tason määrittämisen ruumiinnesteessä käyttämällä vasta-ainetta yleiseen syöpään liittyvään tunnistustekijään immunoanalyyysissä. Immunoanalyyysi voi olla radioimmunoanalyyysi, fluoresenssiimmunoanalyyysi, entsyymisitoinen immuno-

10 sorbenttianalyysi tai saostusimmunoanalyyysi kuten nefelometrinen tai turbidimetrinen analyyysi.

Nämä ja muut esillä olevan keksinnön ominaisuudet ja hyötypuolet tulevat paremmin ymmärretyiksi seuraavasta kuvauksesta ja liitteenä olevista patenttivaatimuksista.

Määritelmät

15 Seuraavassa kuvauksessa, esimerkeissä ja liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa toistuvasti käytettyjen termien määritelmät on koottu yhteen mukavuussyistä seuraavassa.

20 "Yleinen": Epäspesifinen joko ruumiinnesteen luovuttajan, josta ruumiinnesteestä esillä olevan keksinnön mukainen SCM-tekijä on puhdistettu, tai lymfosyyttien, joita käytetään yhdessä tämän tekijän kanssa, luovuttajan sairastamaan syöpätyyppiin nähden.

25 "Fluorogeenisen tekijän prekursori": Ei-fluorogeeninen yhdiste, jonka lymfosyytit voivat ottaa sisäänsä ja muuttaa solunsisäisesti hydrolysoimalla fluorogeeniseksi yhdisteeksi, josta esimerkkinä tässä on käytetty fluoreseiinidiasetaattia tai FDA:ta.

30 "Standardi SCM-testi": SCM-testi, johon käytetään 1.0 ml lymfosyyttisuspensiota tiheydellä 6×10^6 solua/ml ja 0.1 ml mitoosia aiheuttavaa ainetta tai antigeeniä yhdessä FDA:n kanssa, joka toimii fluorogeenisen tekijän prekursorina, ja jossa käytetään 470 nm:n viritysaallonpituutta ja 510 nm:n emissioaallonpituutta fluoresenssi-

35 polarisaatiomittauksissa.

"Näennäinen molekyylipaino" ja "Nimellinen molekyylipainoraja": Näiden molempien termien käyttö johtuu siitä, että molekyyliden erottelu ultrasuodatuksella koon mukaan on likimääräistä sellaisille molekyyleille, joiden kokoluokka vastaa SCM-tekijän kokoa ja riippuu sekä muodosta että koosta. Näin ollen ultrasuodatin, jonka nimellinen molekyylipainoraja on x daltonia, erottelee molekyylit, joiden näennäinen molekyylipaino on alle x daltonia, molekyyleistä, joiden näennäinen molekyylipaino on suurempi kuin x daltonia.

"Olennaiselta osaltaan puhdas yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä": Materiaali, jolla on SCM-aktiivisuutta ja jonka puhtaus on sitä luokkaa, että ylivoimainen enemmistö muista molekyyleistä, joilla on spesifistä biologista aktiivisuutta, käsittäen kaikki proteiinit ja suuremmat peptidit, puuttuvat materiaalista.

"Tryptinen peptidi": Peptidi, joka on katkaistu suuremmasta peptidistä proteolyttisellä trypsiinientsymyllä, joka katkaisee peptidiketjut lysiini- tai arginiinitähteiden jälkeen.

Kuvaus edullisista toteutusmuodoista

Tämä keksintö käsittää keksimämme ja pääosaltaan homogeeniseksi puhdistamamme peptidin, joka on yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä. Tekijä läpaisee suodattimet, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia, mutta ei läpäise suodattimia, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 500 daltonia. Tekijän likimääräinen aminohappokoostumus on seuraava: Asx_2 , Glx_3 , Ser, His, Gly_5 , Thr, Arg, Ala_3 , Tyr, Met, Val_3 , Phe₃, Ile, Leu_3 , Lys_2 . Eri tekijävalmisteista on eristetty kaksi aktiivista tryptistä fragmenttia. Nämä fragmentit eivät sisällä alkuperäisen tekijämolekyylin aminopäitä. Näistä ensimmäisessä fragmentissa on viisitoista aminohappoa, jotka käsittävät sekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys. Toisessa fragmentissa on kuusitoista amino-

happoa, jotka käsittävät sekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys.

5 Kuvauksen kohteena ovat tekijän eri ominaisuudet käsittäen tekijän kyvyn muuttaa lymfosyyttien, jotka ovat peräisin pahanlaatuista tautia sairastamattomamilta luovuttajilta, SCM-vastetta ja kyvyn vähentää sellaisten lymfosyyttien in vitro sytotoksisuutta pahanlaatuisia soluja vastaan samoin kuin tekijän, joka on eristetty useita eri syöpätyyppejä sairastavilta luovuttajilta, ristiinreagoimiskyvyn. Kuvauksen kohteena on myös menetelmä tämän tekijän pääpiirteissään homogeeninen puhdistaminen samoin kuin tämän tekijän käyttömenetelmät SCM-testissä. Kuvauksen kohteena ovat myös syöpäpotilaiden hoitomenetelmät vähentämällä tekijän in vivo -aktiivisuutta, menetelmä 15 syöpäsolujen paikallistamiseksi käyttämällä tekijän vastaainetta ja menetelmä anti-syöpäaineiden kohdistamiseksi syöpäsoluihin liittämällä vasta-aine tekijään yhdessä anti-syöpäaineiden kanssa.

SCM-tekijän ominaisuuksia

20 1. SCM-tekijän aminohappoanalyysi

Yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän, joka oli puhdistettu rintasyöpää sairastavien potilaiden plasmasta, määritettiin ja tulokset on esitetty Taulukossa 1. RP-HPLC:lla puhdistetun tekijän lyofilisoidut näytteet 25 hydrolysoitiin 24 tunnin ajan 110 °C:ssa 6 N:ssa HCl:ssa, joka sisälsi 2 % tioglykoli-happoa, umpeen sulatetuissa ampulleissa typpikehässä. Hydrolyysin jälkeen näytteet lyofilisoitiin. Tähteet liuotettiin 2 %:sen natriumdodekyy-lisulfaatin kanssa 0,04 M:seen natriumboraattipuskuriin. 30 Aminohapot määritettiin o-ftaldialdehydijohdannaisina niiden fluoresenssin perusteella niiden HPLC-erottelun jälkeen kuten B. N. Jonesin, S. Paabon ja S. Steinin artikkeleissa "Amino Acid Analysis and Enzymatic Sequence Determination of Peptides by an Improved o-Phthaldialdehyde Precolumn Labeling Procedure", J. Liquid Chromat. 4, 565 35

(1981) ja käsikirjassa "Amino Acid Analysis by HPLC", Al-
tex Division, Beckman Instruments, Inc., Berkley, Califor-
nia 94710, on kuvattu.

5 TAULUKKO 1

SCM-tekijän suhteellinen molaarinen aminohappokoostumus

10	Aminohappo	Suhteellinen molaarinen koostumus
	Asx	2,10
	Glx	3,20
	Ser	1,27
	His	0,65
15	Gly	4,60
	Thr	1,11
	Arg	0,86
	Ala	2,60
	Tyr	0,94
20	Met	1,58
	Val	3,22
	Phe	3,07
	Ile	0,86
	Leu	2,87
25	Lys	1,86

Aminohappokoostumus määritettiin sen jälkeen, kun
kuivattujen peptidien hydrolyysi 6 N:ssa HCl:ssa 2 %:sen
tioglykolihamon kanssa umpeen sulatetuissa lasiampulleissa
tyypikehässä oli tapahtunut. Hydrolyysin jälkeen näytteet
lyofilisoitiin ja tähde liuotettiin 2 %:isella SDS:lla
0.04 M:seen natriumboraattipuskuriin. Aminohapot määritet-
tiin o-ftaalidialdehydijohdannaisina niiden fluoresenssin
perusteella kuten käsikirjassa "Amino Acid Analysis by

HPLC", Altex Division, Beckman Instruments, Inc. Berkeley, CA 94710, on kuvattu. Aminohappoja Cys ja Pro ei määritetty.

5 Taulukon 1 aminohappokoostumus osoittaa, että aktiivinen tekijä on peptidi. Tulokset ovat varsin yhteneväisiä peptidin kanssa, jonka likimääräinen aminohappokoostumus on seuraava: Asx₂, Glx₃, Ser, His, Gly₅, Thr, Arg, Ala₃, Tyr, Met₂, Val₃, Phe₃, Ile, Leu₃, Lys₂.

2. SCM-tekijän aminohapposekvenssi

10 SCM-tekijän kahdesta eri valmisteesta eristetyt aminohapposekvenssit määritettiin automatisoiduilla Edman-hajoitusmenetelmillä käyttämällä Applied Biosystems 477A-proteiinisekvenaattoria, joka oli liitetty on-line -
15 120A PTH-aminohappoanalysaattoriin. Kun koko SCM-tekijä, joka oli eristetty useita eri syöpätyyppejä, kuten rintaja keuhkosyöpää, paksunsuolen, keuhkoputken tai kohdunkaulan syöpää, sairastavista potilaista, hajotettiin Edman-menetelmällä, ei syntynyt minkäänlaista reaktiota ja huomattiin, että SCM-tekijän aminopää oli suljettu. Sen
20 vuoksi molekyylien segmentin sekvenssin määrittämiseksi oli välttämätöntä saada aikaan fragmentti, jolla oli vapaa aminopään aminohappo. Sellaisia fragmentteja saatiin aikaan tekijän erotetuista puhdistetuista valmisteista tryptisen digestion avulla, jota seurasi tryptisten fragmenttien puhdistus käänteisfaasi-korkeapainenestekromatografi-
25 alla kuten tarkemmin on kerrottu jäljempänä "Esimerkit"-osassa. Yksi näistä fragmenteista saatiin keuhkosyöpää sairastavien potilaitten plasmasta saadusta tekijävalmisteesta, toinen rintasyöpää sairastavien potilaitten plasmasta.

30 Jokaisessa tapauksessa kyseinen fragmentti, jolla myöhemmin osoitettiin olevan SCM-aktiivisuutta, eluotui 30,4 tilavuusprosenttisena A-vaiheessa ja 69,6 tilavuusprosenttisena B-vaiheessa kokonaistilavuuden ollessa noin
35 30 µl. Sekventointia varten SCM-aktiivisuutta osoittavat tryptiset fragmentit vietiin sekvenaattorin levyille ja

niille tehtiin tietokoneohjattu automatisoitu sekvenssi-analyysi peräkkäisinä Edman-hajoitusyyskeleinä, joita seurasi tällä tavoin tuotettujen PTH-aminohappojen identifiointi mukaan liitettyssä on-line -PTH-aminohappoanalysaattorissa.

Sekvenaattorin sekvenssin tunnistava tietokoneohjelma identifioi kuudentoista aminohapon sekvenssin SCM-tekijän, joka oli eristetty keuhkosityöpötilaiden plasmas-
ta, fragmentin sekvenssin. Sekvenssi oli seuraavanlainen:
10 Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys. Samalla tavalla tietokoneohjelma identifioi viid-
dentoista aminohapon sekvenssin tekijän fragmentille, joka oli eristetty rintasyöpötilaiden plasmasta. Sek-
venssi oli seuraavanlainen: Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-
15 Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys.

Ensimmäiset kolmetoista aminohappoa näissä kahdessa tryptisessä fragmentissa ovat identtiset. Vaikka niiden karboksyyli-pää-
t ovat erilaiset, jos yksi puuttuva amino-
happo, Phe, insertoidaan lyhyempään fragmenttiin, ainoa
20 ero sen jälkeen on Ser:n substituutio Thr:lla, joka on hyvin konservatiivinen substituutio, joka tuskin vaikuttaa peptidin toimintaan.

3. SCM-tekijän aktiivisuus SCM-testissä

Puhdistettu SCM-tekijä on täysin aktiivinen SCM-
25 testissä, kun sitä käytetään lymfosyyttien, jotka on eris-
tetty useita eri pahanlaatuista tauteja sairastavista po-
tilaista, vastaisena tekijänä. Tämä aktiivisuus voidaan osoittaa analyysillä missä tahansa tekijän puhdistusvai-
heessa. Tällaisten analyysien tulokset on kuvattu yksi-
30 tyiskohtaisemmin jäljempänä "Esimerkit" -osassa. Suurin aktiivisuus saavutetaan materiaalilla, joka on otettu vii-
meisen puhdistusvaiheen, käänteisfaasi-korkeapaineneste-
kromatografian, jälkeen. Yksi kymmenesosamillilitra tätä
fraktiota, jonka likimääräinen proteiinisisältö on 40 pi-
35 komoolia peptidiä, aiheuttaa solunsisäisessä fluoresenssi-

polarisaatiossa jopa 44,6 %:n laskun, kun sitä käytetään SCM-vasteeseen kykeneviä lymfosyyttejä vastaan, jotka lymfosyytit on kerätty syöpäpotilailta, mutta ei aiheuta laskua solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatiossa, kun sitä
5 käytetään samojen lymfosyyttien alapopulaatiota vastaan, joka on kerätty terveiltä luovuttajilta.

4. Tryptisten peptidien aktiivisuus SCM-testissä

Sekä viidentoista aminohapon tryptinen peptidifragmentti, joka on katkaistu rintasyöpäpotilaiden (rintafragmentti)
10 fragmentti) plasmasta eristetystä SCM-tekijästä että kuudentoista aminohapon tryptiset peptidifragmentit, jotka on katkaistu keuhkosyöpäpotilaiden (keuhkofragmentti) plasmasta eristetystä SCM-tekijästä, ovat täysin aktiivisia SCM-testissä. Noin 5×10^{-2} femtogrammaa keuhkofragmenttia
15 (toisin sanoen 5×10^{-17} grammaa tai noin 16 000 molekyyliä) oli täysin aktiivista SCM-testissä, kun sitä käytettiin lymfosyyttejä vastaan, jotka oli saatu syöpää sairastavilta luovuttajilta. Keuhkofragmentti reagoi samalla tavalla keuhkosyöpää sairastavien luovuttajien lymfosyytteihin
20 kuin rintasyöpää sairastavienkin, mutta ei antanut vastetta SCM-testissä, kun sitä käytettiin normaaliluovuttajilta saatuja lymfosyyttejä vastaan. Yksityiskohtaisempi kuvaus on annettu jäljempänä "Esimerkit" -osassa.

Koska sekä keuhko- että rintafragmentti ovat molemmat yhtä aktiivisia SCM-testissä ja jakavat vain sekvenssinsä ensimmäiset kolmetoista aminohappoa, uskotaan, että
25 tämä yhteinen kolmentoista aminohapon sekvenssi on SCM-aktiivisuuden kannalta tärkein sekvenssi. Näin ollen vain näiden kolmentoista aminohapon sekvenssin, joka tässä on nimetty "yttimeksi", Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn, uskotaan myös omaavan SCM-aktiivisuutta.
30 Tämä ei ole ainoa kolmentoista aminohapon sekvenssi, jonka uskotaan omaavan SCM-aktiivisuutta. Proteiini- ja peptidikemiassa hyvin tunnettu periaate on, että tiettyjä aminohapposubstituutioita, joita kutsutaan "konservatiivisik-
35

si" aminohapposubstituutioiksi, voidaan usein tehdä peptidissä ilman, että sen paremmin peptidin muoto kuin sen toimintakaan muuttuu. Tällaiset ydinsekvenssissä oleviin aminohappoihin vaikuttavat muutokset käsittävät Ile:n ja Leu:n korvaamisen Val:lla ja päinvastoin, Asp:n korvaamisen Glu:lla ja päinvastoin ja Asn:n korvaamisen Gln:lla ja päin vastoin. Näin ollen uskotaan, että muutetut peptidimolekyylit, joiden ydinrakenne on sellainen, että joku tai kaikki edellä kuvatut konservatiiviset aminohapposubstituutiot on tehty, omaavat SCM-aktiivisuutta ja sen mukaisesti katsotaan osaksi tässä kuvattua keksintöä.

Keuhko- ja rintafragmentit on molemmat eristetty osana laajempaa yleistä syöpään liittyvää SCM-tunnistustekijää. Ilmeisesti sellaiset fragmentit voivat säilyttää SCM-aktiivisuutensa, kun ne liitetään laajempaan molekyyliin. Sen vuoksi laajemman molekyylin, joka sisältää kolmentoista aminohapon sekvenssin, joka joko sisältää tai ei sisällä edellä kuvattuja konservatiivisia aminohapposubstituutioita, uskotaan myös omaavan SCM-aktiivisuutta.

Näiden kahden ydinsekvenssin muunnelman esiintyminen tuo keksintöön mukanaan tärkeän lisänäkökohdan. Tämä on SCM-aktiivisuutta osoittava tekijä, joka käsittää vain tarkkaan määrätyn sekvenssin peptidit, joilla on joko suoraan osoitettu olevan SCM-aktiivisuutta tai niillä uskotaan sitä olevan. Laajimmin ilmaistuna sellainen tekijä käsittää olennaiselta osaltaan vain peptidit, joihin kuuluu ainakin kolmetoista aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇, jossa R₁ on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Asn:n ja Gln:n, R₂, R₃ ja R₄ ovat jokainen erikseen valikoitu ryhmästä, joka käsittää Val:n, Leu:n ja Ile:n, R₅ on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Asp:n ja Glu:n ja R₆ ja R₇ ovat molemmat erikseen valikoitu ryhmästä, joka käsittää Asn:n ja Gln:n. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

Kun koko sekvenssi-informaatio keuhko- ja rinta-
 fragmenteista käytetään, lopputuloksena on kaksi erillistä
 ja rinnakkaista SCM-tekijäluokkaa, jotka kummatkin sisäl-
 tävät ydinsekvenssin tai sekvenssin, joka on johdettu
 5 ydinsekvenssistä konservatiivisin substituutioin. Näillä
 kummallakin pidemmällä peptidillä on lisämahdollisuus kon-
 servatiivisiin aminohapposubstituutioihin, nimittäin Ser:n
 korvaamiseen Thr:lla ja päinvastoin. Näiden kahden amino-
 hapon samantarvoisuutta osoittaa se, että keuhkofragmentis-
 10 sa on Ser kun taas rintafragmentissa on Thr. Näiden kahden
 aminohapon paikat vastaavassa fragmentissa voidaan rinnas-
 taa poistamalla Phe keuhkofragmentin kohdasta 14.

Näiden tekijöiden ensimmäinen luokka on johdettu
 rintafragmentin sekvenssistä Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-
 15 Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys. Laajimmin ilmaistuna tämä
 luokka käsittää olennaisena osana vain peptidit, joissa on
 ainakin viisitoista aminohappotähdettä sisältäen sekvens-
 sin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇-R₈-Lys, jossa
 R₁-R₇ on edellä määritelty ja R₈ on valikoitu ryhmästä, joka
 20 käsittää Ser:n ja Thr:n. Mieluiten tämä tekijä sisältää
 olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

Tässä luokassa tarkemmin määritelty tekijä käsittää
 olennaisena osanaan vain peptidit, jotka sisältävät sek-
 venssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-
 25 Asn-Thr-Lys. Tämä on rintafragmentin alkuperäinen sek-
 venssi. Nämä peptidit voivat sisältää lisäksi reunasek-
 venssejä spesifioidun sekvenssin kummallakin sivulla ja
 nämä reunasekvenssit voivat olla pituudeltaan määrittele-
 mättömiä. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osa-
 30 naan vain yhden peptidin.

Tämän luokan tarkimmin määritelty tekijä käsittää
 olennaisena osanaan puhtaan peptidin, joka pääosaltaan
 käsittää aminohapposekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-
 Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys. Tämä on rintafragmentin
 35 tarkka sekvenssi ilman reunasekvenssejä.

Näiden tekijöiden toinen luokka on johdettu keuhkofragmentin sekvenssistä Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys. Laajimmin ilmaistuna tämä luokka käsittää olennaisena osanaan vain peptidit, joissa on ainakin kuusitoista aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇-Phe-R₈-Lys. Tässä sekvenssissä R₁-R₇ on määritelty edellä ne heijastavat mahdollisia aminohapposubstituutioita ydinsekvenssissä, kun taas R₈ on valikoitu ryhmästä, joka käsittää Ser:n ja Thr:n. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin.

Tässä luokassa tarkemmin määritelty tekijä käsittää olennaisena osanaan vain peptidit, jotka sisältävät sekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Thr-Lys. Tämä on alkuperäinen keuhkofragmentin sekvenssi. Nämä peptidit voivat sisältää lisäksi reunasekvenssejä spesifioidun sekvenssin jommalla kummalla sivulla ja nämä reunasekvenssit voivat olla pituudeltaan määrittelmättömiä. Mieluiten tämä tekijä sisältää olennaisena osanaan vain yhden peptidin. Tämän luokan tarkimmin määritetty tekijä käsittää pääosiltaan puhtaan peptidin, joka käsittää olennaisena osanaan aminohapposekvenssin Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Thr-Lys. Tämä on keuhkofragmentin tarkka sekvenssi ilman reunasekvenssejä.

Kaikkien näiden fragmenttien oletetaan omaavan SCM-aktiivisuutta ja kuuluvat esillä olevan keksinnön piiriin.

5. SCM-tekijän ristiinreagoivuus

Tekijä on nimetty yleiseksi syöpään liittyväksi SCM-tekijäksi, koska kaikkia syöpätyyppejä sairastavilta luovuttajilta eristetyt lymfosyytit antavat tekijävasteen SCM-testissä. Lymfosyyttien luovuttajan sairastaman syöpätyypin ei tarvitse olla sama kuin ruumiinnesteen, josta SCM-tekijä on puhdistettu, luovuttajan sairastama syöpätyyppi. Kuten jäljempänä mainitaan tekijän puhdistaminen

yhdeksäätoista eri syöpätyyppiä sairastavilta potilailta
saadusta veriplasmasta johtaa aina tekijään, joka eluoituu
samassa kohdassa käänteisfaasi-korkeapainenestekromato-
grafiassa, viitaten voimakkaasti siihen, että sama tai
5 hyvin samanlainen molekyyli eristettiin kaikista näistä
potilaista. Itse asiassa tryptisen fragmentin aminohap-
posekvenointi SCM-tekijöistä, jotka on eristetty keuhko-ja
rintasyöpää sairastavien potilaiden veriplasmasta osoit-
taa, että fragmenttien kolmetoista ensimmäistä aminohappoa
10 ovat samanlaiset. Näiden kahden sekvenssin ainoa ero on
fenylalaniinitähteen deletio keuhkofragmentin kohdassa 14
ja treoniinin konservatiivinen substituuutio seriinillä
seuraavassa kohdassa. SCM-tekijän ristiinreagoivuuden yk-
sityiskohtainen kuvaus seuraa jäljempänä "Esimerkit" -
15 osassa.

6. SCM-vasteen muuttaminen yleisellä syöpään liit-
tyvällä SCM-tekijällä

Yleisellä syöpään liittyvällä SCM-tekijällä on kyky
muuttaa potentiaalisesti SCM-vastetta omaavia lymfosyyt-
20 tejä, jotka on saatu luovuttajilta, joilla ei ole pahan-
laatuista sairautta, kun nämä lymfosyytit saatetaan kos-
ketuksiin tekijän kanssa. Ennen kontaktia lymfosyytit rea-
goivat vain mittoosia aiheuttaville aineille SCM-testissä
eivätkä reagoi syöpää aiheuttaviin antigeeneihin. Kuiten-
25 kin pitkään kestäneen SCM-tekijän ja tällaisten lymfosyyt-
tien välisen kontaktin jälkeen lymfosyyttien vaste SCM-
testissä muuttuu lymfosyyttien normaalista vasteesta, kun
lymfosyytit ovat peräisin pahanlaatuista sairautta sairas-
tamattomilta luovuttajilta verrattuna syöpää sairas-
30 tavilta luovuttajilta peräisin olevien lymfosyyttien vas-
teeseen. Lymfosyyttien, jotka ovat peräisin pahanlaatuista
tautia sairastamattomilta luovuttajilta, SCM-vasteen muu-
tos on kuvattu yksityiskohtaisemmin jäljempänä "Esimer-
kit"-osassa.

7. Yleisen syöpään liittyvän SCM-tekijän vaikutus lymfosyyttien luonnolliseen sytotoksisuuteen

SCM-tekijällä on kyky huomattavasti vähentää potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien spontaania luonnollista in vitro -sytotoksisuutta. Tämän ominaisuuden perusteella uskotaan, että yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän molekyylit liittyvät syöpäsolujen puolustautumiseen tappajalymfosyyttejä vastaan ja tällä tavalla edesauttavat syöpäsolujen elossa pysymistä ja rajoittamatonta kasvua. Immuunisysteemin normaalin toiminnan tärkeys syöpäsolujen kasvun kontrolloimisessa näkyy epätavallisten syövän muotojen tiheänä esiintymisenä potilaissa, jotka ovat immuunisuppressiohoidossa. Tärkeänä esimerkkinä tästä on Kaposin sarkooman, joka tavallisesti on melko hitaasti leviävä syöpä, aggressiivisten muotojen esiintyminen potilaissa, jotka kärsivät hankitusta immuunikato-syndroomasta (AIDS).

SCM-tekijän puhdistaminen

Ensimmäinen vaihe SCM-tekijän puhdistuksessa on syöpää sairastavan luovuttajan ruumiinnesteestä suodatetun ultrasuodoksen valmistaminen. Ruumiinneste voi olla ääreisverta, veri-plasmaa tai virtsaa; jos neste on ääreisverta, veri täytyy sentrifugoida punaisten verisolujen erottamiseksi plasmasta. Ruumiinnesteen, jota on käytetty SCM-tekijän eristämiseen, luovuttaja voi olla joko autologinen tai allogeeninen suhteessa SCM-testissä käytettäviin lymfosyytteihin.

Ultrasuodatusprosessissa erotetaan ensimmäinen ruumiinnestefraktio, joka käsittää molekyylit, joiden näennäinen molekyylipaino on yli 1000 daltonia toisesta fraktiosta, joka käsittää molekyylit, joiden näennäinen molekyylipaino on alle 1000 daltonia. Esillä olevan keksinnön mukainen yleinen syöpään liittyvä SCM-tekijä löytyy toisesta ultrasuodoksen fraktiosta. Termejä "näennäinen molekyylipaino" ja "nimellinen molekyylipainoraja" käytetään

tässä, koska ultrasuodatus on jossain määrin epätarkka menetelmä erottamaan molekyyilejä, joiden molekyylipaino on tätä kokoluokkaa, ja tarkka molekyylipaino, jonka nimelliseltä molekyylipainorajaltaan 1000 daltonin suodatin suodattaa riippuu jossain määrin molekyylin muodosta. Molekyylit, jotka todelliselta molekyylipainoltaan ovat yli 1000 daltonia, itse asiassa voivat läpäistä suodattimen, jonka nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia, jos molekyylit esimerkiksi ovat suhteellisen pitkiä ja kapeita.

Edullisessa toteutusmuodossa toisen fraktion erottaminen ensimmäisestä fraktiosta tapahtuu suodattamalla ruumiinneste ultrasuodattimen läpi, jonka nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia.

Tällaisen tekijävalmisteen puhtautta ultrasuodatusvaiheessa tai myöhemmin voidaan kuvata sen spesifisellä aktiivisuudella. Tässä yhteydessä termi "spesifinen aktiivisuus" määritellään vastaavana proteiinimääränä, joka tarvitaan aiheuttamaan tietynasteinen, kuten 20 %:nen, lasku solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatioarvossa, kun kyseistä fraktiota käytetään SCM-vasteeseen kykeneviin lymfosyytteihin SCM-testissä. SCM-tekijän puhdistamisella pyritään lisäämään SCM-tekijän spesifistä aktiivisuutta verrattuna raa'an ultrasuodoksen spesifiseen aktiivisuuteen. Puhdistusprosessia voi sen vuoksi seurata puhdistettujen fraktioiden spesifisen aktiivisuuden määrittäminen. Koska proteiinipitoisuudet tässä kuvatuissa esimerkeissä on määritetty vain likiarvoina ultraviolettiabsorbanssina määritettynä, mieluiten 220 nm:ssä, ja tekijän annos-vasteikäyrää ei vielä ole määritetty, tässä kuvatun SCM-tekijän puhdistuksen eri vaiheiden karakterisoiminen spesifisenä aktiivisuutena on vain likimääräinen. Kuitenkin on selvää, että proteiinipitoisuus laskee merkittävästi tekijän siirtyessä eri puhdistusvaiheiden läpi samalla kun aktiivisuus säilyy suhteellisen muuttumattomana tällä ta-

valla päätyen SCM-tekijän spesifisen aktiivisuuden lisääntymiseen. Siitä huolimatta ultrasuodoksen voidaan hyvin kuvata käsittävän olennaiselta osaltaan puhtaan yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän samalla tavalla
5 kuin ultrasuodatus nimelliseltä molekyylipainorajaltaan 1000 daltonin membraanin läpi voi poistaa biologisesta nesteestä ylivoimaisesti suurimman osan spesifisen biologisen aktiivisuuden omaavista molekyyleistä käsittäen kaikki suuremmat peptidit.

10 Seuraava yleisen syöpään liittyvän SCM-tekijän puhdistusvaihe on suolojen poisto, jossa ultrasuodatuksella saatu toinen fraktio viedään kromatografikolonnein, joka pystyy erottamaan siitä suolat. Kolonnein viety materiaali eluoidaan sen jälkeen kolonnista tislattulla vedellä ja se
15 osa, joka eluoituu eluointitilavuudeltaan noin 0,3-0,5 kertaa koko kromatografia-alustan tilavuus sisältäen SCM-tekijän, kerätään talteen. Edullisessa toteutusmuodossa tässä vaiheessa käytetty kolonni on geelisuodatuskolonni, jonka fraktiointiasteikko ulottuu 0:sta noin 700 daltoniin, kuten Sephadex_(tm) G-10.

Toinen puhdistusvaihe käsittää toisen suodatuksen, jossa erottelu myös tapahtuu koon mukaan. SCM:ia sisältävä materiaali, joka on saatu suolanpoistovaiheesta, toiseen geelisuodatuskolonnein, jonka fraktiointiasteikko ulottuu
25 noin 1500 daltonista noin 30 000 daltoniin, kuten Sephadex_(tm) G-50. Kolonnein viety materiaali eluoidaan sen jälkeen siitä laimealla ammoniumsuolan vesiliuoksella. Edullisessa toteutusmuodossa ammoniumsuola on ammoniumbikarbonaatti, vielä edullisemmin 50 mM:nen ammoniumbikarbonaatti. Se osa, joka eluoituu eluointitilavuudessa, joka
30 on noin 0,4-0,6 kertaa koko kromatografia-alustan tilavuus, sisältää SCM-tekijän ja se kerätään.

Seuraava puhdistusvaihe on anioninvaihtokromatografia, joka erottelee varauksen mukaan. SCM-tekijän sisältävä materiaali edellisestä geelisuodatusvaiheesta viedään
35

- anioninvaihtokolonniin, mieluiten dietyyliaminoetyylisel-
luloosaan (DEAE-selluloosa). Kolonniin viety materiaali
eluoidaan kolonnista suurentuvilla ammoniumsuolapitoisuuksilla. Mieluiten tämä ammoniumsuola on ammoniumbikarbo-
5 naatti ja suureneva ammoniumsuolapitoisuus ulottuu 10
mM:sta 1,0 M:iin ammoniumbikarbonaattia. Fraktio, joka
eluoituu kolonnista noin 0,28 M:n - 0,31 M:n ammoniumbi-
karbonaattipitoisuudessa, sisältää SCM-tekijän ja se kerä-
tään.
- 10 Viimeinen puhdistusvaihe käsittää käänteisfaasi-
korkeapainenestekromatografian (RP-HPLC), joka erottelee
varauksen ja/tai hydrofobisuuden mukaan. Tyypillisesti
SCM-tekijän sisältävä materiaali DEAE-selluloosakolonne-
eluaatista viedään Aquapore RP-300 RP-HPLC-kolonniin, jon-
15 ka koko on 220 mm x 2,1 mm. Eluaatio suoritetaan sitten
kahden liuottimen seoksella niin, että ensin seos sisältää
90 tilavuusprosenttia 0,1-tilavuusprosenttista trifluoro-
etikkahapon (TFA) vesiliuosta ja 10 tilavuusprosenttia
0,09-tilavuusprosenttista TFA:ssa 70-prosenttisessa aseto-
20 nitriilin vesiliuoksessa, mitä seuraa gradientti, joka
sisältää asetonitriiliä sisältävän seoksen nousevana pi-
toisuutena. SCM-tekijä kaikista lähtömateriaaleista elu-
oituu homogeenisena piikkinä liuotinseoksella, joka sisäl-
tää 26 tilavuusprosenttia 0,1-tilavuusprosenttista trif-
25 luoroetikkahapon vesiliuosta ja 74 tilavuusprosenttia 0,09
tilavuusprosenttista trifluoroetikkahapon vesiliuosta 70
%:ssa asetonitriilissä.
- Vaihtoehtoisesti RP-HPLC voidaan suorittaa Beckman
Ultrasphere ODS_(tm) -käänteisfaasi-korkeapainenestekromato-
30 grafiakolonnissa. Tässä kolonnissa eluaatio suoritetaan
jossain määrin erilaisella liuosyhdistelmällä niin, että
aluksi seos sisältää 70 tilavuusprosenttia 0,1 tilavuus-
prosenttista trifluoroetikkahapon vesiliuosta ja 30 tila-
vuusprosenttia 0,1 tilavuusprosenttista trifluoroetikka-
35 hapon vesiliuosta 70 %:isessa asetonitriilin vesiliuokses-

sa, mitä seuraa gradientti, joka käsittää nousevan asetonitriililiuotinpitoisuuden. SCM-tekijä eluoituu aina homogeenisenä piikkinä liuotinpitoisuudessa, joka käsittää 43,7 tilavuusprosenttia 0,1 %:ista trifluoroetikkahapon vesiliuosta ja 56,3 tilavuusprosenttia 0,1 %:ista trifluoroetikkahapon nesteliuosta 70 %:isessa asetonitriilin vesiliuoksessa, kun käytetään tätä liuotinsysteemiä ja tätä liuotinta.

SCM-tekijän käyttö

10 1. Käyttö SCM-testissä

SCM-tekijän aktiivisuus varmistetaan tutkimalla sen vaikutusta elinvoimaisiin potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykeneviin lymfosyytteihin yleisen testimenetelmän mukaan, joka on kuvattu L. Cercekin ja B. Cercekin julkaisussa "Application of the Phenomenon of Changes in the Structuredness of Cytoplasmic Matrix (SCM) in the Diagnosis of Malignant Disorders: a Review", Europ. J. Cancer 13, 903-915 (1977). Esillä olevan keksinnön mukainen SCM-tunnistustekijä tuottaa merkittävän laskun syöpää sairastavien luovuttajien potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatioarvossa kun sitä käytetään tällaisiin lymfosyytteihin SCM-testissä, joka toteutetaan kuten tuossa artikkelissa on kuvattu. Tällaisten lymfosyyttien solunsisäisen fluoresenssipolarisaatioarvon lasku on varmasti ainakin 20 % jopa jos ultrasuodosta käytetään lymfosyytteihin, ja yli 50 %, jos puhtainta HPLC-fraktiota käytetään.

a. SCM-testin suoritusmenetelmät

Kaksi aikaisemmin käyttöön otettua menetelmää ovat 30 tärkeitä tässä kuvatun SCM-testin onnistuneen suorituksen kannalta. Nämä menetelmät käsittävät potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien eristämisen ja itse fluoresenssipolarisaatioarvojen mittaamismenetelmän ja niiden muuttamisen SCM-testin kannalta mielekkäiksi numeroiksi. 35 Nämä menetelmät kuvataan jäljempänä.

(1) Potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfositien eristäminen

Potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfositien eristäminen on kuvattu edellä mainitussa katsausjulkaisussa European Journal of Cancer ja myös aikaisemmassa B. Cercekin & L. Cercekin patenttihakemuksessa 838 264, sarjanumero 838 264, joka on jätetty 10. maaliskuuta 1986 ja jonka nimi on "Automated Collection of Buoyant Density Specific Cells from Density Gradients", ja on liitetty tähän viittauksena. Näiden lymfositien erottaminen yleisestä lymfositipopulaatiosta on tärkeätä SCM-testin onnellisen suorittamisen kannalta, koska vain suhteellisen pieni osa lymfosyyteistä, noin 20-25 prosenttia, kykenee reagoimaan SCM-testissä. Sen vuoksi, jos tämä testi toteutetaan fraktioimattomilla lymfosyyteillä, lopputuloksena on paljon vähäisempi havaittu väheneminen solunsisäisessä polarisaatioarvossa vaikka SCM-testissä itse asiassa vasteeseen kykenevät lymfositit reagoisivatkin täydellisesti.

Potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfositien eristämiseksi luovuttajalta otetaan ääreisverinäyte ja se otetaan talteen heparinisoituun putkeen. Talteen oton jälkeen ääreisverta käsitellään rautajauheella tai karbonyyli-rautajauheella ja putket, jotka sisältävät veri-rautajauheseosta asetetaan magneetille fagosyyttisten solujen erottamiseksi raudan mukana verinäytteestä. Osa verinäytteestä siirretään sitten Ficoll_(tm)-Triosil_(tm)-tiheysgradienttiliuokseen ja sentrifugoidaan potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfositien erottamiseksi tiheyserojen perusteella. Tässä erotusmenetelmässä käytetään tiheysgradienttiliuosta, jonka tiheys on 1,081 g/cm³ 25 °C:ssa ja osmolaliteetti 0,320 Osm/kg. Verinäyte sentrifugoidaan 550 x g 20 min. 25 °C:ssa. Potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfositit kerätään Pasteur-pipetillä solukerroksen poistamiseksi, joka on erottunut tiheys-

gradienttimateriaalin päälle. Keräämisessä täytyy noudattaa äärimmäistä varovaisuutta tiheysgradienttimateriaalin keräämisen välttämiseksi, koska tämä materiaali sisältää erilaisia painavampia plasma- ja solukomponentteja, jotka häiritsevät testituloksia. Kevyemmän plasmamateriaalin poistamista pitää myös välttää niin paljon kuin mahdollista kaikkien kontaminanttien tai ei-SCM-vasteeseen kykenevien solujen testinäytteisiin mukaan tulon estämiseksi.

Erottamisen jälkeen potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit pestään useita kertoja, ensiksi 0,9 %:ssa säilöntäaineita sisältämättömässä natriumkloridiliuoksessa, sitten täydellisessä Dulbeccon fosfaatilla puskuroidussa saliinissa (PBS) ja pidetään 37 °C:ssa seuraavaksi suoritettavaa SCM-testiä varten.

(2) SCM-arvojen mittaaminen

SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien fluoresenssipolarisaatioarvojen mittaamismenetelmä on kuvattu edellä mainitussa katsausartikkelissa julkaisussa European Journal of Cancer samoin kuin aikaisemmassa B. Cercekin & L. Cercekin patentthakemuksessa, sarjanumero 867 079, joka on jätetty 27. toukokuuta 1986 ja jonka nimi on "Method for Measuring Polarized Fluorescence Emissions", joka on tähän liitetty viittauksena. Kuten näissä viitteissä on mainittu testikohteen verestä aikaisemmin erotettuja lymfosyyttejä inkuboidaan steriilissä lasiputkessa 37 °C:ssa, jossa on tunnettu pitoisuus joko mitoosia aiheuttavaa ainetta kuten fytohemagglutiinia tai syöpään liittyvää antigeeniä kuten yleistä syöpään liittyvää SCM-tunnistustekijää, joka on esillä olevan keksinnön kohde. Muitakin mitoosia aiheuttavia aineita kuin fytohemagglutiinia (PHA) kuten konkanavaliini A:ta ja kermesmarjanitogeenia on käytetty, mutta PHA on edullisin SCM-testiin. Tämä inkubaatio aloitetaan lisäämällä 0,1 ml sopivasti laimennettua mitoosia aiheuttavaa ainetta tai antigeeniä 1 ml:aan solususpensiota, jonka tiheys on 6×10^6 solua/ml. Inkubaation

annetaan sitten jatkua 30-60 min.

Inkuboidut lymfosyytit sekoitetaan sen jälkeen suspensioon yhdessä sopivan ei-fluorogeenisen yhdisteen kanssa, joka voidaan hydrolysoida solunsisäisesti fluorogeeniseksi yhdisteeksi, jota tämän jälkeen kutsutaan fluorogeenisen tekijän prekursoriksi, esimerkkinä fluoreseiinidiasetaatti (FDA). Fluoreseiinidiasetaattia käytetään loppupitoisuutena 2,5 mM täydellisessä PBS:ssa pH:ssa 7 ja osmolaliteetissa 0,330 Osm/kg ja se laimennetaan väkevöidystä varastoliuoksesta, joka on valmistettu asetoniin tai jääetikkahappoon. 0,2 ml:n määrät kontrollilymfosyyttisuspensiota tai stimuloitua lymfosyyttisuspensiota injektoidaan hitaasti ruiskulla dekantteriin, joka sisältää 3 ml FDA-substraattiliuosta.

FDA:n annetaan vaikuttaa soluihin riittävä aika (noin 5 minuuttia), jotta FDA-substraattiliuos ehtii tunkeutua sisälle lymfosyytteihin. Solujen sisällä ei-fluorogeeniset fluoreseiinidiasetaattimolekyylit muutetaan fluoreseiinimolekyyleiksi entsyymaattisella hydrolyysillä.

Fluoria sisältävät lymfosyytit ovat isotrooppisia reaktiossaan polarisoituun valoon, koska fluoresenssiemission polarisaatio suhteessa soluihin tulevaan valoon ei riipu lymfosyytteihin kohdistetun tasopolarisoidun valon suuntautumisesta. Kuitenkin näihin mittauksiin käytetty tavanomainen fluoresenssipolarisaatiota mittaava laite käyttää vertikaalisesti polarisoitua valoa lymfosyytteihin ja näin ollen mittausprosessi kuvataan vertikaalisesti polarisoituna valona.

Kun fluoreseiinimolekyyleihin kohdistetaan viritysenenergiaa vertikaalisesti polarisoidun valon muodossa, ne fluorisoivat. Vertikaalisesti ja horisontaalisesti polarisoidun emission suhde määritetään. Tämä voidaan tehdä mittaamalla polarisoitu fluoresenssivoimakkuus sekä vertikaalisessa että horisontaalisessa tasossa ja määrittämällä polarisaatioarvo (P-arvo) seuraavan suhteen mukaan:

$$P = \frac{I_v - GI_H}{I_v + GI_H}$$

5

jossa I_v ja I_H ovat polarisoituja fluoresenssiarvoja vertikaalisessa ja horisontaalisessa tasossa, mainitussa järjestyksessä, ja G on korjauskerroin polarisoidun valon horisontaalisten ja vertikaalisten komponenttien kyseessä olevan laitteen optisen järjestelmän epätasaisen läpäisyn huomioimiseksi. G -arvo on määritetty jakamalla horisontaalisesti polarisoidun valon voimakkuus vertikaalisesti polarisoidun valon voimakkuudella, joka on emittoitunut PBS:iin valmistetusta 10^{-7} M:sesta fluoreseiiniliuoksesta, joka on viritetty horisontaalisesti polarisoidulla valolla, jonka aallonpituus on sama kuin on käytetty SCM-mittauksiin. Tässä kuvatuissa mittauksissa $G = 0,42$.

Stimuloitujen lymfosyyttien, jotka tarkoittavat lymfosyyttejä, jotka on altistettu esillä olevan keksinnön mukaiselle yleiselle SCM:iin liittyvälle syövän tunnistustekijälle, P -arvoa verrataan samalta luovuttajalta peräisin olevien stimuloimattomien lymfosyyttien kontrollisuspension P -arvoon, ja stimuloitujen lymfosyyttien P -arvon lasku prosentteina verrattuna kontrollilymfosyyttien P -arvoon indikoi SCM-vastetta syöpäantigeenille.

Vaikka SCM-vaste voidaankin havaita samoillakin viritys- ja emissioaallonpituuksilla kun FDA:ia käytetään fluorogeenisenä tekijänä, selvästi edullisempaa on kuitenkin käyttää 470 nm:n viritysaallonpituutta ja 510 nm:n emissioaallonpituutta. Kaikki tässä mainitut tulokset on saatu käyttämällä näitä aallonpituuksia. Kuitenkin hyviä tuloksia on saatu käyttämällä stimulointiaallonpituutena 442 nm ja emissioaallonpituutena 527 nm.

Sprektofotometrin, jota käytetään SCM-fluoresenssimittauksiin, pitäisi olla hyvin herkkä ja stabiili ja

sen pitäisi kompensoida viritysväliintensiteetin vaihte-
luita, koska polarisoidun fluoresenssiemission voimakkuus
mitataan ajan funktiona ja koska fluoreseiniin kokonais-
määrä SCM-mittauksissa on vain 10^{-8} - 10^{-9} M:n luokkaa. Myös-
5 kään leveitä nauhasuodatininstrumentteja ei voida käyttää
SCM-mittauksiin, koska SCM-vasteet voidaan havaita vain
kapealla aallonpituusalueella. Viritysmönokromaattorin
spektriurteen suurimman leveyden pitäisi olla 20 nm ja
emissiomonokromaattorin spektriurteen suurimman leveyden
10 pitäisi olla 10 nm, kun stimulaatiomonokromaattori on ase-
tettu 470 nm:iin ja emissiomonokromaattori 510 nm:iin.
Spektrofotometrin pitäisi myös olla liitettynä termostaat-
tisesti säädeltävään kyvettipidikkeeseen, koska polarisoidut
fluoresenssiemissioidot ovat hyvin lämpötilaherkkiä. Spekt-
15 rofotometrin pitäisi myös olla varustettu fluoresenssiemi-
ssioiden sekä horisontaalisten että vertikaalisten pola-
risoitujen komponenttien mittaussäilytysvälineillä.

Jäljempänä esitetyissä esimerkeissä me käytimme
Perkin-Elmer MPF-4-spektrofotometriä, joka oli varustettu
20 termostaattisesti kontrolloidulla kyvettipidikkeellä.
Kaikki mittaukset tehtiin 27 °C:ssa. Valolähde oli ksenon-
lamppu.

Fluoresenssipolarisaatiota mitattaessa vertikaali-
sen virittävän valonsäteen kanssa samansuuntaiset ja sitä
25 vastaan kohtisuorassa olevat emissiovoimakkuudet määrite-
tään vuorotellen automaattisella polarisaationmuuttajalla
noin 6 minuutin ajan tai kunnes vertikaalisen viritysvä-
lonsäteen kanssa kohtisuorassa oleva emissiovoimakkuus
saavuttaa 80-90 % tason laitteen koko asteikon taittumas-
30 ta.

Näiden mittaustulosten korjaaminen on välttämätöntä
kaikesta mahdollisesta fluoreseiniin solusta ulos vuota-
misesta ja substraatin sisältämästä taustafluorisoinnista
johtuvien virheiden eliminoimiseksi. Tämän korjauksen suo-
35 rittamiseksi solut suodatetaan pois liuoksesta nitrosellu-

loosasuodattimella, jonka huokoskoko on $0,22\ \mu\text{m}$ ja joka on asetettu sopivaan suodatinalustaan. Käyttämällä samaa fluoresenssipolarisaation mittausrakennetta saadaan määritettyä viritysvälillä nähden samansuuntaiset ja kohtisuorassa olevat fluoresenssivoimakkuudet. Korjatut fluoresenssivoimakkuusarvot soluille saadaan sitten vähentämällä suodoksesta saadut arvot koko fluoresenssivoimakkuudesta ekstrapoloituna puolitetuun suodatusaikaan. Tämä ekstrapolointi on välttämätöntä, koska taustasäteily nousee inkuboinnin aikana johtuen fluoresenssin vuotamisesta ulos soluista ja FDA:n spontaanista hydrolyysistä.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää taustafluoresenssin kompensointimenetelmää, joka on kuvattu aikaisemmassa Cercekin patenttihakemuksessa, sarjanumero 867 079, joka on jätetty 27 toukokuuta 1986 ja jonka nimi on "Method for Measuring Polarized Fluorescence Emissions" ja joka on liitetty tähän viitteenä. Lyhyesti sanottuna tässä menetelmässä eliminoidaan tarve suodattaa jokainen näyte mittaamalla horisontaalisesti ja vertikaalisesti polarisoitu fluoresenssiemissio useammalla kuin yhdellä aallonpituudella ja laskemalla siitä solunsisäinen fluoresenssiemissio.

SCM-testiin, joka suoritetaan edellä kuvatun menetelmän mukaisesti ja jossa käytetään $1,0\ \text{ml}$ tiheydeltään 6×10^6 solua/ml olevaa lymfosyyttisuspensiota ja $0,1\ \text{ml}$ mittoosia aiheuttavaa ainetta tai antigeeniä yhdessä FDA:n kanssa, joka on fluorogeenisen tekijän prekursori, ja $470\ \text{nm}$:n viritysaallonpituutta ja $510\ \text{nm}$:n emissioaallonpituutta, viitataan tässä "standardi SCM-testinä".

b. Yleisen syöpään liittyvän SCM-tekijän käyttö vaikuttavana tekijänä SCM-testissä

Yleistä syöpään liittyvää SCM-tekijää, jonka puhdistaminen on edellä kuvattu, voidaan käyttää vaikuttavana tekijänä SCM-testissä syövän havaitsemiseen. Näin ollen solut, jotka on saatu luovuttajilta, jotka eivät sairasta

syöpää, eivät anna merkittävää SCM-vastetta, kun niitä stimuloidaan syöpäantigeeneillä, joita käytetään vaikuttavina tekijöinä SCM-testissä, kun taas solut, jotka ovat peräisin syöpää sairastavilta luovuttajilta, aiheuttavat merkittävän muutoksen SCM-vasteeseen. Tämä muutos näkyy P-arvon laskuna, kun syöpää sairastavilta luovuttajilta peräisin olevia soluja stimuloidaan syöpään liittyvillä antigeeneillä. Kuten on kuvattu SCM-tekijä on epäspesifinen suhteessa havaittuun syöpätyyppiin; lymfosyyttien, joita on stimuloitu SCM-tekijällä SCM-testissä, ei tarvitse olla peräisin luovuttajalta, jolla on samanlainen syöpätyyppi kuin ruumiinnesteen, josta SCM-tekijä on peräisin, luovuttajalla.

Käytettäessä SCM-tekijää vaikuttavana tekijänä SCM-testissä se aiheuttaa ainakin kymmenen prosentin laskun ja jopa 44,6 %:n laskun P-arvossa. Jos P_s on P-arvo stimuloitujen lymfosyyttien määrälle ja P_c on P-arvo lymfosyyteille, joita ei ole stimuloitu SCM-tekijällä, P_s :n ja P_c :n suhteen ollessa pienempi kuin noin 0,9 osoittaa se stimuloitujen lymfosyyttien luovuttajalla olevan pahanlaatuisen sairauden.

Eduellinen SCM-tekijän käyttömenetelmä vaikuttavana aineena SCM-testissä käsittää P_s :n vertaamisen toisen mittoosia aiheuttavan aineen kanssa kosketuksissa olleiden lymfosyyttien määrän fluoresenssipolarisaatioarvoon, P_m , SCM-vastesuhteen RR_{scm} määrittämiseksi, jossa:

$$RR_{scm} = P_s / P_m.$$

Jos RR_{scm} -arvo on pienempi kuin 0.9, indikoi se lymfosyyttien luovuttajalla olevan pahanlaatuisen sairauden.

3. Muita SCM-tekijän vasta-aineiden käyttömuotoja

SCM-tekijää vastaan tuotettujen vasta-aineiden lisäksi käyttömuoto syövän hoidossa on vasta-aineen liittämisen aineeseen, joka on anti-syöpäaktiivinen anti-syöpäaktiivisen aineen johtamiseksi syöpäkohtaan ja sillä tavalla nostaa anti-syöpäaineen tehoavaa pitoisuustasoa syövän

esiintymiskohdassa. Tämä menetelmä on erityisen käyttökelpoinen, kun käytetään anti-syöpäainetta, joka aiheuttaa sivuvaikutuksia, kun sitä annetaan suurina annoksina.

5 Anti-SCM-vasta-ainetta voidaan myös käyttää SCM-tekijän pitoisuuksien määrittämiseen ääreisveressä tai muissa ruumiinnesteissä eri tekniikoilla kuten radioimmunanalyysillä, fluoresenssi-immunanalyysillä tai entsyymisitoisella immunosorbenttianalyysillä tai sakkautumis-analyysitekniikoilla kuten nefelometrisesti tai turbidimetrisesti sillä oletuksella, että SCM-tekijä ei ole yksiarvoinen antigeeni. Olettaen että SCM-tekijä on jollakin tavalla fysikaalisesti liittynyt kasvainsoluihin paikallistamisaineilla kuten fluorisoivilla väreillä tai radioaktiivisilla isotoopeilla voidaan myös paikallistaa solut
10 niin että ne voidaan havaita biopsioissa. Fluorisoivalla värillä leimattua vasta-ainetta voidaan myös käyttää syöpäsolujen automatisoituun osoittamiseen virtaussytometriassa.

Esimerkit

20 Seuraavat esimerkit kuvaavat SCM-tekijää, sen eristystä ja puhdistusta ja käyttömenetelmää. Kuitenkin seuraavien esimerkkien tarkoitus ei ole rajoittaa keksintöä vaan ainoastaan kuvata sitä.

Esimerkki 1

25 Yleisen syöpään liittyvän SCM-tekijän alkupuhdistus Potilailta, joilla oli diagnosoitu aktiivisessa vaiheessa oleva syöpä kuten rinta- tai keuhkosyöpä, paksusuolen syöpä, munasarjansyöpä, kohdunkaulan syöpä, kohdusyöpä, kurkunpään syöpä tai ihosyöpä (tyvisolusyöpä ja
30 pahanlaatuinen melanooma), kerättiin verinäytteet heparinisoituihin astioihin kuten Vacutainer_(tm)-putkiin. Kahdenkymmenen millilitran erät verinäytteistä sentrifugoitiin noin 1200 x g noin 40 minuutin ajan. Pohjalle laskeutuneiden solujen päällä oleva plasma kerättiin ja suodatettiin
35 paineella molekyylipainorajaltaan 1000 daltonin huokoisen

kalvosuodattimen läpi kuten Amicon_(tm) UM2- tai YM2-suodattimen läpi. Nämä ultrasuodokset lyofilisoitiin tai säilytettiin 4 °C:ssa seuraavaan puhdistusvaiheeseen.

Esimerkki 2

5 Yhden kerran puhdistetun SCM-tekijän testit

Ultrasuodoseriä jokaisesta Esimerkin 1 näytteestä inkuboitiin potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien kanssa, jotka oli saatu samoilta luovuttajilta ja lymfosyyttien kyky SCM-vasteeseen edellä kuvatun
10 SCM-testimenetelmän mukaisesti tarkistettiin. Jokaisessa tapauksessa ultrasuodos aiheutti SCM-vasteeseen kykenevis-
sä lymfosyyteissä tyypillisen vasteen, joka käsitti P-arvon laskun samalla tavalla kuin siinä tapauksessa että ne
15 olisivat olleet kosketuksissa itse syöpäkudoksen tai syöpäkudosuutteiden kanssa (Taulukko 2).

TAULUKKO 2

Esimerkin 1 ultrasuodoston SCM-aktiivisuus

20

25

30

Lymfosyyttien luovuttajan diagnoosi	SCM-tekijöiden luovuttajan diagnoosi	SCM-vaste: P-arvo %:eina kontrollista
Pahanlaatuinen melanooma	Pahanlaatuinen melanooma	75,7
Pahanlaatuinen melanooma	Tyvisolusyöpä - ihossa	82,0
Kurkunpääsyöpä	Kurkunpääsyöpä	62,9
Rintasyöpä	Rintasyöpä	76,0

Taulukon 2 tulokset osoittavat, että jopa raa'assa ultrasuodoksessa SCM-tekijä aiheutti ainakin yhtä suuren

laskun syöpää sairastavilta luovuttajilta peräisin olevis-
sa SCM-vasteeseen kykenevissä lymfosyyteissä kuin ne P-
arvojen laskut, joita mitataan, kun lymfosyyttejä stimu-
loidaan syöpäkasvaimen raakauutteilla tai itse syöpäkudok-
5 sella. P-arvon lasku ultrasuodosstimulaatiossa oli ainakin
10 %, joka on tällaisessa tapauksessa tyypillinen positiiv-
vinen SCM-vaste. Kuitenkaan, SCM-tekijä ei läpäissyt ni-
melliseltä molekyylipainorajaltaan 500 daltonin Amicon_(tm)-
UMO5-suodatinta. Tällaiset tulokset vahvistavat käsitystä
10 tekijän pienestä koosta kuitenkin niin, että aktiivinen
tekijä on suurempi kuin pieni molekyyli kuten yksittäinen
aminohappo.

Esimerkki 3

SCM-tekijän jatkopuhdistus

15 Lyofilisoitu jauhe Esimerkin 1 näytteistä liuotet-
tiin 2 ml:aan steriiliä säilöntäaineita sisältämätöntä
vettä injektointia varten. Tässä vaiheessa valmisteiden
SCM-aktiivisuus varmistettiin, ja aktiiviset näytteet luov-
vuttajilta, joilla oli samantyyppinen ja samassa paikassa
20 sijaitseva syöpä, yhdistettiin. Yhdistetyistä näytteistä
poistettiin suola 0,9 x 18 cm:n Sephadex_(tm) G-10 -kolonnis-
sa, jonka fraktiointiasteikko ulottuu 0:sta 700 daltoniin.
Näytteen tilavuus kolonnin kromatografia-ajoa kohti ei
ylittänyt 25 % kolonnin tilavuudesta. Eluointiin käytet-
tiin kahdesti tislattua vettä lineaarisella eluutionopeu-
della 8-9 cm/h. Suolojen poisto suoritettiin huoneenläm-
mössä (21-23 °C). Yhden ml:n fraktiot, jotka eluoituivat
vaiheessa, jossa 0,3-0,5 kertaa kromatografia-alustan ko-
konaistilavuudesta oli ajettu, kerättiin ja fraktioiden
30 optiset tiheydet määritettiin. SCM-aktiivisuuden havait-
tiin olevan ensimmäisessä eluutiopiikissä. SCM-aktiivisuu-
den sisältyminen tähän piikkiin varmistettiin SCM-testil-
lä. Ensimmäisen eluutiopiikin määräerä, joka oli valmis-
tettu ultrasuodoksesta, joka oli alunperin saatu rinta-
35 syöpää sairastavan potilaan plasmasta, laski rintasyöpää

sairastavan potilaan lymfosyyttien P-arvoa 86,3 % kontrolliarvosta SCM-testissä osoittaen SCM-aktiivisuuden olemassaolon. Nämä fraktiot kerättiin talteen ja lyofilisoitiin.

Eluaatti puhdistettiin edelleen fraktioimalla Sephadex_(tm) G-50 -geelisuodatuskolonnissa, jonka fraktiointiasteikko ulottuu 1500-30 000 daltoniin. Lyofilisoidut suolattomat näytteet liuotettiin 50 mM:seen NH_4HCO_3 :iin, vietiin 0,9 x 18 cm:n Sephadex G-50 -kolonni, jonka lineaarinen eluutionopeus oli 3 cm/h alle 5 %:n määränä kolonnin tilavuudesta. Eluutio suoritettiin huoneenlämmössä ja yhden millilitran fraktiot, jotka eluoituivat kolonnista vaiheessa, jossa 0,4-0,6 kertaa kromatografia-alustan kokonaistilavuus oli eluoitunut, kerättiin talteen. Näiden fraktioiden SCM-aktiivisuus määritettiin. Tämän testin tulokset on esitetty Esimerkissä 4 jäljempänä. SCM-aktiiviset fraktiot saatiin ensimmäisestä eluutiopiikistä määritettynä yhden millilitran fraktioiden optisina tiheyksinä sen jälkeen, kun fraktiot oli testattu SCM-testillä.

Sen jälkeen kun fraktiot oli testattu SCM-aktiivisuuden suhteen, aktiiviset fraktiot samasta syöpätyypistä yhdistettiin ja lyofilisoitiin.

Lyofilisoitujen näytteiden edelleen puhdistamiseksi ne liuotettiin 10 mM:seen NH_4HCO_3 :iin ja vietiin 0,8 x 26 cm:n Whatman DE-52 mikrorae-DEAE-selluloosakolonnein alle 4 %:n määränä kolonnin tilavuudesta. Kolonni pestiin 10 ml:lla 10 mM:sta NH_4HCO_3 -vesiliuosta lisäämällä NH_4HCO_3 :a 0,108 % minuutissa 10 mM:sta 1 M:iin. Yhden millilitran fraktiot kerättiin talteen ja optinen absorptio 220 nm:ssä määritettiin jokaista fraktiota kohti. Optisen absorbanssin perusteella aktiiviset fraktiot, jotka eluoituivat kolonnista vaiheessa, jossa 4,5-4,7 kertaa kromatografia-alustan kokonaistilavuus oli eluoitunut, yhdistettiin ja lyofilisoitiin testausta ja lisäpuhdistusta varten. Aktiivisten fraktioiden SCM-testaustulokset on esitetty esimerkissä 4.

Esimerkki 4

Edelleen puhdistettujen valmisteiden testit

Taulukossa 3 esitetään tulokset, kun esimerkin 3 Sephadex G-50 -fraktioiden määräeriä, jotka olivat alun-
5 perin peräisin luovuttajilta, joilla oli erityyppisiä syöpämuotoja, käytettiin SCM-testissä stimuloimaan lymfosyyttejä, jotka oli saatu luovuttajilta, joilla myös oli erityyppisiä syöpämuotoja. Voidaan havaita, että potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit antavat saman
10 tyypillisen vasteen G-50-fraktioille kuin ne antoivat aikaisemmin kuvatuille syöpään liittyville antigeeneille. Tämän suolattoman osittain puhdistetun proteiinimateriaalin vaste on yleisesti ottaen suurentuva verrattuna raakaan ultrasuodokseen, jota koskevat tulokset on esitetty
15 taulukossa 2. Tämä suurentunut SCM-vaste näkyy alentuneina P-arvoina.

TAULUKKO 3

Esimerkin 3 sephadex G-50-fraktioiden SCM-aktiivisuus

5

10

15

20

Lymfosyyttien luovuttajan diagnoosi	SCM-tekijän luovuttajan diagnoosi	SCM-vaste: P-arvo %:eina kontrollista
Keuhkosyöpä	Rintasyöpä	73,0
Keuhkosyöpä	Kohdunkaulansyöpä	69,6
Keuhkosyöpä	Keuhkoputkensyöpä	73,6
Kurkunpääsyöpä	Keuhkoputkensyöpä	77,6
Rintasyöpä	Keuhkoputkensyöpä	80,2
Paksunsuolensyöpä	Rintasyöpä	63,5
Kurkunpäänsyöpä	Rintasyöpä	63,0
Pahanlaatuinen melanooma	Pahanlaatuinen melanooma	74,9
Terve luovuttaja	Pahanlaatuinen melanooma	99,3
Terve luovuttaja	Paksunsuolensyöpä	98,0
Paksunsuolen syöpä	Paksunsuolensyöpä	98,9

25

30

Taulukosta 4 näkyvät tulokset, jotka saatiin, kun käytettiin SCM-testissä SCM-tekijää sellaisilta luovuttajilta, joilla oli erityyppisiä pahanlaatuisia sairauksia, sen jälkeen, kun se oli puhdistettu DEAE-selluloosan läpi, lymfosyyttien stimuloimiseen, jotka oli saatu erityyppisiä pahanlaatuisia sairauksia sairastavilta luovuttajilta tai syöpää sairastamattomilta luovuttajilta. Kuten oli odotettavissa syöpäpotilaiden lymfosyytit antoivat vasteen SCM-tekijöille, jotka oli puhdistettu DEAE-selluloosakolonneissa, huomattavana P-arvon laskuna, kun taas pahanlaatuista sairautta sairastamattomilta luovuttajilta saaduilla lymfosyyteillä ei sellaista P-arvon laskua esiintynyt.

TAULUKKO 4

Esimerkin 3 DEAE-selluloosafraktioiden SCM-aktiivisuus

5	Lymfosyyttien luovuttajan diagnoosi	SCM-tekijän luovuttajan diagnoosi	SCM-vaste: P-arvo %:eina kontrollista
	Rintasyöpä	Rintasyöpä	69,2
	Rintasyöpä	Keuhkoputkensyöpä	69,5
	Rintasyöpä	Kohdunkaulansyöpä	69,0
10	Tyvisolusyöpä-ihossa	Tyvisolusyöpä-ihossa	82,0
	Terve luovuttaja	Paksunsuolensyöpä	98,6
	Sappirakon tulehdus	Pahanlaatuinen melanooma	100,0
	Virtsaputkentulehdus	Kohdunkaulansyöpä	99,8
15	Umpilisäkkeen tulehdus	Paksunsuolensyöpä	98,0
	Hyvälaatuinen rinnan kasvu	Rintasyöpä	97,8
20	Hyvänlaatuinen aivo-lisäkkeenkasvain	Aivosyöpä	100,00

Esimerkki 5

SCM-tekijän viimeinen puhdistusvaihe RP-HPLC:lla

Esimerkin 4 yleiset syöpään liittyvät DE-52-SCM-aktiiviset fraktiot saatettiin uudestaan käyttövalmiiksi ja puhdistettiin homogeenisiksi käänteisfaasi-korkeapainestekromatografisesti (RP-HPLC) käyttämällä 2,1 x 22 cm:n HPLC-kolonnia. Kolonni pakattiin Aquapore 300_(tm):llä (7 mikronia). RP-HPLC-puhdistusvaiheessa käytetyt liikkuvat faasit olivat seuraavat:

30 Faasi A: 0,1 tilavuusprosenttia trifluoroetikkahapon (TFA) vesiliuosta

Faasi B: 0,09 tilavuusprosenttia TFA:n vesiliuosta 70 %:isessa asetonitriilin vesiliuoksessa
Lyofilisoidut DE-52-SCM-aktiiviset fraktiot saatettiin

uudestaan käyttövalmiiksi steriilillä vedellä injektointia varten (ilman säilöntäaineita) ja 250 µl:n määrät injektointiin RP-HPLC-kolonneihin. Liikkuvan faasin virtausnopeus oli 50 mikrolitraa minuutissa ja sen seosprofiili oli seuraava: 10 minuuttia 90 tilavuusprosenttia Faasia A, 10 tilavuusprosenttia Faasia B, jota seurasi 30 minuutin ajan Faasin B lineaarinen lisäys tasolla 3 tilavuusprosenttia minuutissa. 220 nm:n optisessa absorbanssissa havaitut optiset tiheyspiikit kerättiin käsin "nanobore"-teflonputkiston kautta 1,5 ml:n muovisiin kartiomaisiin Eppendorfsentrifuugiputkiin ja liuotin haihdutettiin tyhjiösentrifuugissa. Kaikissa tapauksissa yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä eluoitui kolonnista vaiheessa, jossa Faasia B oli eluoitunut 74 tilavuusprosenttia.

15 Esimerkki 6

SCM-tekijän vaihtoehtoinen RP-HPLC-puhdistus

Vaihtoehtoisesti SCM-tekijä voidaan puhdistaa HPLC:lla käyttämällä 4,6 mm x 25 cm:n HPLC-kolonnia, joka on pakattu Ultrasphere ODS_(tm):llä (5 mikronia), jota Beckman Instruments, Inc. toimittaa, yhdessä Esimerkin 4 DEAE-52-SCM-fraktioiden kanssa. Tässä kolonnissa käytetyt liikkuvat faasit ovat seuraavat:

Faasi A: 0,1 tilavuusprosenttia trifluoroetikkahapon (TFA) vesiliuosta

25 Faasi B: 0,1 tilavuusprosenttia TFA:ia 70 %:isessa asetonitriilin vesiliuoksessa

Tämän kolonnin kohdalla käytettiin samaa menettelytapaa kuin Aquapore-kolonninkin kohdalla paitsi että liikkuvan faasin virtausnopeus oli 1,00 ml minuutissa ja seosprofiili 5 minuuttia 70 tilavuusprosenttia Faasia A ja 30 tilavuusprosenttia Faasia B, mitä seurasi, 20 minuutin Faasin B lineaarinen lisääminen tasolla 3,5 tilavuusprosenttia minuutissa. Optiset tiheyspiikit määritettiin 22 nm:ssä ja ne kerättiin käsin silikonoihuihin lasisiin koeputkiin ja liuotin haihdutettiin tyhjiösentrifuugissa. Kun tätä HPLC-

systeemiä käytettiin, kaikissa tapauksissa yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän yhdeksästätoista erilaisesta syöpätyypistä, käsittäen kohdunkaulan suolusolun syövän, rinnan adenokarsinooman, keuhkoputken adenokarsinooman ja pahanlaatuisen melanooman, puhdistamisen tuloksena oli yksi ainoa optisen tiheyden aktiivisuuspiikki, joka eluotui vaiheessa, jossa 56,3 tilavuusprosenttia Faasia B oli eluoitunut.

Esimerkki 7

Esimerkin 6 puhdistettujen RP-HPLC-valmisteiden testit

Esimerkissä 6 RP-HPLC:lla Ultrasphere-kolonnissa eristettyjen peptidien SCM-aktiivisuuden testaamista varten peptidit saatettiin uudestaan käyttövalmiiksi steriilillä vedellä ilman säilöntäaineita suoritettavaa injektointia varten. SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien SCM-aktiivisuus näytteiden kanssa inkuboinnin jälkeen on esitetty taulukossa 5. Tämä fraktio aiheuttaa suurimman laskun polarisaatioarvossa, kun sitä käytetään lymfosyyttien, jotka ovat peräisin syöpää sairastavilta luovuttajilta, stimuloimiseen. Kaksi kolmesta SCM-tekijävalmisteesta aiheutti yli 40 %:n laskun polarisaatioarvossa, joka on suurempi lasku kuin millään muulla testatulla fraktiolla. Puhdistettu tekijä oli, kuten osattiin odottaa, epäspesifinen suhteessa käytettyjen lymfosyyttien luovuttajan syöpätyyppiin. Samoin kuin osattiin odottaa puhdistettu tekijä ei antanut vastetta, kun stimulointiin käytettiin terveiden luovuttajien lymfosyyttejä.

TAULUKKO 5

Esimerkin 6 RP-HPLC-fraktioiden SCM-aktiivisuus

5	Lymfosyyttien luovuttajan diagnoosi	SCM-tekijän luovuttajan diagnoosi	SCM-vaste: P-arvo %:eina kontrollista
	Rintasyöpä	Rintasyöpä	58,9
	Rintasyöpä	Keuhkasyöpä	57,3
10	Paksunsuolensyöpä	Rintasyöpä	55,4
	Rintasyöpä	Keuhkoputkensyöpä	68,0
	Terve luovuttaja	Rintasyöpä	99,8
	Terve luovuttaja	Keuhkasyöpä	101,0

15 Esimerkki 8
 SCM-aktiivisten tryptisten peptidien identifikaatio
 ja eristäminen SCM-tekijästä

 Esimerkin 5 puhdistetusta SCM-tekijästä eristettiin
 kuudentoista aminohapon pituinen tryptinen fragmentti.
 20 Tämän fragmentin osoitettiin omaavan laajemman peptidin
 täyden aktiivisuuden ja se sekvenoitettiin automaattisella
 Edman-hajoitusmenetelmällä. Puhdistetun SCM-tekijän kat-
 kaisu trypsiinillä ja aktiivisen fragmentin puhdistaminen
 suoritettiin seuraavan menetelmän mukaisesti:

25 Peptidin adsorbtiomenetyksen estämiseksi lyofili-
 soinnin aikana SCM-tekijä pilkottiin trypsiinillä HPLC-
 eluenttien läsnäollessa. Trypsiinidigestio suoritettiin
 0,1 M:ssa Tris-HCl-puskurissa, pH:ssa 8,3 37 °C:ssa 24
 tuntia käyttäen 10 painoprosenttia trypsiiniä. Pilkottu
 30 osa laimennettiin nelinkertaiseksi 0,1 tilavuusprosentti-
 sella trifluoroetikkahapon vesiliuoksella ja injektointiin
 Applied Biosystems 130A mikrovirtauserotussysteemiin.

Tryptiset fragmentit erotettiin käyttämällä Aquapore RP-300-kolonnia (200 mm x 2,1 mm). Fragmenttien eluomiseen käytetyt liikkuvan faasin liuottimet olivat:

5 Faasi A: 0,1 tilavuusprosenttia trifluoroetikkahappoa (TFA)

Faasi B: 0,09 tilavuusprosenttia TFA:oa 70 %:ssa asetonitriilin vesiliuoksessa

Liikkuvan faasin virtausnopeus oli 50 µl minuutissa ja seosprofiili käsitti 10 minuuttia 96 tilavuusprosenttia
10 Faasia A, 4 tilavuusprosenttia Faasia B, mitä seurasi lineaarinen eluaatiogradientti, joka käsitti 30 minuutin lineaarisen nousun Faasissa B tasolla 3 tilavuusprosenttia minuutissa. SCM-aktiivinen tryptinen fragmentti eluoitui vaiheessa, jossa 69,9 tilavuusprosenttia Faasista B oli
15 eluoitunut ja vaiheessa, jossa 30,4 tilavuusprosenttia Faasista A oli eluoitunut 30 mikrolitran kokonaistilavuutena.

Esimerkki 9

20 SCM-tekijän käyttö stimuloivana tekijänä SCM-testissä

Taulukossa 6 on koottuna tulokset, jotka on saatu käyttämällä yleisiä syöpään liittyviä SCM-tunnistustekijävalmisteita stimuloivana tekijänä SCM-testissä eri puhdistusvaiheista esimerkeistä 1, 3 ja 6. Kun lymfosyyttejä,
25 jotka on saatu useita erilaisia pahanlaatuisia tauteja sairastavilta luovuttajilta, käytettiin yhdessä esillä olevan keksinnön mukaisen tekijän kanssa SCM-testissä, kaikissa tapauksissa havaittiin merkittävä vaste. Tämä vaste näkyy taulukossa 6 kontrollipolarisaatioarvosta,
30 joka on saatu käyttämällä samojen lymfosyyttien, joita ei oltu inkuboitu tekijän kanssa, SCM-mittausta. Mitä pienempi arvo sitä voimakkaampi vaste tekijää kohtaan SCM-testissä. Jopa testatun tekijän raa'in valmiste, ultrasuodos, aiheutti laskun polarisaatioarvossa 18,0 %:ista 37,1 %:iin
35 ja kaikista puhtain fraktio, joka oli puhdistettu RP-

HPLC:lla, aiheutti jopa 44,6 %:n laskun polarisaatioarvossa. Tämän keksinnön mukainen tekijä on spesifinen ja aiheuttaa laskun polarisaatioarvossa vain, kun käytetään syöpää sairastavilta luovuttajilta saatuja lymfosyyttejä.

5 Ei edes RP-HPLC:lla puhdistettu fraktio aiheuttanut laskua polarisaatioarvossa, kun sitä käytettiin stimuloimaan terveiden luovuttajien lymfosyyttejä.

TAULUKKO 6

10 **Esimerkkejä SCM-aktiivisuudesta eri puhdistusvaiheissa**
(Esimerkki 9)

Puhdistusvaihe	P-arvon laskun prosentti- rajat, kun on käytetty syöpäpotilaiden lymfosyyt- tejä
15 Plasman ultrasuodos (1000 Daltonin painoraja)	18,0 - 37, 1
Sephadex G-50-fraktio	19,8 - 37,0
DE-52-selluloosafraktio	18,0 - 31,0
20 RP-HPLC-fraktio	32,0 - 44,6

Yksikään fraktio ei osoittautunut aktiiviseksi testattaessa terveiden luovuttajien lymfosyyttejä vastaan tai ei-pahanlaatuista tautia sairastavien luovuttajien lymfosyyttejä vastaan.

Esimerkki 10

25 Esimerkin 8 SCM-aktiivisen tryptisen peptidin käyttö

30 Tryptinen peptidi, jonka puhdistus kuvattiin edellä esimerkissä 8, on aktiivinen standardi SCM-testissä. Noin

5 x 10⁻² femtogrammaa tätä fragmenttia (toisin sanoen 5 x 10⁻¹⁷ grammaa tai noin 16 000 molekyyliä fragmenttia) oli täysin aktiivinen testissä. Kun fragmentti eristettiin keuhkosyöpää sairastavilta potilailta, se osoittautui aktiiviseksi SCM-testissä, kun sitä testattiin lymfosyyttejä vastaan, jotka oli eristetty potilailta, joilla oli pienisolukeuhkosyöpä ja se ristiinreagoi täysin lymfosyyttien kanssa, jotka olivat peräisin potilaalta, jolla oli rinnan rauhaskudossyöpä, kuten taulukosta 7 näkyy. Kuitenkaan mitään vastetta ei huomattu, kun käytettiin terveiden luovuttajien lymfosyyttejä.

TAULUKKO 7

Esimerkin 8 tryptisen fragmentin SCM-aktiivisuus keuhkosyövästä

Lymfosyyttien luovuttajan diagnoosi	SCM-vaste: P-arvo prosentteina kontrollista	
Pienisolukeuhkosyöpä	7,0;	68,0
Rintarauhassyöpä	67,5;	68,0
Terveet luovuttajat	102,0;	104,0

Esimerkki 11

SCM-tekijän ristiinreagoivuus

Seuraava esimerkki kuvaa SCM-tekijän kykyä aiheuttaa vaste SCM-testissä, kun stimuloimiseen käytetään lymfosyyttejä, jotka ovat peräisin luovuttajilta, jotka sairastavat erityyppisiä syövän muotoja. Tämän ristiireagoivuuden osoittamiseksi joukosta syöpäpotilailta saatuja verinäytteitä otettiin kaksi millilitraa soluvapaata veriplasmaa. Verinäytteet oli alunperin kerätty heparinisoi-tuihin Vacutainer_(tm)-putkiin. Näytteet ultrasuodatettiin

Amicon UM2- tai YM2-suodattimien läpi, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia, ainakin 12 tuntia ja säilytettiin steriileissä olosuhteissa 4 °C:ssa. Potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit eristettiin heparinisoiduista verinäytteistä potilailta, joilla oli syöpä, terveiltä luovuttajilta ja ei-pahanlaatuisia tautoja sairastavilta luovuttajilta. Yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän sisältämien ultrasuodosten aktiivisuuden ja syöpäspesifisyyden testaamiseksi inkuboitiin 0,75 ml:n määräeriä potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykeneviä lymfosyyttejä (5×10^6 solua/ml PBS:ssa) inkuboitiin 40 minuutin ajan 37 °C:ssa yhdessä ultrasuodosten kanssa. Jokaiseen analyysiin käytettiin 0,075 ml ultrasuodosta. SCM-testit suoritettiin kuten aikaisemmin on kuvattu L. Cercekin ja B. Cercekin artikkelissa "Application of the Phenomenon of Changes in the Structuredness of Cytoplasmic Matrix (SCM) in the Diagnosis of Malignant Disorders: a Review", Europ. J. Cancer 13, 903-915 (1977) ja aikaisemmassa B. Cercekin ja L. Cercekin patenttihakemuksessa, sarjanumero 867 079, joka on jätetty 27. toukokuuta 1986 ja otsikoitu "Method for Measuring Polarized Fluorescence Emissions". SCM-analyysissä solunsisäisen fluoresenssipolarisaation arvon (P-arvo) ainakin 10 %:n laskua pidettiin stimuloivan ultrasuodoksen positiivisena vasteena.

TAULUKKO 8

Esimerkin 1 ultraosuodosten SCM-aktiivisuuden riistiinreagoisuus

Ultrasuodoksen luovuttajan diagnoosi	Lymfosyytin luovuttajaan reagoivat tapaukset/tutkitut tapaukset diagnoosin ollessa:											
	Suu- syöpä	Kurkun- pääsyö-	Kohdun- kaulan-	Muna- sarjan-	Keuhko- syöpä	Aivo- syöpä	Rinta- syöpä	Paksun- syöpä	Ei-syö- päsai-	Terveet veet	veet	luo-
	pä	syöpä	syöpä	syöpä	5/5	3/3	3/3	2/2	0/3	0/3	0/3	0/3
Keuhkosyöpä	-	2/2	3/3	-	5/5	3/3	3/3	2/2	0/3	0/3	0/3	0/3
Keuhkoputken syöpä	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	-	2/2	1/1	-	0/2	0/2	0/2
Rintasyyöpä	1/1	1/1	3/3	2/2	2/2	-	3/3	1/1	0/3	0/2	0/2	0/2
Munasarjansyöpä	1/1	2/2	2/2	3/3	2/2	-	2/2	-	0/4	0/2	0/2	0/2
Kohdunkaulansyöpä	1/1	1/1	5/5	1/1	2/2	-	2/2	2/2	0/3	0/3	0/3	0/3
Paksusuolensyöpä	2/2	-	3/3	-	2/2	-	2/2	1/1	0/2	0/2	0/2	0/2
Suusyöpä	2/2	-	1/1	-	1/1	-	1/1	1/1	-	0/2	0/2	0/2
Kurkunpääsyöpä	1/1	6/6	3/3	-	2/2	-	2/2	1/1	0/2	-	-	-
Pahanl. melanooma	-	-	-	-	-	-	1/1	1/1	-	0/2	0/2	0/2
Hermon tukisolukasvain	-	-	2/2	-	-	2/2	2/2	1/1	0/2	0/2	0/2	0/2
Umpilisäkkeentulehdus	-	-	-	-	0/1	-	0/1	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2
Virtsarakontulehdus	-	-	0/2	-	0/2	-	0/1	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3
Tulehtunut paise	-	0/1	0/1	-	-	-	0/1	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2
Paksusuolentulehdus	-	-	0/1	-	-	-	0/1	0/3	0/2	0/2	0/2	0/2
Hyvänlaatuisen aivo- lisäkkeen kasvain	-	-	-	-	0/2	0/2	0/2	-	0/1	0/1	0/1	0/1
Terveet luovuttajat	-	-	0/2	0/1	0/3	-	0/3	0/1	0/4	0/6	0/6	0/6

Kuten Taulukon 8 tulokset osoittavat yleiset syöpään liittyvät SCM-tunnistustekijät, jotka olivat peräisin yhdeksästä eri syöpätyypistä, aiheuttivat vasteen potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevillä lymfosyyteillä, jotka oli saatu potilailta, jotka edustivat kahdeksaa erilaista syöpätyyppiä. Vastakohtana terveiltä luovuttajilta ja muita kuin syöpäsairauksia sairastavilta luovuttajilta saadut plasman ultrasuodokset eivät antaneet mitään positiivisia SCM-vasteita. Myöskään terveiltä luovuttajilta ja muita kuin syöpäsairauksia sairastavilta luovuttajilta saadut potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit eivät reagoineet mihinkään ultrasuodokseen SCM-testissä.

Esimerkki 12

SCM-vasteen muuttaminen SCM-tekijällä

Hyvänlaatuisten lymfosyyttien SCM-vasteen muuttamisen osoittamiseksi inkuboimalla SCM-tekijän kanssa potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit eristettiin terveiden luovuttajien verinäytteistä ja suspendoitiin täydelliseen Dulbeccon fosfaattipuskurisaliiniin (PBS) tiheydellä 5×10^5 solua/ml kuten edellä mainitussa European Journal of Cancerin artikkelissa on kuvattu samoin kuin aikaisemmassa B. Cercekin patenttihakemuksessa, sarjanumero 838 264, joka on jätetty 10. maaliskuuta 1986 ja jonka otsikko on "Automated Collection of Buoyant Density Specific Cells from Density Gradients". Näiden solujen määrääriä inkuboitiin 3 ml:ssa seuraavia aineita: (a) soluvapaata veriplasmaa syöpäpotilaista; (b) plasmaa, joka oli peräisin syöpäpotilailta ja jota oli ultrasuodatettu 12 tunnin ajan Amicon UM2-suodattimen läpi, jonka molekyylipainoraja on 1000 daltonia; (c) plasmaa, joka oli saatu syöpäpotilailta ja joka oli ultrasuodatettu 12 tuntia Amicon UM5-suodattimen läpi, jonka nimellinen molekyylipainoraja on 500 daltonia; (d) yleistä syöpään liittyvää SCM-tekijää, joka oli puhdistettu suolat poistavan

Sephadex G-10-kolonnin läpi; (e) tekijää, joka oli puhdistettu Sephadex G-50-kolonnin läpi; (f) tekijää, joka oli puhdistettu DEAE-selluloosakolonnin läpi; (g) tekijää, joka oli puhdistettu viimeisen RP-HPLC-vaiheen läpi; ja
5 (h) plasmaa, joka oli peräisin terveiltä luovuttajilta ja joka oli ultrasuodatettu Amicon UM2-suodattimen läpi, jonka nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia. Nämä inkubaatiot kestivät 2,5 tuntia.

SCM-tekijän kyky muuttaa terveiltä luovuttajilta
10 saatujen lymfosyyttien SCM-vastetta osoitettiin määrittämällä lymfosyyttien SCM-vastesuhde (RR_{scm}) jokaisen edellä mainitun fraktion kanssa suoritettuna inkuboinnin jälkeen. Ennen kuin inkuboidut solut saatettiin kosketuksiin joko mittoosia aiheuttavan tekijän tai SCM-tekijän kanssa $RR_{scm}:n$
15 määrittämiseksi, ne pestiin huolellisesti. Muuttumisen tapahtuminen tai sen puuttuminen määritettiin lymfosyyttisuspension, joka oli ollut lyhyen aikaa kosketuksissa SCM-tekijän sisältävän substraatin kanssa, polarisaatioarvon suhteena lymfosyyttisuspension, joka oli ollut lyhyen
20 aikaa kosketuksissa fytohemagglutiinin (PHA) kanssa, polarisaatioarvoon. SCM-testimenetelmän mukaisesti alle 1,0:n RR_{scm} -arvo on positiivinen indikaatio luovuttajassa olevasta pahanlaatuisesta sairaudesta kun taas 1,1 ja sitä suurempi RR_{scm} -arvo indikoi pahanlaatuisen sairauden puuttumista.

TAULUKKO 9

**Terveiltä luovuttajilta peräisin olevien lymfosyyttien
SCM-vasteiden muuttaminen SCM-tekijällä (esimerkki 12)**

5		Muuttamiseen käytetty SCM-valmiste	Ennen muutta- mista	RR_{scm} : Muuttami- sen jälkeen
		Soluvapaa syöpäveri- plasma	1,38	0,80
10		Syöpäsoluveriplasman ultrasuodos (1000 Daltonin raja)	1,35	0,78
		Sephadex G-10 (SCM- aktiivinen)	1,40	0,80
15		Sephadex G-50 (SCM- aktiivinen)	1,38	0,73
		DEAE-selluloosa (SCM- aktiivinen)	1,39	0,70
20		RP-HPLC (SCM-aktii- vinen)	1,40	0,65
		Syöpäsoluveriplasman ultrasuodos (500 Daltonin raja)	1,38	1,38
25		Terveiden luovutta- jien autologisen al- logeenisen veriplas- man ultrasuodos	1,38	1,38

Taulukosta 9 näkyy SCM-tekijää sisältävien frakti-
oiden kanssa tapahtuneen inkuboinnin vaikutus lymfosyyt-
tien vasteeseen joko SCM-tekijään tai fytohemagglutiiniin
 RR_{scm} -arvona. Lymfosyyttien, joita joko ei oltu esi-inku-
boitu tai joita oli esi-inkuboitu terveiltä luovuttajilta
peräisin olevan ultrasuodoksen kanssa, joka oli suodatet-
tu nimelliseltä molekyylipainorajaltaan 1000 daltonin
suodattimen läpi, tai joita oli esi-inkuboitu ultrasuo-
doksen kanssa, joka oli peräisin syöpää sairastavilta
luovuttajilta ja joka oli suodatettu nimelliseltä paino-
rajaltaan 500 daltonin suodattimen läpi, RR_{scm} -arvo oli

1,35 tai suurempi kuten oli odotettukin. Sen sijaan kaikkien lymfosyyttien, joita oli esi-inkuboitu SCM-tekijää sisältävien fraktioiden kanssa, RR_{scm} -arvo oli laskenut 0,65-0,80:een, joka on tyypillinen lymfosyyteille, jotka alunperin on eristetty pahanlaatuista tautia sairastavilta potilailta.

Esimerkki 13

SCM-tekijän vaikutus lymfosyyttien sytotoksisuuteen

SCM-tekijän vaikutuksen potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien sytotoksisuuteen pahanlaatuista soluja vastaan osoittamiseksi näitä lymfosyyttejä, jotka oli saatu terveiltä luovuttajilta, inkuboitiin 2 1/2 tuntia 37 °C:ssa plasman kanssa, joka sisälsi SCM-tekijää, joka oli eristetty kuten edellä on kuvattu syöpää sairastavien luovuttajien verinäytteistä. Näiden lymfosyyttien määräerät säilytettiin kontrolleina eikä niitä inkuboitu. Lisäksi potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit saatiin luovuttajilta, joilla ei ollut syöpää, ja niitä käsiteltiin samalla tavalla - muutamia määräeriä inkuboitiin SCM-tekijää sisältävän plasman kanssa ja muut säilytettiin kontrolleina eikä niitä inkuboitu.

Inkuboinnin jälkeen lymfosyyttien sytotoksisuus testattiin menetelmällä, jonka M. R. Potter ja M. Moore ovat kuvanneet artikkelissaan "Natural Cytotoxic Reactivity of Human Lymphocyte Subpopulations", Immunology 37, 187-194 (1979). Tämän julkaistun menetelmän mukaisesti ihmisen myeloidisolulinjan K 562 soluja, jotka oli leimattu ^{51}Cr :lla, käytettiin analyysin kohdesoluina. Kohdesolujen suhde vaikuttajasoluihin oli 1:20. ^{51}Cr :n vapautuminen osoittaa, että vaikuttajasolut ovat toksisia kohdesoluille. Sytotoksisuus määritetään seuraavalla tavalla:

$$\text{Sytotoksisuusprosentti} = \frac{R_s - R_c}{R_t - R_c}$$

5

jossa R_s on ^{51}Cr :n vapautumisprosentti näytteessä, R_c on ^{51}Cr :n vapautumisprosentti kontrollissa ja R_t on ^{51}Cr :n vapautumisprosentti detergentin, Triton X-100:n, läsnäollessa. Tulokset on esitetty taulukossa 10. Nämä tulokset osoittavat, että terveiltä luovuttajilta saatujen potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien inkubointi 2,5 tunnin ajan ultrasuodoksen kanssa, joka oli suodatettu nimelliseltä painorajaltaan 1000 daltonin suodattimen läpi, vähensi niiden sytotoksisuutta yli 90 %:lla. Kun inkubointi suoritettiin syöpäpotilailta saatujen potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien kanssa, sytotoksisuuden lasku oli pienempi, 40-90 %. Kuitenkin sellaisten syöpäpotilailta saatujen lymfosyyttien sytotoksisuustasot olivat matalampia ennen inkubointia, ja ultrasuodoksen kanssa suoritettun inkuboinnin jälkeen jäljelle jäänyt sytotoksisuustaso oli verrannollinen tasoon, joka oli jäljellä terveiltä luovuttajilta peräisin olevien lymfosyyttien inkuboinnin jälkeen. Syöpäpotilailta peräisin olevissa soluissa esiintyvä alhaisempi sytotoksisuustaso oli yhtenevä siihen sytotoksisuuden laskuun, jonka aiheutti solujen saattaminen kosketuksiin in vivo sellaisten tekijöiden kuin esillä olevan keksinnön mukaisten yleisten syöpään liittyvien SCM-tunnistustekijöiden kanssa.

25

TAULUKKO 10

SCM-tekijän vaikutus luonnolliseen lymfosyyttien toksisuuteen ihmisen myeloidisolulinjaa K 562 vastaan (esimerkki 13)

Potentiaalisesti SCM-vasteeseen ky- kenevien lymfosyyt- tien luovuttajan diagnoosi	Ultraosuodossa olevan SCM-tekijän luovuttajan diagnoosi	Lymfosyyttien sytotoksisuus- prosentti Ennen in- kubointia	Sytotoksisuus- den laskupro- sentti Inkuboinnin jälkeen
Terve luovuttaja 1	Kohdunkaulansyöpä	40,0	2,2
Terve luovuttaja 2	Keuhkoputkensyöpä	30,0	1,7
Terve luovuttaja 3	Kurkunpäänsyöpä	11,0	0,76
Terve luovuttaja 4	Kurkunpäänsyöpä	22,0	2,2
Terve luovuttaja 5	Nielusyöpä	41,0	0,33
Kielisyöpä	Kurkunpäänsyöpä	23,0	2,1
Huulisyöpä	Keuhkoputkensyöpä	7,4	2,7
Munasarjansyöpä	Keuhkoputkensyöpä	10,0	6,1
Kohdunkaulansyöpä	Kohdunkaulansyöpä	25,2	1,5
Keuhkoputkensyöpä	Kohdunkaulansyöpä	29,6	3,1
			94,5
			94,3
			93,1
			90,0
			99,2
			90,9
			63,5
			39,0
			94,0
			89,5

Vaikka esillä oleva keksintö on kuvattu huomattavan yksityiskohtaisesti sen tiettyjen edullisten versioiden osalta, muutkin versiot ovat mahdollisia. Sen vuoksi liitteenä olevien patenttivaatimusten luonnetta ja piiriä
5 ei pidä rajoittaa koskemaan vain tässä esitettyjä edullisia versioita.

Patenttivaatimukset

1. Yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää alhaisen molekyylipainon omaavan peptidin, joka läpäisee suodattimet, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 1000 daltonia mutta ei suodattimia, joiden nimellinen molekyylipainoraja on 500 daltonia, tekijän aiheuttaessa ainakin kymmenen prosentin laskun syöpää sairastavilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatioarvossa standardi SCM-testillä määritettynä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen tekijä, t u n n e t t u siitä, että se on puhdistettu homogeeniseksi.

3. Yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää peptidejä, jotka sisältävät vähintään kolmesta aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇, jossa R₁ on Asn tai Gln, R₂, R₃ ja R₄ ovat kukin itsenäisesti Val, Leu tai Ile, R₅ on Asp tai Glu ja R₆ ja R₇ ovat kumpikin itsenäisesti Asn tai Gln.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä, t u n n e t t u siitä, että se kykenee muuttamaan pahanlaatuista tautia sairastamattomilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien SCM-vastetta, kun tekijä saatetaan kosketuksiin tällaisten SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien kanssa, jolloin lymfosyytit reagoivat kontaktin jälkeen SCM-testissä syöpään liittyviin antigeeneihin mutta ei mitoosia aiheuttaviin aineisiin.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä, t u n n e t t u siitä, että se kykenee vähentämään potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien spontaania in vitro -toksisuutta ihmisen myeloidisolulinjaa K 562 vastaan ainakin 90 %:lla ⁵¹Cr-vapautumisena mitattuna.

6. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä, t u n -
n e t t u siitä, että sen likimääräinen aminohappokoos-
tumus on Asx₂, Glx₃, Ser, His, Gly₅, Thr, Ala₃, Tyr, Met,
Val₃, Phe₃, Ile, Leu₃, Lys₂.

5 7. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä,
t u n n e t t u siitä, että tekijässä olevan kuusitoista
aminohappoa käsittävän segmentin aminohapposekvenssi on
Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-
Ser-Lys, joka sekvenssi ei sisällä tekijän aminopäätä,
10 tekijän aiheuttaessa ainakin kymmenen prosentin laskun
syöpää sairastavilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-
vasteeseen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluo-
resenssipolarisaatioarvossa standardi-SCm-testillä määri-
tettynä.

15 8. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä, t u n -
n e t t u siitä, että tekijässä olevan viisitoista ami-
nohappoa käsittävän segmentin aminohapposekvenssi on Phe-
Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys,
joka sekvenssi ei sisällä tekijän aminopäätä, tekijän ai-
20 heuttaessa ainakin kymmenen prosentin laskun syöpää sai-
rastavilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-vasteeseen
kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresenssipol-
arisaatioarvossa standardi-SCm-testillä määritettynä.

25 9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää 15 aminohappoa sisäl-
tävän peptidin, jonka aminohapposekvenssi on Phe-Asn-Lys-
Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys, tekijän
aiheuttaessa ainakin kymmenen prosentin laskun syöpää
sairastavilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-vaste-
30 seen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresens-
sipolarisaatioarvossa standardi-SCm-testillä määritetty-
nä.

35 10. Patenttivaatimuksen 3 mukainen tekijä, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää 16 aminohappoa sisäl-
tävän peptidin, jonka aminohapposekvenssi on Phe-Asn-Lys-

Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys, tekijän aiheuttaessa ainakin kymmenen prosentin laskun syöpää sairastavilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatioarvossa standardi-SCM-testillä määritettynä.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen tekijä, t u n n e t t u siitä, että 5×10^{-2} femtogrammaa peptidiä aiheuttaa ainakin 30 prosentin polarisaatioarvon laskun, kun sitä käytetään syöpää sairastavilta luovuttajilta saatujen SCM-vasteeseen kykenevien lymfosyyttien stimuloimiseen.

12. Menetelmä lymfosyyttien testaamiseen, t u n n e t t u siitä, että nisäkäsluovuttajasta saatuja lymfosyyttejä käytetään luovuttajassa mahdollisesti olevan syövän osoittamiseen ja menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

(a) saatetaan lymfosyyttisuspensio kosketukseen patenttivaatimuksen 1 tai 3 mukaisen yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän kanssa, ja

(b) määritetään lymfosyyttien sytoplasmisen aineksen rakentuneisuuden väheneminen, joka on seurausta lymfosyyttisuspension ja tekijän välisestä kontaktista.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tekijä käsittää peptidejä, joissa on vähintään kolmetoista aminohappotähdettä sisältäen sekvenssin Phe- R_1 -Lys-Pro-Phe- R_2 -Phe- R_3 -Met- R_4 - R_5 - R_6 - R_7 , jossa R_1 on Asn tai Gln, R_2 , R_3 ja R_4 ovat kukin itsenäisesti Val, Leu tai Ile, R_5 on Asp tai Glu ja R_6 ja R_7 ovat kumpikin itsenäisesti Asn tai Gln.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tekijä käsittää peptidin, jonka aminohapposekvenssi on Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys.

15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tekijä käsittää peptidin,
jonka aminohapposekvenssi on Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-
Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys.

5 16. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tekijän sisältämän kuuden-
toista aminohapon segmentin aminohapposekvenssi on Phe-
Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-
Lys segmentin sisältämättä tekijän aminopäätä.

10 17. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että tekijän sisältämän viiden-
toista aminohapon segmentin aminohapposekvenssi on Phe-
Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys
segmentin sisältämättä tekijän aminopäätä.

15 18. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että sytoplasmisen aineksen ra-
kentuneisuuden vähenemisen määrittäminen käsittää seuraa-
vat vaiheet:

20 (a) mitataan fluoresenssipolarisaatio, P_s , lymfo-
syyttierälle, joka on saatettu kosketukseen tekijän kans-
sa,

 (b) mitataan fluoresenssipolarisaatio, P_c , toisel-
le lymfosyyttierälle, jota ei ole saatettu kosketukseen
tekijän kanssa, ja

25 (c) määritetään P_s :n suhde P_c :hen, jolloin kun P_s :n
suhde P_c :hen on alle noin 0,9, se indikoi pahanlaatuista
sairautta lymfosyyttien luovuttajassa.

 19. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että sytoplasmisen aineksen ra-
30 kentuneisuuden vähenemisen määrittäminen käsittää seuraa-
vat vaiheet:

 (a) mitataan fluoresenssipolarisaatio, P_s , lymfo-
syyttierälle, joka on saatettu kosketukseen tekijän kans-
sa;

35 (b) mitataan fluoresenssipolarisaatio, P_m , toisel-

le lymfosyyttierälle, joka on saatettu kosketukseen mittoosia aiheuttavan aineen kanssa, joka on fytohemagglutiniini, konkanavaliini A tai kermesmarjasta saatu mittoosin aiheuttajan, ja

- 5 (c) määritetään SCM-vastesuhde, RR_{SCM} $P_S:n$ ja $P_M:n$ välisenä suhteena, jolloin noin alle 0,9:n RR_{SCM} -arvo indikoi pahanlaatuista sairautta lymfosyyttien luovuttajassa.

10 20. Verinäytteen seulontamenetelmä verinäytteen luovuttajassa mahdollisesti olevan pahanlaatuisen sairauden osoittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

- (a) potentiaalisesti SCM-vasteeseen kykenevät lymfosyytit erotetaan verinäytteestä,

- 15 (b) saatetaan erotetut lymfosyytit kosketukseen patenttivaatimuksen 1 tai 3 mukaisen tekijän kanssa tällä tavalla stimuloiden lymfosyyttejä,

- (c) saatetaan stimuloidut lymfosyytit kosketukseen fluorogeenisen tekijän prekursorin kanssa riittävän pitkäksi aikaa, jotta prekursori ehtii tunkeutua lymfosyytteihin solunsisäisen entsymaattisen hydrolyysin avulla tapahtuvaa fluorogeenisen yhdisteen syntymistä varten tällä tavoin stimuloiden fluoria sisältäviä lymfosyyttejä;

- 25 (d) viritetään stimuloidut fluoria sisältävät lymfosyytit polarisoidulla valolla saattaen lymfosyytit tällä tavoin fluorisoimaan,

- 30 (e) mitataan fluorisoivien lymfosyyttien vertikaalisesti ja horisontaalisesti polarisoivat fluoresenssiemissiot fluorisoivien lymfosyyttien polarisaatioarvon määrittämiseksi, ja

- 35 (f) verrataan stimuloiduille fluoria sisältäville lymfosyyteille määritettyä polarisaatioarvoa lymfosyyttien kontrollierän polarisaatioarvoon, joka lymfosyyttierä on peräisin samalta luovuttajalta ja on käynyt läpi

vaiheet (a), (c), (d) ja (e) mutta ei vaihetta (b) tällä tavoin indikoiden syövän olemassaoloa tai sen puuttumista lymfosyyttien luovuttajan ruumiissa.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että lymfosyytit viritetään vertikaalisesti polarisoidulla valolla ja polarisaatioarvot määritetään fluoresenssispektrofotometrillä seuraavan kaavan mukaisesti:

10
$$P = (I_v - GI_H) / (I_v + GI_H),$$

jossa I_v ja I_H ovat polarisoituja fluoresenssivoimakkuusarvoja vertikaalisissa ja horisontaalisissa tasoissa, vastaavasti, ja G on korjauskerroin polarisoidun valon
15 horisontaalisten ja vertikaalisten komponenttien spektrofotometrin optisen systeemin epätasaisen läpäisyn huomioimiseksi.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että vaiheet (b) ja (c) tapahtuvat samanaikaisesti.

23. Menetelmä yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän tason määrittämiseksi ruumiinnesteessä,
t u n n e t t u siitä, että käytetään patenttivaatimuksen 1 tai 3 mukaisen yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän vasta-ainetta in vitro-immunoanalyysissä.
25

24. Menetelmä yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

30 (a) otetaan ruumiinnestettä syöpää sairastavalta luovuttajalta,

(b) erotetaan ruumiinnesteen ensimmäisen fraktion, joka käsittää näennäiseltä molekyylipainoltaan yli 1000 daltonin molekyylit, toisesta fraktiosta, joka käsittää näennäiseltä molekyylipainoltaan alle 1000 daltonin molekyylit, ja
35

(c) puhdistetaan toinen fraktio yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän aikaansaamiseksi, joka tekijä aiheuttaa ainakin kymmenen prosentin laskun syöpää sairastavilta luovuttajilta peräisin olevien SCM-vasteseen kykenevien lymfosyyttien solunsisäisessä fluoresenssipolarisaatioarvossa standardi-SCM-testillä määritettynä.

25. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ruumiinneste on ääreisverta, virtsaa ja plasmaa.

26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että toinen fraktio erotetaan ensimmäisestä fraktiosta suodattamalla ruumiinneste nimellisesti molekyylipainorajaltaan 1000 daltonin suodattimen läpi.

27. Patenttivaatimuksen 24 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää lisäksi toisen fraktion suolan poiston viemällä toinen fraktio geelisuodatuskolonniin, jonka fraktiointialue ulottuu 0:sta 700 daltoniin ja joka kykenee poistamaan suolat siitä, eluomalla lisätty materiaali kolonnista tislattulla vedellä ja talteenkeräämällä se osa, joka eluoituu eluutiotilavuutena, joka on noin 0,3 - 0,5 kertaa koko kromatografiaalustan tilavuus, tällä tavalla lisäten yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän spesifistä aktiivisuutta kerätyssä suolattomassa osassa suhteessa patenttivaatimuksen 24 toisen fraktion spesifiseen aktiivisuuteen.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää seuraavat vaiheet:

(a) talteen kerätty suolaton osa viedään geelisuodatuskolonniin, jonka fraktiointialue on noin 1500 - 30 000 daltonia,

(b) vaiheessa (a) kolonniin lisätty materiaali eluoidaan kolonnista laimealla ammoniumsuolan vesiliuok-

sella, ja

(c) kerätään talteen se osa, joka eluoituu eluaatiotilavuutena noin 0,4-0,6 kertaa koko kromatografia-alustan tilavuus, tällä tavoin lisäten yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän spesifistä aktiivisuutta kerätyssä eluaatissa suhteessa kerätyn patenttivaatimuksen 27 mukaisen suolattoman osan spesifiseen aktiivisuuteen.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää seuraavat vaiheet:

(a) viedään talteen kerätty eluaatti dietyyliaminoetyyliselluloosa-anioninvaihtokolonniin,

(b) vaiheessa (a) kolonniin lisätty materiaali eluoidaan kolonnista ammoniumsuolan nousevalla pitoisuudella, ja

(c) kerätään talteen se osa, joka eluoituu kolonnista ammoniumsuolan noin 0,28 - 0,31 M:n pitoisuudessa tällä tavoin lisäten yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän spesifistä aktiivisuutta kerätyssä eluaatissa suhteessa kerätyn patenttivaatimuksen 28 mukaisen eluaatin spesifiseen aktiivisuuteen.

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää yleisen syöpään liittyvän SCM-tunnistustekijän puhdistuksen kerätyistä patenttivaatimuksen 29 mukaisesta eluaatista pääosaltaan homogeeniseksi käänteisfaasi-korkeapainenestekromatografisesti.

31. Yleinen syöpään liittyvä SCM-tunnistustekijä, t u n n e t t u siitä, että se on tuotettu patenttivaatimuksen 24, 27, 28, 29 tai 30 mukaisella menetelmällä.

Patentkrav

1. Allmän, med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar en peptid med låg molekylvikt, vilken passerar filter med en nominell molekylviktsgräns av 1000 dalton men inte filter med en nominell molekylviktsgräns av 500 dalton, varvid faktorn orsakar en åtminstone 10-procentig sänkning i det intracellulära fluorescenspolarisationsvärdet hos med SCM reagerande lymfocyter från patienter, vilka lider av cancer, bestämt genom standard-SCM-testet.

2. Faktor enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den renats till homogenitet.

3. Allmän med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor, k ä n n e t e c k n a d därav, att den omfattar endast peptider som har åtminstone 13 aminosyrarester, och innehållande sekvensen Phe-R₁-Lys-Pro-Phe-R₂-Phe-R₃-Met-R₄-R₅-R₆-R₇, vari R₁ är Asn eller Gln, R₂, R₃ och R₄ vardera självständigt är Val, Leu eller Ile, R₅ är Asp eller Glu, och R₆ och R₇ vardera självständigt är Asn eller Gln.

4. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att den förmår modifiera SCM-gensvaret hos med SCM reagerande lymfocyter, vilka erhållits från patienter som inte har elakartade sjukdomar då faktorn bringas i kontakt med sådana med SCM reagerande lymfocyter, varvid lymfocyterna i SCM-testet efter kontakten reagerar med med cancer associerade antigener men ej med mitogener.

5. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att den förmår minska den spontana toxiciteten in vitro hos potentiellt med SCM reagerande lymfocyter gentemot den humana myeloidcellinjen K 562 med åtminstone 90 %, bestämt som ⁵¹Cr-frigöring.

6. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k-
n a d därav, att den har den ungefärliga aminosyrasam-
mansättningen Asx_2 , Glx_3 , Ser, His, Gly, Thr, Ala_3 , Tyr,
Met, Val_3 , Phe_3 , Ile, Leu_3 , Lys_2 .

5 7. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k-
n a d därav, att ett segment omfattande 16 aminosyror i
faktorn har aminosyrasekvensen Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-
Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys, varvid segmentet
inte innehåller faktorns aminoterminal, och varvid fak-
10 torn orsakar en åtminstone 10-procentig sänkning i det
intracellulära fluorescenspolarisationsvärdet hos med SCM
reagerande lymfocyter från patienter, vilka lider av kan-
cer, bestämt genom standard-SCM-testet.

15 8. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k-
n a d därav, att ett segment omfattande 15 aminosyror i
faktorn har aminosyrasekvensen Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-
Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys, varvid segmentet
inte innehåller faktorns aminoterminal, och varvid fak-
torn orsakar en åtminstone 10-procentig sänkning i det
20 intracellulära fluorescenspolarisationsvärdet hos med SCM
reagerande lymfocyter från patienter, vilka lider av kan-
cer, bestämt genom standard-SCM-testet.

25 9. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k-
n a d därav, att den omfattar en peptid innehållande 15
aminosyror och med aminosyrasekvensen Phe-Asn-Lys-Pro-
Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys, varvid fak-
torn orsakar en åtminstone 10-procentig sänkning i det
intracellulära fluorescenspolarisationsvärdet hos med SCM
reagerande lymfocyter från patienter, vilka lider av kan-
30 cer, bestämt genom standard-SCM-testet.

10. Faktor enligt patentkrav 3, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den omfattar en peptid innehål-
lande 16 aminosyror och med aminosyrasekvensen Phe-Asn-
Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys,
35 varvid faktorn orsakar en åtminstone 10-procentig sänk-

ning i det intracellulära fluorescenspolarisationsvärdet hos med SCM reagerande lymfocyter från patienter, vilka lider av cancer, bestämt genom standard-SCM-testet.

11. Faktor enligt patentkrav 10, k ä n n e -
5 t e c k n a d därav, att 5×10^{-2} femtogram av peptiden orsakar en minskning av polarisationsvärdet med åtminstone 30 % då den används för stimulering av med SCM reagerande lymfocyter från patienter som lider av cancer.

12. Förfarande för testning av lymfocyter, k ä n -
10 n e t e c k n a d därav, att lymfocyter som erhållits från ett däggdjur används för påvisning av eventuell cancer hos däggdjuret, och förfarandet omfattar följande steg:

(a) en suspension av lymfocyterna bringas i kontakt med en allmän, med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor enligt patentkrav 1 eller 3 och

(b) minskningen av strukturen i lymfocyternas cytoplasmamatris, vilken är ett resultat av kontakten mellan lymfocytuspensionen och faktorn, bestäms.

13. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att faktorn omfattar peptider med åtminstone 13 aminosyrarester som innehåller sekvensen Phe- R_1 -Lys-Pro-Phe- R_2 -Phe- R_3 -Met- R_4 - R_5 - R_6 - R_7 , varvid R_1 är Asn eller Gln, R_2 , R_3 och R_4 vardera självständigt är Val, Leu eller Ile, R_5 är Asp eller Glu och R_6 och R_7 vardera självständigt är Asn eller Gln.

14. Förfarande enligt patentkrav 13, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att faktorn omfattar en peptid, med aminosyrasekvensen Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Thr-Lys.

15. Förfarande enligt patentkrav 13, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att faktorn omfattar en peptid med aminosyrasekvensen Phe-Asn-Lys-Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys.

16. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att ett segment innehållande 16
aminosyror i faktorn har aminosyrasekvensen Phe-Asn-Lys-
Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-Phe-Ser-Lys, var-
5 vid segmentet inte innehåller faktorns aminoterminal.

17. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att ett segment innehållande 15
aminosyror i faktorn har aminosyresekvensen Phe-Asn-Lys-
Pro-Phe-Val-Phe-Leu-Met-Ile-Asp-Gln-Asn-The-Lys, varvid
10 segmentet inte innehåller faktorns aminoterminal.

18. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att bestämningen av minskningen av
strukturen i cytoplasmamatrisen omfattar följande steg:

(a) fluorescenspolarisationen, P_s , för en del av
15 lymfocyterna, vilka bringats i kontakt med faktorn, upp-
mäts,

(b) fluorescenspolarisationen, P_c , för en andra
del av lymfocyterna, vilken ej bringats i kontakt med
faktorn, uppmäts, och

20 (c) förhållandet P_s till P_c bestäms, varvid ett
förhållande P_s till P_c som understiger ca 0,9 indikerar
närvaron av en malign sjukdom hos givaren av lymfocyter-
na.

19. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e -
25 t e c k n a t därav, att bestämningen av minskningen av
strukturen i cytoplasmamatrisen omfattar följande steg:

(a) fluorescenspolarisationen, P_s , för en del av
lymfocyterna, vilka bringats i kontakt med faktorn, upp-
mäts,

30 (b) fluorescenspolarisationen, P_M , för en andra
lymfocytdel, vilken bringats i kontakt med en mitogen,
som är fytohemagglutinin, koncavalin A eller en pokeweed-
mitogen, uppmäts, och

(c) ett SCM-gensvarsförhållande RR_{SCM} bestäms som
35 förhållandet P_s till P_M , varvid ett R_{SCM} -värde som är mind-

re än ca 0,9 indikerar närvaron av en malign sjukdom hos givaren av lymfocyterna.

20. Förfarande för screening av blodprov visavi närvaron av en eventuell malign sjukdom hos givaren av blodprovet, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar följande steg:

(a) potentiellt med SCM reagerande lymfocyter separeras ur blodprovet,

(b) de separerade lymfocyterna bringas i kontakt med en faktor enligt patentkrav 1 eller 3 för stimulering av lymfocyterna,

(c) de stimulerade lymfocyterna bringas i kontakt med en prekursor till ett fluorogent medel under tillräckligt lång tid för att prekursorn skall hinna tränga in i lymfocyterna för intracellulär enzymatisk hydrolys till den fluorogena föreningen, varigenom stimulerade, fluorhaltiga lymfocyter bildas,

(d) de stimulerade, fluorhaltiga lymfocyterna exciteras med polariserat ljus, varigenom lymfocyterna förorsakas fluorescera,

(e) de vertikalt och horisontellt polariserade fluorescensemissionerna från de fluorescerande lymfocyterna mäts för bestämning av ett polarisationsvärde för de fluorescerande lymfocyterna, och

(f) det bestämda polarisationsvärdet för de stimulerade, fluorhaltiga lymfocyterna jämförs med polarisationsvärdet för en kontrolldel lymfocyter från samma givare, vilken kontrolldel utsatts för åtgärderna i stegen (a), (c), (d) och (e) men inte för åtgärderna i steg (b), varigenom erhålls en indikation på närvaron eller frånvaron av cancer i lymfocytgivarens kropp.

21. Förfarande enligt patentkrav 20, k ä n n e t e c k n a t därav, att lymfocyterna exciteras med vertikalt polariserat ljus och polarisationsvärdena bestäms i en fluorescensspektrofotometer i enlighet med följande formel:

$$P = (I_v - GI_H)/(I_v + GI_H),$$

vari I_v och I_H är de polariserade fluorescensintensiteterna i det vertikala respektive det horisontella planet och G är en korrektionsfaktor för att beakta den ojämna transmissionen av de horisontala och vertikala komponenterna av det polariserade ljuset genom det optiska systemet i spektrofotometern.

22. Förfarande enligt patentkrav 20, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att stegen (b) och (c) sker samtidigt.

23. Förfarande för bestämning av nivån av allmän med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor i en kroppsvätska, k ä n n e t e c k n a t därav, att man i en in vitro-immunanalis använder en antikropp mot en allmän med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor enligt patentkrav 1 eller 3.

24. Förfarande för framställning av en allmän med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar följande steg:

(a) en kroppsvätska tages från en individ som lider av cancer,

(b) ur kroppsvätskan separeras en första fraktion, vilken omfattar molekyler med en skenbar molekylvikt av över 1000 dalton, från en andra fraktion, vilken omfattar molekyler med en skenbar molekylvikt av under 1000 dalton, och

(c) den andra fraktionen renas för att erhålla av en allmän med cancer associerad SCM-igenkänningsfaktor, som orsakar en åtminstone 10-procentig sänkning i det intracellulära fluorescenspolarisationsvärdet hos med SCM reagerande lymfocyter från patienter, vilka lider av cancer, bestämt genom standard-SCM-testet.

25. Förfarande enligt patentkrav 24, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att kroppsvätskan är perifert blod, urin eller plasma.

26. Förfarande enligt patentkrav 24, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att separationen av den andra frak-
tionen från den första fraktionen utförs genom att kro-
ppsvätskan filtreras genom ett filter med en nominell
5 molekylviktsgräns av 1000 dalton.

27. Förfarande enligt patentkrav 24, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det även omfattar avsaltning av
den andra fraktionen genom att den andra fraktionen leds
till en gelfiltreringskolonn, vilken har ett fraktione-
10 ringsområde från 0 till 700 dalton och förmår separera
salterna från denna, det tillsatta materialet elueras
från kolonnen med destillerat vatten och den del som
elueras vid en elutionsvolym mellan ca 0,3 - 0,5 gånger
den totala kromatografiska bäddvolymen, tillvaratas, var-
15 vid den specifika aktiviteten hos den allmänna med cancer
associerade SCM-igenkänningsfaktorn i den tillvaratagna
avsaltade delen ökar i förhållande till den specifika
aktiviteten i den andra fraktionen enligt patentkrav 24.

28. Förfarande enligt patentkrav 27, k ä n n e -
20 t e c k n a t därav, att det ytterligare omfattar följande steg:

(a) den tillvaratagna, avsaltade delen leds till
en gelfiltreringskolonn, vilken har ett fraktioneringsom-
råde av ca 1500 dalton - 30 000 dalton,

25 (b) materialet, vilket tillsatts kolonnen i steget
(a), elueras från kolonnen med en svag lösning av ett am-
moniumsalt, och

(c) den del, som elueras vid en elutionsvolym mel-
lan ca 0,4 - 0,6 gånger den totala kromatografiska bäd-
30 dvolymen, tillvaratas, varvid den specifika aktiviteten
hos den allmänna med cancer associerade SCM-igenkännings-
faktorn i det tillvaratagna eluatet ökar i jämförelse med
den specifika aktiviteten hos den tillvaratagna avsaltade
delen i patentkrav 27.

29. Förfarande enligt patentkrav 28, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det ytterligare omfattar följande steg:

5 (a) det tillvaratagna eluatet leds till en anjon-
bytarkolonn av dietylaminoetylcellulosa,

(b) materialet, vilket tillsatts kolonnen i steget
(a), elueras från kolonnen med en ökande koncentration av
ett ammoniumsalt, och

10 (c) den del som elueras från kolonnen vid en ammoniumsaltkoncentration av ca 0,28 - 0,31 M tillvaratas,
varvid den specifika aktiviteten hos den allmänna med
kancer associerade SCM-igenkänningsfaktorn i det tillvaratagna eluatet ökar i förhållande till den specifika aktiviteten i det tillvaratagna eluatet i patentkrav 28.

15 30. Förfarande enligt patentkrav 29, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det ytterligare omfattar rening
av den allmänna med kancer associerade SCM-igenkänningsfaktorn från det tillvaratagna eluatet i patentkrav 29
till väsentlig homogenitet genom högtrycksvätskekromatografi i motfas.

20 31. Allmän med kancer associerad SCM-igenkänningsfaktorn, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är framställd med ett förfarande enligt patentkrav 24, 27, 28, 29 eller 30.