Octrooiraad

(12)A **Terinzagelegging** (11) **8303571**

Nederland (19) **NL**

(54) **Aan adenocarcinoom gerelateerde nieuwe antigene determinanten en daarvoor specifieke antilichamen, werkwijzen voor de bereiding ervan en daarbij behorende reagenssystemen.**

(51) Int.Cl³.: G01N 33/574, C12N 15/00, C12N 9/00, A61K 39/395.

(71) Aanvrager: Farmitalia Carlo Erba S.p.A. te Milaan, Italië.

(74) Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8303571.

(22) Ingediend 17 oktober 1983.

(32) Voorrang vanaf 23 juni 1983.

(33) Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 8317022 .

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 16 januari 1985.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Aan adenocarcinoom gerelateerde nieuwe antigene determinanten en daarvoor specifieke antilichamen, werkwijzen voor de bereiding ervan en daarbij behorende reagenssystemen.

De uitvinding heeft betrekking op aan adenocarcinoom gerelateerde nieuwe antigene determinanten, op daarvoor specifieke antilichamen en op werkwijzen voor de diagnose van menselijke adenocarcinomen, die zijn gebaseerd op het aantonen van deze antigene determinanten in biologische vloeistoffen, in weefselextrakten of -delen (coupes) en in vivo aan de tumorcellen of -massa's.

De uitvinding heeft tevens betrekking op de toepassing van specifieke antilichamen in de therapie van adenocarcinomen voor het overdragen van anti-tumor-geneesmiddelen of andere cytotoxische middelen naar de turmorcellen of -massa's.

Het is bekend, dat het in het geval van pathologische tumorverschijnselen mogelijk is met deze pathologische verschijnselen geassocieerde stoffen te isoleren uit de turmormassa's als zodanig of uit de biologische vloeistoffen. Veel van deze stoffen bezitten vaker antigene eigenschappen bij dieren dan bij de mens; een aantal ervan, die in het algemeen "tumor markers" worden genoemd, zijn oncofoetale antigenen. De aanwezigheid van een antigeen, waarvan is bepaald dat het in hoofdzaak is geassocieerd met adenocarcinoom, en in het bijzonder met de metastasen ervan, is aangetoond door Gold c.s., J. Expt. Med. 121: 439-462 (1965). Dit antigeen, dat bekend is als carcinoëmbryonaal antigeen (CEA) kan zowel in biologische vloeistoffen als in weefselextrakten of -delen worden bepaald door diverse bekende methodologieën, die bijvoorbeeld zijn beschreven in de Amerikaanse octrooischriften 3.663.684 en 3.697.638; Ann. of Clin. and Lab. Science 4, 5, 357, 1974; Clin. Chem. 19, 10, 1973; Cancer 34:1504-1509, 1974; Clin. Res. 19:143, 1971; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64:161-167, 1969; Cancer 37:62-81, 1976; Scand. J. Immunol., Vol. 7 Suppl. 6, 1978; Cancer 45:1243-1247, 1980; en J. Natl. Cancer Inst. 57, 1, 1976.

Uit de talrijke onderzoekingen op dit gebied met inbegrip van bijvoorbeeld die volgens de bovengenoemde literatuurplaatsen, is echter de zeer geringe specificiteit van CEA gebleken, aangezien deze niet alleen is aangetoond in het geval van tumorale ziekteverschijnselen maar ook bij aanwezigheid van andere, dat wil zeggen niet-tumorale, ziekteverschijnselen zoals bijvoorbeeld vele degeneratieve ontstekingsprocessen en zelfs bij gezonde donors. Bovendien hebben biochemische onderzoekingen [Urba R., Alpert E., Isselbacher K.J., Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 72, 4602-6 (1975)] verschillen aangetoond tussen uit verschillende laboratoria afkomstig CEA, met bijgevolg verschillende klinische resultaten, verkregen onder toepassing van dezelfde technieken met materialen van verschillende oorsprong.

Gevonden werd nu, dat het mogelijk is uit menselijke adenocarcinoom-metastasen alsmede uit alle menselijke adenocarcinomen, bijvoorbeeld maag-, borst- en schildklier-adenocarcinomen, antigene determinanten (K), die "specifiek" voor adenocarcinoom zijn, en antigene determinanten (P^k), die "geassocieerd" zijn met de K-determinanten op het adenocarcinoom te verkrijgen. Hoewel de antigene determinanten P^k een zeer sterke kruisreactie vertonen met de antigene determinanten (P^n), die aanwezig zijn in plasma of serum van normale donors, vertonen de antigene determinanten K geen enkele kruisreactie met de antigene determinanten P^n. Het mengsel van deze antigene determinanten K en P^k en wellicht van enige andere onbekende antigenen, is het materiaal, dat vroeger bekend was als CEA.

Volgens de uitvinding worden onder toepassing van de bovengenoemde antigene determinanten K en antigene determinanten P^k en P^n specifieke antilichamen anti-K, anti-P^k en anti-P^n verkregen.

De toepassing van de antigene determinanten K en P^k en van de daarvoor specifieke antilichamen anti-K respectievelijk anti-P^k voor de bekende immunologische methoden, zoals bijvoorbeeld de radioimmunoproef, enzymimmunoproef, immunofluorescentie, immunoluminescentie en vele anderen maakt het mogelijk uitsluitend die antigene determinanten K op te sporen en te meten, die specifiek zijn voor het adenocarcinoom zonder dat storing optreedt, die afkomstig is van de antigene determinanten P^n van het normale plasma of serum, of, desgewenst die antigene determinanten P^k, die geassocieerd zijn met de determinanten K op het adenocarcinoom. De bovengenoemde bepaling kan kwalitatief, kwantitatief of semi-kwantitatief worden uitgevoerd.

Derhalve verschaft de onderhavige uitvinding een verbeterde werkwijze voor de diagnose van menselijk adenocarcinoom door de bepaling van aan adenocarcinoom gerelateerd antigeen materiaal, hetzij in een van een menselijke patient genomen monster, bijvoorbeeld in vitro aan biologische vloeistoffen of weefselextrakten of -delen, of in vivo aan de tumorcellen of -massa's, waarbij de werkwijze wordt gekenmerkt doordat door middel van specifieke anti-K of anti-P^k antilichamen uitsluitend die antigene determinanten K worden bepaald, die specifiek zijn voor adenocarcinoom zonder de antigene determinanten P^n van de normale cellen aan te tonen of respectievelijk, die antigene determi-

nanten P^k, die geassocieerd zijn met de K-determinanten op het adenocarcinoom. Zo worden onjuiste positieve resultaten verminderd.

De uitdrukking "antigene determinanten K" duidt antigene determinanten aan, die, zoals reeds is vermeld, specifiek zijn voor het adenocarcinoom en die, omdat ze geen kruisreactie vertonen met de antigene determinanten P^n van de normale cellen, alleen worden herkend door voor deze determinanten specifieke antilichamen, dat wil zeggen anti-K antilichamen: deze definitie omvat elk antigeen mengsel CEA, waarin de van de antigene determinanten K verschillende antigene determinanten geheel of in aanzienlijke mate zijn verwijderd.

De uitdrukking "antigene determinanten P^k" duidt antigene determinanten aan, die aanwezig zijn op de adenocarcinoomcellen in "associatie" met, dat wil zeggen samen met, de voor het adenocarcinoom specifieke antigene determinanten K, waarbij, zoals reeds is vermeld, deze antigene determinanten P^k kruisreactie vertonen met de antigene determinanten P^n van de normale cellen: deze definitie omvat elk antigeen mengsel CEA, waarin de van de antigene determinanten P^k verschillende antigene determinanten geheel of in aanzienlijke mate zijn verwijderd.

De antigene determinanten P^n zijn, zoals reeds is vermeld, antigene determinanten die aanwezig zijn in het normale plasma of serum en die kruisreactie vertonen met de antigene determinanten P^k.

Een anti-K antilichaam is ofwel een antilichaam, dat is verkregen door immuniseren van dieren met de bovengenoemde antigene K-determinanten ofwel elk anti-CEA antilichaam (dat wil zeggen het antilichaam dat is verkregen door immuniseren van dieren met het CEA), dat op zodanige wijze is gemodificeerd, dat de antilichaamplaatsen die verschillen van de anti-K antilichaamplaatsen daarin geheel of in aanzienlijke mate zijn verzadigd door antigene determinanten die daarvoor specifiek zijn.

Op soortgelijke wijze is een anti-P^k antilichaam ofwel een antilichaam, dat is verkregen door immuniseren van dieren met de bovengenoemde antigene determinanten P^k ofwel elk anti-CEA antilichaam, dat op zodanige wijze is gewijzigd dat de antilichaamplaatsen, die verschillen van de anti-P^k antilichaamplaatsen daarin geheel of in aanzienlijke mate zijn verzadigd door daarvoor specifieke antigene determinanten.

In deze beschrijving duidt de uitdrukking "antilichaam" zowel immunoglobulinen als brokstukken van immunoglobuline aan en met deze uitdrukking kan ook het overeenkomstige serum worden bedoeld.

De uitdrukking "antilichaam" betekent een polyclonaal antilichaam, tenzij anders wordt aangegeven; wanneer een monoclonaal lichaam wordt bedoeld, wordt dit aangegeven.

Volgens de onderhavige uitvinding worden twee alternatieve werkwijzen verschaft voor het bereiden van de anti-K antilichamen, die specifiek zijn voor de antigene determinanten K.

Volgens de ene werkwijze worden anti-K antilichamen verkregen door absorberen van antilichamen, die worden geproduceerd tegen een mengsel van antigene determinanten K en P^k met antigene determinanten P^n of P^k teneinde de immunologische bindingsplaatsen P^k op deze antilichamen te verzadigen.

Volgens de andere werkwijze worden anti-K antilichamen verkregen door:

1) immuniseren van dieren met antigene determinanten P^n of P^k voor het vormen van anti-P^n of anti-P^k antilichamen;
2) zuiveren van een mengsel van antigene determinanten K en P^k door middel van de anti-P^n of anti-P^k antilichamen, die volgens 1) zijn gevormd, onder verkrijging van antigene determinanten K; en
3) immuniseren van dieren met antigene determinanten K, die zijn verkregen volgens 2).

De uitvinding omvat behalve de twee anti-K specifieke antilichamen, die volgens de bovenbeschreven twee alternatieve werkwijzen worden verkregen, ook de antigene determinanten K, die volgens trap 2) van de op de tweede plaats beschreven werkwijze zijn geproduceerd en verder de antigene determinanten P^k en P^n en de daarvoor specifieke anti-P^k en anti-P^n antilichamen, die bij de bovenbeschreven werkwijzen betrokken zijn.

Ook de gemerkte vormen, bijvoorbeeld radioactief gemerkte, met enzym gemerkte of door fluorescentie gemerkte vormen, van de bovengenoemde antigene determinanten K, P^k en P^n en van de overeenkomstige anti-K, anti-P^k en anti-P^n antilichamen worden door de onderhavige uitvinding omvat.

Volgens de eerste bovenbeschreven werkwijze voor het bereiden van de anti-K antilichamen wordt een mengsel van de antigene determinanten K en P^k geïnjecteerd in een dier, bijvoorbeeld een geit, schaap of konijn, volgens de gebruikelijke en bekende immunisatie-voorschriften, bijvoorbeeld in de vorm van een emulsie in Freund's adjuvants, voor het vormen van anti-K/P^k antiserum. Dit wordt gewonnen door aftappen van bloed van het dier volgens gebruikelijke technieken en wordt vervolgens geabsorbeerd, bijvoorbeeld door incubatie, met antigene determinanten

P^n of P^k. De incubatie wordt in het algemeen uitgevoerd bij een temperatuur tussen kamertemperatuur en ongeveer 50°C, bij voorkeur bij ongeveer 37°C, gedurende een periode van 1 - 5 dagen, bij voorkeur gedurende ongeveer 3 dagen. In plaats van de antigene determinanten P^n kan normaal menselijk plasma worden gebruikt aangezien, zoals reeds is vermeld, normaal menselijk plasma antigene determinanten P^n bevat. Er kan bijvoorbeeld 0,1 ml geiteserum gedurende 3 dagen bij 37°C worden geïncubeerd met 324 van een PBS-oplossing, die antigene determinanten P^n of P^k bevat in een concentratie van ongeveer 50 ɣ/ml of anderzijds met ongeveer 50 ml normaal menselijk plasma. Aan het eind van de incubatie wordt het materiaal gecentrifugeerd en wordt de bovenstaande vloeistof als zodanig gebruikt of, eventueel na verdere verdunnings/-zuiverings/stabilisatiebehandelingen als het anti-K specifieke antilichaam gebruikt.

Volgens de tweede bovenbeschreven werkwijze voor het bereiden van de anti-K antilichamen of antisera worden antigene determinanten P^n of P^k bijvoorbeeld in de vorm van een emulsie in Freund's adjuvants in een dier, bijvoorbeeld een geit, schaap of konijn geïnjecteerd, waarbij het gebruikelijke immunisatievoorschrift wordt gevolgd, waarbij anti-P^n of anti-P^k antiserum wordt gevormd, dat ook op gebruikelijke wijze wordt gewonnen door aftappen van bloed van het dier.

Immunoglobulinen worden desgewenst volgens bekende voorschriften uit het antiserum geëxtraheerd.

De zuivering van het mengsel van antigene determinanten K en P^k door middel van anti-P^n of anti-P^k antilichamen, wat de antigene determinanten K oplevert, kan volgens bekende werkwijzen worden uitgevoerd. Een nuttige techniek kan bijvoorbeeld de immunoaffiniteit- (of bioabsorptie-) chromatografie zijn, die is gebaseerd op de immunologische reactie van een antigeen en een aan een inerte drager gebonden antilichaam.

Zo wordt bijvoorbeeld een oplossing, bijvoorbeeld een PBS-oplossing, van het mengsel van antigenen K en P^k geëlueerd door een hars, bijvoorbeeld Sepharose 4B®, waaraan anti-P^n of anti-P^k antilichamen gebonden zijn. De antigene determinanten K worden zo gewonnen in de niet-gebonden fraktie.

Anti-K antiserum wordt vervolgens gevormd door de zo verkregen antigene determinanten K te injecteren in een dier, bijvoorbeeld van de boven aangegeven soort, onder toepassing van gebruikelijke voorschriften, bijvoorbeeld de bovenbeschreven voorschriften.

Het mengsel van de antigene determinanten K en P^k, dat volgens

de bovenbeschreven werkwijzen voor het bereiden van anti-K antilichamen wordt gebruikt, wordt verkregen door extraktie uit primair of metastatisch adenocarcinoomweefsel, bijvoorbeeld uit hepatische metastasen, of uit biologische vloeistoffen van patienten met ardenocarcinoom.

De extraktie kan volgens bekende voorschriften worden uitgevoerd en, indien ardenocarcinoomweefsels worden gebruikt, moeten deze vooraf worden gehomogeniseerd: in het algemeen wordt homogenisering verkregen met X Press (LKB).

De extraktie kan vervolgens worden uitgevoerd met elk geschikt oplosmiddel, bij voorkeur een oplosmiddel voor glycoproteïne, dat bijvoorbeeld perchloorzuur, trichloorazijnzuur, fosforwolfraamzuur; een alkalimetaalhalogenide, bijvoorbeeld kaliumchloride; mengsels van fenol en ethanol; neutrale, kationogene of anionogene detergentia zoals bijvoorbeeld SDS, DOC, CPC, Triton X 100, Nonidet P_{40} en dergelijke, bevat.

Bij voorkeur wordt het extraktie-oplosmiddel in hetzelfde volume als het volume van het gehomogeniseerde produkt of de biologische vloeistof gebruikt en dit oplosmiddel is bij voorkeur een geconcentreerd zuur, bijvoorbeeld met een concentratie van ongeveer 0,5 n tot ongeveer 2 n. Perchloorzuur van ongeveer 2 n is een extraktie-oplosmiddel, dat bijzonder de voorkeur verdient. Elke temperatuur beneden kamertemperatuur is geschikt voor het extraktieproces, hoewel een temperatuur van bijvoorbeeld ongeveer 4°C in het algemeen de voorkeur verdient. De extraktietijden variëren in het algemeen van ongeveer 10 minuten tot ongeveer een uur.

Na de extraktie wordt het precipitaat afgefiltreerd of gecentrifugeerd en kan de bovenstaande vloeistof worden gedialyseerd en gezuiverd. Er kunnen veel zuiveringssystemen worden aangepast, gebaseerd op verschillende principes. Zo kunnen bijvoorbeeld op grond van elektrische ladingsverschillen ionenuitwisselingsharsen voor de zuivering worden gebruikt, bijvoorbeeld DEAE Sephadex®, Sephacel® of CM cellulose of QAE Sephadex® of SP Sephadex® op basis van verschillen in het molecuulgewicht en het hydrodynamische volume kunnen chromatografietechniekenen, zoals bijvoorbeeld gelfiltratie- en hoge-druk-vloeistofchromatografie worden toegepast.

Een grotere zuiverheidsgraad kan worden verkregen op basis van de verschillen in de elektroforetische migratie en in het iso-elektrische punt: derhalve kunnen elektroforetische technieken worden toegepast, zoals bijvoorbeeld preparatieve elektroforese op een inerte drager, bijvoorbeeld Sephadex®, polyacrylamidegel en dergelijke, of iso-

elektrisch focusseren op een plaat of in een kolom.

Op basis van het glycidinegehalte ervan kan desgewenst een verdere mate van zuivering worden verkregen door het toepassen van verschillende lecitinen, die aan harsen gebonden zijn, bijvoorbeeld Sepharose® 4B.

De bij de bovenbeschreven werkwijzen voor het bereiden van anti-K antilichamen te gebruiken antigene determinanten P^n kunnen volgens gebruikelijke extraktie- en zuiveringsvoorschriften worden verkregen uit normaal menselijk plasma.

Zo kan bijvoorbeeld normaal menselijk plasma worden geëxtraheerd met bijvoorbeeld een gelijk volume van perchloorzuur of met enig ander geschikt oplosmiddel, zoals bijvoorbeeld een van de boven aangegeven oplosmiddelen voor de extraktie van het K/P^k antigene mengsel uit adenocarcinoomweefsels; er kan ook een overeenkomstige extraktietemperatuur en -tijd worden toegepast. Het extraktieprodukt kan vervolgens op gebruikelijke wijze worden gedialyseerd en volgens bekende technieken worden gezuiverd, bijvoorbeeld door immunoaffiniteit met voor de P^n-determinanten specifieke antilichamen, bijvoorbeeld door immunoaffiniteit-chromatografie tegen anti-K/P^k antilichamen of tegen anti-P^k antilichamen of tegen anti-P^n antilichamen. De antigene determinanten P^n worden zo aan de antilichamen gebonden en worden vervolgens volgens bekende methoden daarvan losgemaakt, bijvoorbeeld door toepassing van thiocyanaat of ureum of propionzuur volgens gebruikelijke voorschriften [J.W. Eveleigh, D.E. Levy, J. of Solid Phase Biochemistry, 2, 45, 1977].

De antigene determinanten P^k, die desgewenst ook bij de bovenvermelde werkwijzen voor het bereiden van anti-K antilichamen betrokken kunnen zijn, kunnen bijvoorbeeld worden verkregen uit het mengsel van de antigene determinanten K en P^k. Dit mengsel, dat bijvoorbeeld op de bovenbeschreven wijze uit adenocarcinoomweefsels is geëxtraheerd, kan bijvoorbeeld worden onderworpen aan bioabsorptiechromatografie, bijvoorbeeld door elueren van een oplossing daarvan, bijvoorbeeld een PBS-oplossing, door een hars, bijvoorbeeld Sepharose® 4B, dat daaraan gebonden anti-P^n antilichamen bevat.

De antigene determinanten P^k worden tengevolge van de kruisreactie ervan met de antigene determinanten P^n gebonden aan de hars, die de anti-P^n antilichamen bevat, en vervolgens daaruit op gebruikelijke wijze losgemaakt, bijvoorbeeld met behulp van thiocyanaat of ureum volgens gebruikelijke voorschriften, zoals boven is aangegeven.

De gehalten of zuiveringsgraad van het antigene materiaal, dat wil

zeggen de antigene determinanten K, P^k en P^n en de antigene mengsels K/P^k, worden radio-immunologisch of immunochemisch op basis van de immunologische activiteit K en P^k of P^n ervan volgens gebruikelijke methoden gecontroleerd. Zo kan bijvoorbeeld een radio-immunologische controle van het gehalte aan determinant K van een antigeen materiaal worden uitgevoerd door meting van de door dit materiaal veroorzaakte remming tegen de bindingscapaciteit van een RIA ^{125}I-K $\leftrightarrow$ anti-K systeem. Analoge controle tegen een RIA ^{125}I-P^k $\leftrightarrow$ anti-P^k systeem of, respectievelijk tegen een RIA ^{125}I-P^n $\leftrightarrow$ anti-P^n systeem, maakt het mogelijk het gehalte aan P^k respectievelijk P^n van een antigeen materiaal vast te stellen.

De anti-P^n antilichamen en anti-P^k antilichamen worden volgens de bekende immunisatietechnieken verkregen, bijvoorbeeld dezelfde technieken die eerder zijn beschreven voor het verkrijgen van anti-K/P^k antiserum en antilichamen.

Volgens de uitvinding kunnen monoclonale anti-K, anti-P^k en anti-P^n antilichamen worden gevormd tegen een afzonderlijke antigene determinant K, P^k of P^n volgens de bekende voorschriften, die het algemeen worden gebruikt voor het bereiden van monoclonale antilichamen, bijvoorbeeld de bekende hybridoma-techniek, die bijvoorbeeld wordt beschreven door Kohler C. en Milstein C. in Nature 256, 495-497, 1975. Volgens de uitvinding kan elke bekende methode voor de bepaling van een antigeen, bijvoorbeeld elke immunotestmethode, bijvoorbeeld de radioimmunotest (RIA), enzymimmunotest (EIA), immunofluorescentie, immunoluminescentie, immunodiffusie of immunoelektroforese worden toegepast voor het kwalitatief of kwantitatief bepalen van de voor adenocarcinoom specifieke antigene determinanten K of desgewenst de antigene determinanten P^k die geassocieerd zijn met de determinanten K op het adenocarcinoom.

De toepassing van één of meer van de antigene determinanten K, P^k en antigeen mengsel K/P^k, al dan niet in de gemerkte vorm, en van de overeenkomstige al dan niet gemerkte antilichamen bij elk van de bovenvermelde bekende methoden maakt een vroege diagnose van die bij mensen voorkomende tumorale ziekteverschijnselen, die bekend zijn als adenocarcinomen, mogelijk.

Een gemerkt(e) antigeen, antigene determinant, antigeen mengsel of antilichaam is een antigeen, antigene determinant, antigeen mengsel of antilichaam dat op elke mogelijke wijze kan zijn gemerkt: het systeem voor het merken kan bijvoorbeeld een radioisotoop, een enzym of een fluorescerende of luminescerende stof omvatten. Voor het merken kan elk

bekend en gebruikelijk voorschrift, bijvoorbeeld voor het merken van antigenen, worden gevolgd.

Voor het merken met bijvoorbeeld ^{125}I of ^{131}I radioisotopen kunnen de Chloramine T of Lactoperoxidase (LPO) technieken (Nature 194, 495, 1962 respectievelijk Bioch. Bioph. Acta 251, 363, 1971), of modificaties daarvan worden gevolgd; anderzijds kan het Bolton en Hunter reagens (Biochem. J. 133, 529, 1973] worden toegepast.

Voor het merken met bijvoorbeeld een enzym kunnen de in FEBS Letter 95, 311, 1978 of in J. Histochem. Cytochem. 22, 1084, 1974 beschreven technieken worden gevolgd.

Wanneer een radioimmunotest (RIA) methode wordt toegepast voor de diagnose van het adenocarcinoom kan elke bekende RIA-techniek (zie bijvoorbeeld Clin. Chem. 19: 146, 1973) worden toegepast. Zo kunnen bijvoorbeeld de voor adenocarcinoom specifieke antigene determinanten K of de daarmee geassocieerde antigene determinanten P^k op het adenocarcinoom kwantitatief worden bepaald in bijvoorbeeld een biologische vloeistof of een weefselextrakt door ze te laten concurreren met een bekende hoeveelheid van met een radioisotoop gemerkte, bijvoorbeeld met radioactief ^{125}I of ^{131}I gejodeerde antigene determinanten K respectievelijk P^k of een antigeen mengsel K/P^k, voor de reactie met een beperkte hoeveelheid anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen. De concurrentiereactie kan op gebruikelijke wijze worden uitgevoerd, bijvoorbeeld door incubatie bij een temperatuur van ongeveer 4°C tot ongeveer 40°C, bij voorkeur bij kamertemperatuur, gedurende een tijd van ongeveer 6 - 90 uren, bij voorkeur gedurende ongeveer 15 - 16 uren.

De aan de antilichamen gebonden antigene fraktie wordt vervolgens van de niet-gebonden fraktie afgescheiden en de radioactiviteit wordt gemeten in de gebonden en/of niet-gebonden fraktie.

De scheiding van de gebonden antigene fraktie van de niet-gebonden fraktie kan volgens bekende methoden worden uitgevoerd, bijvoorbeeld onder toepassing van antilichamen, die specifiek zijn voor de immunoglobulinen van de soort waaruit de eerste antilichamen, dat wil zeggen anti-K of anti-P^k antilichamen, afkomstig zijn. De radioactiviteit in de gebonden en niet-gebonden fraktie kan worden bepaald met behulp van een standaardkromme onder toepassing van bijvoorbeeld een standaard K of standaard P^k of door direkt meten van de mogelijke daling van de bindingscapaciteit van de met radioisotoop gemerkte K of P^k of K/P^k met de anti-K of anti-P^k antilichamen en zo is bijvoorbeeld een vermindering van de radio-activiteit, gemeten aan de gebonden fraktie,

evenredig met de concentratie van K of P^k van het monster.

Wanneer een enzymimmunotestmethode wordt toegepast voor de diagnose van adenocarcinoom kan elke bekende immunologische methode onder toepassing van een enzymlabel worden toegepast, bijvoorbeeld de in J. Immunology 109, 129, 1972 beschreven methoden.

Ofschoon veel enzymen met succes kunnen worden toegepast als label, zijn met bijzondere voorkeur toegepaste enzymen bijvoorbeeld peroxidase, β-galactosidase, alkalisch fosfatase en glucoseoxidase.

Zo kunnen bijvoorbeeld volgens een mogelijke enzymimmunotestmethode de antigene determinanten K of P^k van een monster uit biologische vloeistoffen of weefselextrakten kwantitatief worden bepaald volgens een EIA-methode van het "sandwich"-type, waarbij men het monster laat reageren, bijvoorbeeld door incubatie, met anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen, die chemisch zijn gebonden of passief zijn geabsorbeerd aan een vaste drager, bijvoorbeeld polystyreenparels. Na het verwijderen van de overmaat reagens door wassen worden met enzym gemerkte anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen toegevoegd, zoals bijvoorbeeld met β-galactosidase gemerkte antilichamen, die zijn verkregen volgens het in FEBS Letters 95, 311-313, 1978 beschreven voorschrift. Vervolgens wordt na wassen het geschikte enzymsubstraat toegevoegd, bijvoorbeeld o-nitrofenyl-galactopyranoside indien β-galactosidase als enzymlabel wordt gebruikt, en de ontwikkelde kleur wordt gemeten, waarbij de intensiteit daarvan evenredig is met de concentratie van de antigene determinanten K respectievelijk P^k in het monster.

Voor de histochemische toepassing kan elke bekende immunohistochemische methode (Human Pathology 12, 590-596, 1981) worden gebruikt voor het bepalen vana de aanwezigheid van antigene determinanten K of P^k op de histologische preparaten door middel van anti-K of anti-P^k specifieke antilichamen volgens de uitvinding. De histologische bepaling kan volgens gebruikelijke voorschriften worden uitgevoerd aan bevroren of op gebruikelijke wijze gefixeerde en ingesloten weefselcoupes.

Zo kunnen bijvoorbeeld weefselcoupes bij kamertemperatuur in een water bevattende buffer worden geïncubeerd met anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen, zodat de anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen zullen hechten op de plaatsen, waar de antigene determinanten K respectievelijk P^k aanwezig zijn. De gefixeerde antilichamen worden vervolgens aangetoond door daarop volgende reactie, bijvoorbeeld incubatie, met gemerkte antilichamen, die specifiek zijn voor de immunoglobulinen van de soort, waaruit de eerste anti-K of anti-P^k antilichamen afkomstig zijn.

De genoemde gemerkte antilichamen kunnen volgens bekende voorschriften worden bereid onder toepassing van bekende labels zoals bijvoorbeeld enzymen, bijvoorbeeld peroxidase, β-galactosidase, alkalisch fosfatase, glucose-oxidase, enzym-anti-enzymcomplexen, bijvoorbeeld het PAP peroxidase-antiperoxidasecomplex; fluorescerende moleculen, bijvoorbeeld fluoresceïen of rhodamine; of Biotin-Avidin-systemen, waarbij Avidin zelf wordt gebonden aan een enzym of een fluorescerende stof, bijvoorbeeld van het bovengenoemde type.

Uit de uiteindelijke microscopische analyse van het histologische preparaat zullen de plaatsen blijken, waar de onderzochte antigene determinanten K of P^k aanwezig zijn: er zullen fluorescerende plaatsen worden waargenomen wanneer een fluorescerende merkstof is gebruikt, terwijl gekleurde plaatsen zullen worden waargenomen wanneer een enzymlabel en een daarvoor specifiek chromogeen substraat bij de bepaling worden gebruikt.

Een bijzonder nuttig systeem voor het histochemisch aantonen van antigene determinanten K of P^k op weefselcoupes omvat het β-galactosidase-enzym als het label en een indolyl-galactoside, bijvoorbeeld 5-broom-4-chloor-indolyl-galactoside, als het enzymatische chromogene substraat: voor een dergelijke bepaling kan bijvoorbeeld de immuno-galactosidasetechniek worden gevolgd, die bijvoorbeeld is beschreven in Histochemistry 76, 153-158, 1982.

Zoals reeds is vermeld kunnen echter behalve de bovenbeschreven immunotestmethoden alle andere immunologische methoden volgens de uitvinding worden toegepast voor het aantonen van de aanwezigheid van voor adenocarcinoom specifieke antigene determinanten K of geassocieerde antigene determinanten P^k in biologische vloeistoffen of weefselextrakten of -delen (coupes).

Zoals ook reeds is vermeld verschaft de uitvinding behalve werkwijzen voor de diagnose van het menselijke ardenocarcinoom ook reagenssystemen voor het uitvoeren van de genoemde methoden.

Ofschoon verschillende reagenssystemen worden verschaft voor verschillende analytische methoden, bevat een reagenssysteem voor het aantonen van de antigene determinanten K altijd als wezenlijke component een anti-K specifiek antilichaam en een reagenssysteem voor het aantonen van de antigene determinanten P^k bevat als wezenlijke component een anti-P^k antilichaam. Elk van de genoemde reagenssystemen bevat bovendien andere componenten, die in elk reagenssysteem verschillend kunnen zijn, afhankelijk van de analytische methode, waarvoor het reagenssysteem is bedoeld en deze aanvullende componenten kunnen bijvoor-

beeld worden gekozen uit gemerkte antigene determinanten K of P^k, gemerkte antigene mengsels K/P^k, gemerkte anti-K of anti-P^k antilichamen of gemerkte antilichamen, die specifiek zijn voor de immunoglobulinen van de soort, waaruit de genoemde anti-K of anti-P^k antilichamen afkomstig zijn.

Verder kunnen eventueel andere componenten aanwezig zijn in het door de uitvinding verschafte reagenssysteem, zoals bijvoorbeeld een "bound-free" scheidingssysteem, controlemiddelen, standaardstoffen, bufferstoffen, stabiliseermiddelen, antimicrobiële middelen, oppervlakactieve stoffen, enzymsubstraten en activeermiddelen.

Zo kan bijvoorbeeld voor een radioimmunotestmethode voor het opsporen van de antigene determinanten K of P^k in biologische vloeistoffen of weefselextrakten volgens de bovenbeschreven RIA-methode als toepasbaar reagenssyteem een samenstel omvatten, dat in hoofdzaak omvat:

1) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichaam;
2) met radioisotoop gemerkte antigene determinanten K respectievelijk P^k of anderzijds een met radioisotoop gemerkt antigeen mengseel K/P^k;
3) controlemiddelen; en
4) buffers.

Het bovenbeschreven samenstel kan bovendien een tweede antilichaam bevatten, dat specifiek is voor de immunoglobulinen van de soort, waarin het anti-K respectievelijk anti-P^k antilichaam van de component 1) gevormd is, en eventueel oppervlak-actieve stoffen en/of stabiliseermiddelen of antimicrobiële middelen.

De met radioisotoop gemerkte K of P^k of K/P^k van component 2) van het samenstel van bijvoorbeeld met ^{125}I of ^{135}I radioisotoop gemerkt K of P^k of K/P^k zijn.

De controlemiddelen 3) omvatten ten minste één negatief controlemiddel en één positief controlemiddel en de buffers 4) kunnen elke buffer omvatten, die bijvoorbeeld een pH tussen ongeveer 6,5 en ongeveer 8 bezit, bij voorkeur ongeveer 7,2.

Oppervlak-actieve stoffen kunnen bijvoorbeeld Tween 20 of 80, Nonidet P_{40}, Triton X100 en dergelijke zijn.

Stabiliseermiddelen kunnen bijvoorbeeld runderserum, albumine, gelatine en dergelijke zijn.

Een antimicrobieel middel kan bijvoorbeeld natriumazide zijn.

Buffers kunnen bijvoorbeeld fosfaatbuffers zijn, die eventueel zijn gemengd met anorganische zouten zoals bijvoorbeeld natriumchlori-

de.

Volgens een bijzondere voorkeurs-uitvoeringsvorm bevat een samenstel voor de RIA-bepaling van antigene determinanten K of P^k:

1) een anti-K of anti-P^k antilichaam, gevormd uit geiten, op geschikte wijze verdund in een mengsel van
   - fosfaatbuffer met een pH tussen ongeveer 6,5 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,2, en een concentratie tussen ongeveer 20 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 70 mmolair;
   - natriumchloride in een molaire concentratie tussen ongeveer 20 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 70 mmolair;
   - EDTA-dinatriumzout in een concentratie tussen ongeveer 25 mmolair en ongeveer 50 mmolair, bij voorkeur ongeveer 3 mmolair;
   - natriumazide in een molaire concentratie tussen ongeveer 15 mmolair en ongeveer 50 mmolair, bij voorkeur ongeveer 31 mmolair, en
   - normaal geiteserum in een concentratie tussen ongeveer 0,05% en ongeveer 0,5%, bij voorkeur ongeveer 0,1% (volume/volume);
2) een referentiebuffer (te gebruiken voor het bepalen van de maximale bindingscapaciteit van het antilichaam $\leftrightarrow$ met radioisotoop gemerkt antigeensysteem) omvattende:
   - fosfaatbuffer met een pH tussen ongeveer 6,5 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,2 en een concentratie tussen ongeveer 20 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 70 mmolair;
   - natriumchloride in een concentratie tussen ongeveer 20 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 70 mmolair;
   - natriumazide in een concentratie tussen ongeveer 15 mmolair en ongeveer 50 mmolair, bij voorkeur ongeveer 31 mmolair; en
   - runderserumalbumine in een concentratie tussen ongeveer 0,1% en ongeveer 1%, bij voorkeur ongeveer 0,4% (gewicht/volume);
3) een radioisotoop bevattende merker, omvattende:
   met de radioisotoop ^{125}I gejodeerde antigene determinanten K of P^k of antigeen mengsel K/P^k, zodanig verdund in de referentiebuffer 2) dat een concentratie van 1,5 ng/ml met een specifieke activiteit van ongeveer 60 mCi/mg aanwezig is;
4) een precipiterend antiserum anti-geit-immunoglobulinen, op geschikte wijze verdund in de referentiebuffer 2);
5) een negatieve controle: menselijk plasma, dat negatief is ten opzichte van de test, dat wil zeggen normaal menselijk plasma; en
6) een positieve controle: menselijk plasma, dat positief is ten opzichte van de test, dat wil zeggen menselijk plasma van een patient

met adenocarcinoom of normaal menselijk plasma, waaraan een bekende hoeveelheid antigene determinanten K of P^k of antigeen mengsel K/P^k is toegevoegd.

Voor een enzymimmunotestmethode voor de bepaling van de antigene determinanten K of P^k in biologische vloeistoffen of weefselextrakten volgens het EIA-voorschrift van het "sandwich"-type, dat boven is beschreven, kan een reagenssysteem worden toegepast, dat bijvoorbeeld in hoofdzaak bevat:

1) aan een vaste fase gebonden anti-K respectievelijk P^k antilichamen;
2) met enzym geconjugeerde anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen;
3) een enzymatisch substraat;
4) controlemiddelen; en
5) buffers.

Het bovenbeschreven reagenssysteem kan bovendien andere componenten bevatten, zoals bijvoorbeeld een blokkeermiddel voor de enzymatische reactie en verder, zoals reeds is vermeld, oppervlak-actieve stoffen, stabiliseermiddelen, antimicrobiële middelen, enzym-activeermiddelen en dergelijke.

De anti-K of anti-P^k antilichamen van de component 1) kunnen bijvoorbeeld worden geabsorbeerd op polystyreenparels.

De enzymconjugaat-component 2) kan bijvoorbeeld anti-K of anti-P^k antilichamen omvatten, die volgens bekende voorschriften, zoals eerder in deze beschrijving zijn vermeld, zijn geconjugeerd met het β-galactosidase-enzym.

De enzymatische substraatcomponent 3) kan bijvoorbeeld elk chromogeen substraat zijn, dat specifiek is voor het enzym van de component 2); indien β-galactosidase als enzym wordt gebruikt, kan een geschikt chromogeen substraat bijvoorbeeld o-nitrofenylgalactopyranoside zijn.

De controlemiddelen 4) en buffers 5) kunnen hetzelfde zijn als in het bovenstaande is aangegeven voor het RIA-samenstel.

Het eventuele blokkeermiddel voor de enzymatische reactie kan bijvoorbeeld in geval β-galactosidase als enzym wordt gebruikt een alkalimetaalcarbonaat, bijvoorbeeld natriumcarbonaat zijn.

Volgens een bijzondere voorkeurs-uitvoeringsvorm omvat een samenstel voor de bovenbeschreven EIA-bepaling van het "sandwich"-type van de antigene determinanten K of P^k:

1) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen, geabsorbeerd op polystyreenparels;

2) een buffer als verdunningsmiddel, die bevat:
   - een fosfaatbuffer met een pH tussen ongeveer 6,5 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,2, en een concentratie tussen ongeveer 50 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 70 mmolair;
   - natriumchloride in een concentratie tussen ongeveer 50 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 70 mmolair;
   - natriumazide in een concentratie tussen ongeveer 15 mmolair en ongeveer 50 mmolair, bij voorkeur ongeveer 31 mmolair; en
   - runderalbumine in een concentratie tussen ongeveer 0,5% en ongeveer 3%, bij voorkeur ongeveer 1% (gewicht/volume);
3) met β-galactosidase geconjugeerde anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen, op geschikte wijze verdund in buffer 2);
4) een enzymatisch substraat, dat bevat:
   - o-nitro-fenylgalactopyranoside in een concentratie tussen ongeveer 2 mmolair en ongeveer 4 mmolair, bij voorkeur ongeveer 2,3 mmolair; en
   - een fosfaatbuffer met een pH tussen ongeveer 6,5 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,2 en met een concentratie tussen ongeveer 10 mmolair en ongeveer 30 mmolair, bij voorkeur ongeveer 15 mmolair;
5) een blokkeermiddel voor de enzymatische reactie, dat natriumcarbonaat in een concentratie tussen ongeveer 0,25 molair en ongeveer 2 molair, bij voorkeur ongeveer 1 molair bevat;
6) een negatieve controle: menselijk plasma, dat negatief is ten opzichte van de test, dat wil zeggen normaal menselijk plasma; en
7) een positieve controle: menselijk plasma, dat positief is ten opzichte van de test, dat wil zeggen menselijk plasma van een patient met adenocarcinoom of normaal menselijk plasma, waaraan een bekende hoeveelheid antigene determinanten K of P^k of antigeen mengsel K/P^k is toegevoegd.

Voor de histochemische bepaling van antigene determinanten K of P^k aan weefselcoupes volgens het bovenbeschreven voorschrift kan een bruikbaar reagenssysteem bijvoorbeeld een samenstel omvatten, dat in hoofdzaak bevat:

1) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen;
2) met enzym gemerkte antilichamen, die specifiek zijn voor de immunoglobulinen van de soort, waarin de anti-K respectievelijk anti-P antilichamen van de component 1) zijn gevormd;
3) een enzymatisch substraat, en

4) buffer.

In het bovenbeschreven samenstel kunnen ook andere componenten worden opgenomen, zoals bijvoorbeeld een blokkeermiddel voor het verwijderen van eventueel storende aspecifieke interakties, een contrast-kleurmiddel (voor de kernen) en verder, zoals reeds is vermeld, oppervlak-actieve stoffen, stabiliseermiddelen, antimicrobiële middelen, enzym-activeermiddelen en dergelijke.

In het bovenbeschreven reagenssysteem kunnen de anti-K of anti-P^k antilichamen bijvoorbeeld afkomstig zijn van geiten en dan zullen de antilichamen van de component 2) anti-geit-immunoglobuline-antilichamen zijn en bijvoorbeeld worden gevormd in ezels.

De met enzym gemerkte antilichamen van de component 2) kunnen bijvoorbeeld met β-galactosidase gemerkte antilichamen zijn, die worden verkregen volgens bekende technieken, zoals reeds eerder is vermeld.

De enzymatische substraatcomponent 3) kan elk substraat zijn, dat specifiek is voor het enzym van de component 2) en dat in staat is een gekleurd en onoplosbaar produkt te geven door de inwerking van het enzym: indien β-galactosidase als enzym wordt gebruikt, kan een toepasbaar chromogeen substraat bijvoorbeeld een indolyl-galactoside, in het bijzonder 5-broom-4-chloor-indolyl-galactoside zijn.

De buffers kunnen bijvoorbeeld fosfaat- of Tris-buffers met een pH tussen ongeveer 6,5 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,3 zijn.

Het blokkeermiddel, dat eventueel vereist is voor het verwijderen van storende materialen uit aspecifieke wisselwerkingen, kan bijvoorbeeld normaal ezelserum zijn voor het geval dat de antilichamen van de component 2) afkomstig zijn van ezels.

Het contrast-kleurmiddel kan bijvoorbeeld carminezuur bevatten.

Volgens een bijzondere voorkeurs-uitvoeringsvorm bevat een samenstel voor de histochemische bepaling van antigene determinanten K of P^k aan weefselcoupes:

1) een wasbuffer, omvattende
   - tris- of fosfaatbuffer met een pH tussen ongeveer 5,5 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,3 en een concentratie tussen ongeveer 5 mmolair en ongeveer 100 mmolair, bij voorkeur ongeveer 10 mmolair; en
   - natriumchloride in een concentratie tussen ongeveer 50 mmolair en ongeveer 200 mmolair, bij voorkeur ongeveer 150 mmolair;
2) een blokkerende buffer, die dezelfde componenten omvat van de wasbuffer volgens 1) en bovendien normaal ezelserum in een concentratie tussen ongeveer 1% en ongeveer 5%, bij voorkeur ongeveer 3% (volu-

me/volume);

3) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen, gevormd in geiten, op geschikte wijze verdund in de bovengenoemde buffer 1);

4) met β-galactosidase geconjugeerde anti-geit-immunoglobuline-antilichamen, gevormd in ezels, op geschikte wijze verdund in de bovenbeschreven buffer 1);

5) een enzymatisch substraat, dat bevat:
   - een fosfaatbuffer met een pH tussen ongeveer 7 en ongeveer 8, bij voorkeur ongeveer 7,4, en een concentratie tussen ongeveer 5 mmolair en ongeveer 50 mmolair, bij voorkeur ongeveer 10 mmolair;
   - natriumchloride in een concentratie tussen ongeveer 5 mmolair en ongeveer 50 mmolair, bij voorkeur ongeveer 10 mmolair;
   - magnesiumchloride in een concentratie tussen ongeveer 0,1 mmolair en ongeveer 2 mmolair, bij voorkeur ongeveer 1 mmolair;
   - 5-broom-4-chloor-indolylgalactoside in een concentratie tussen ongeveer 0,5 mmolair en ongeveer 5 mmolair, bij voorkeur ongeveer 1 mmolair;
   - kaliumhexacyanoferraat(II) in een concentratie tussen ongeveer 3 mmolair en ongeveer 10 mmolair, bij voorkeur ongeveer 6 mmolair; en
   - kaliumhexacyanoferraat(III) in een concentratie tussen ongeveer 3 mmolair en ongeveer 10 mmolair, bij voorkeur ongeveer 6 mmolair;

6) een contrast-kleurmiddel, dat bevat:
   - carminezuur in een concentratie (gewicht/volume) tussen ongeveer 1 g/l en ongeveer 10 g/l, bij voorkeur ongeveer 2,5 g/l; en
   - aluminiumkaliumsulfaat in een concentratie tussen ongeveer 25 mmolair en ongeveer 150 mmolair, bij voorkeur ongeveer 50 mmolair.

In de bovenbeschreven uitvoeringsvormen van de reagenssystemen volgens de uitvinding geven de vermelde concentraties de concentraties per liter aan, waarin elke component in een voor het uitvoeren van de test gebruikte oplossing of mengsel aanwezig is.

De toepassing van de volgens de uitvinding verschafte reagenssystemen bij de bekende analytische methoden voor de bepaling van antigenen met inbegrip van de vloeistoffase-immunotestmethoden en de vaste fase-immunotestmethoden en histochemische bepalingen maakt het mogelijk op relevante wijze de mogelijkheid van de diagnostiek van het menselijk adenocarcinoom te verbeteren.

De mogelijkheid van het volgens de uitvinding opsporen van alleen die antigene determinanten (K), die specifiek zijn voor het adenocarcinoom zonder dat storing optreedt, afkomstig van de antigene determinan-

ten P^n of anderzijds die antigene determinanten (P^k), die zijn geassocieerd met de determinanten K op het adenocarcinoom, kan diagnostische resultaten opleveren die beter zijn dan de resultaten die worden verkregen met de bekende, in de handel verkrijgbare samenstellen voor de CEA-test; met de methoden en reagentia volgens de uitvinding wordt inderdaad een aanzienlijk lager aantal onjuiste positieve bepalingen waargenomen.

De resultaten, verkregen uit experimenten, uitgevoerd met de methoden en reagentia volgens de uitvinding aan talrijke gevallen van niet-neoplastische pathologische verschijnselen, met inbegrip van vele degeneratieve ontstekingsverschijnselen en tevens van neoplastische pathologische verschijnselen, werden gekenmerkt door percentages van onjuiste positieve bepalingen respectievelijk onjuiste negatieve bepalingen die lager zijn dan de percentages, die worden waargenomen in de gevallen, waarin de bekende samenstellen voor CEA onder toepassing van anti-CEA antilichamen (bijvoorbeeld de CEA Roche-test en het Liso-phase CEA-samenstel) worden gebruikt.

In het bijzonder wanneer vergelijkende experimenten werden uitgevoerd door analyse van histologische preparaten met de reagentia volgens de uitvinding en met in de handel verkrijgbare samenstellen, bijvoorbeeld DAKO PAP KIT en IMMULOK HISTO SET, werd waargenomen dat, hoewel de bekende samenstellen ook bij een aantal normale cellen positieve reacties gaven met een bijzonder grote fout, bijvoorbeeld in het geval van de analyse van beenmergweefsels, werden met de reagentia volgens de uitvinding uitsluitend metastatische cellen van adenocarcinoom aangetoond met in het geheel geen onjuiste positieve resultaten, dat wil zeggen zonder enige positieve kleuring van de normale cellen, bijvoorbeeld granulocyten, hetgeen een duidelijke tegenstelling vormt met de voor de vergelijking gebruikte in de handel verkrijgbare samenstellen.

De nieuwe, hetzij polyclonale hetzij monoclonale anti-K antilichamen of anderzijds anti-P^k antilichamen, die volgens de uitvinding worden verschaft, alsmede anti-K of anti-P^k antilichaamfragmenten, bijvoorbeeld Fab' of $F(ab')_2$-fragmenten kunnen als merkers worden gebruikt, bijvoorbeeld in de nucleaire geneeskunde en radioimmunochemie. Derhalve kunnen bijvoorbeeld de bovengenoemde antilichamen of antilichaamfragmenten worden gemerkt met radioisotopen, bijvoorbeeld ^{131}I, en de zo verkregen merkers kunnen in het menselijk lichaam worden geïnjecteerd om eventuele adenocarcinoomcellen of -massa's te visualiseren en lokaliseren. Het visualiseren van de merker kan worden uitgevoerd volgens bekende methoden onder toepassing van speciale in-

strumenten, bijvoorbeeld door γ-camera-aftasting.

Een andere toepassing van de nieuwe, hetzij polyclonale hetzij monoclonale anti-K antilichamen of anti-P^k antilichamen of fragmenten daarvan, die volgens de uitvinding worden verschaft, is voor de therapie van adenocarcinomen bij de mens. De mogelijkheid van de toepassing van anti-K antilichamen respectievelijk anti-P^k antilichamen, die in staat zijn uitsluitend de adenocarcinoomcellen te herkennen zonder de normale cellen te herkennen, maakt het mogelijk een chemotherapie voor tumors te verwezenlijken, die specifiek en uitsluitend op de tumormassa's is gericht.

Voor deze toepassing kunnen de bovengenoemde nieuwe antilichamen of antilichaamfragmenten worden geconjugeerd met anti-tumorgeneesmiddelen of andere cytotoxische middelen en in de patient worden geïnjecteerd, zodat het geneesmiddel of het cytotoxische middel door de antilichaamdrager alleen naar de tumorcellen of -massa's wordt overgebracht.

Anti-tumorgeneesmiddelen kunnen bijvoorbeeld zijn daunorubicine, doxorubicine, epirubicine en methotrexaat.

Een cytotoxisch middel kan bijvoorbeeld ricine zijn.

Het conjugeren van het anti-tumorgeneesmiddel of cytotoxisch middel, bijvoorbeeld een van de bovengenoemde middelen, met een polyclonaal of monoclonaal anti-K of anti-P^k antilichaam volgens de uitvinding kan volgens bekende methoden worden uitgevoerd, bijvoorbeeld de methoden die worden beschreven in J. Immun. Methods 59, 129-143 (1983).

De conjugaten van een anti-tumorgeneesmiddel of cytotoxisch middel, bijvoorbeeld een van de bovengenoemde middelen, en een polyclonaal- of monoclonaal anti-K of anti-P^k antilichaam maken deel uit van de uitvinding.

Derhalve verschaft de uitvinding ook een verbeterde werkwijze voor een specifieke en gerichte chemotherapie van adenocarcinoom bij de mens, waarbij de invloed van het geneesmiddel uitsluitend op de tumorcellen wordt uitgeoefend en de normale cellen in het geheel niet op nadelige wijze door het geneesmiddel worden beïnvloed.

In deze beschrijving betekenen de afkortingen EDTA, Tris, PBS, PEG, HPLC, IgC, mCi, DEAE, SDS, DOC, CPC, ethyleendiamino-tetra-azijnzuur, tris-(hydroxymethyl)-aminomethaan, met fosfaat gebufferde zoutoplossing, polyethyleenglycol, hoge-druk-vloeistof-chromatografie, immunoglobuline(n), milliCurie, diethylaminoethylcellulose, natriumdesoxycholaat en cetylpyridiniumchloride.

In de volgende voorbeelden wordt de uitvinding nader toegelicht.

Voorbeeld I.

Hepatische metastasen van colon-adenocarcinoom (100 g) werden gedurende 24 uren bij -80°C bevroren en vervolgens onder hoge druk gehomogeniseerd onder toepassing van een "X-press LKB"-inrichting. Het gehomogeniseerde materiaal werd opgenomen met 3 volumedelen van een 0,025 M oplossing van saccharose in water en vervolgens werd daaraan een gelijk volume 2 n $HClO_4$ toegevoegd. Na centrifugeren (10.000 x g x 20 minuten bij 4°C) en dialyse van de bovenstaande vloeistof tegen gedestilleerd water werd onder roeren bij 4°C gedurende 24 uren een precipitatie uitgevoerd met 3 M KCl. Het mengsel werd opnieuw gecentrifugeerd (100.000 x g x 1 uur bij 4°C) en de bovenstaande vloeistof werd vervolgens gedialyseerd tegen een 0,005 M fosfaatbuffer van pH 6,75.

Het extrakt werd door RIA gecontroleerd op basis van de geproduceerde remming van de bindingscapaciteit van een ^{125}I-I $\leftrightarrow$ anti-K of ^{125}I-K/P^k $\leftrightarrow$ anti-K RIA systeem en vervolgens gechromatografeerd over een kolom (1,6 x 5 cm) met DEAE-cellulose, die tevoren was geëquilibreerd met een 0,005 M fosfaatbuffer met een pH van 6,75. Eluties werden achtereenvolgens uitgevoerd met een 0,025 M fosfaatbuffer met een pH van 6,75 (40 ml), een 0,05 M fosfaatbuffer met een pH van 6,75 (40 ml) en vervolgens met een 0,1 M fosfaatbuffer met een pH van 6,75 (40 ml). Elke geëlueerde fraktie werd, zoals hierboven aangegeven, gecontroleerd door middel van RIA en vervolgens geconcentreerd tot 5 ml. De frakties van 0,025 M en 0,05 m werden verder gezuiverd door gelfiltratie (4 ml/uur) over een kolom (Ø 1,6 cm, hoogte 100 cm) met Sephadex® G 200, die was gebufferd op pH 4,65 met een oplossing in water van 0,05 M NaH_2PO_4 en 0,9% NaCl. Op deze wijze werden twee pieken geëlueerd en elke piek werd opnieuw gecontroleerd door middel van RIA, zoals boven is aangegeven, en tevens met een ^{125}I-P^k $\leftrightarrow$ anti-P^k systeem teneinde de antigene activiteitswaarden van K en P^k te bepalen. Er werd bevestigd, dat beide pieken een mengsel van antigene determinanten K en P^k waren, waarbij de concentratie van K in de eerste piek hoger was dan in de tweede piek.

Voorbeeld II.

Normaal menselijk plasma (5 l) werd gecentrifugeerd (5000 x g x 15 minuten bij 4°C) en vervolgens werd de bovenstaande vloeistof geëxtraheerd met een gelijke volumehoeveelheid 1,2 n $HClO_4$.

Het extrakt werd gedurende 24 uren gedialyseerd tegen stromend water en vervolgens nogmaals gedurende 24 uren tegen tweemaal gedestilleerd water. Na 10- tot 20-voudige concentratie door "Amicon-cel" en

dialyse tegen PBS met een pH van 7,2 werd 0,5-%'s Tween 80 aan het extrakt toegevoegd (om niet-specifieke wisselwerkingen te vermijden) en het extrakt werd vervolgens gechromatografeerd over een bioabsorptiekolom met Sepharose® 4B, waarin zich aan de hars gebonden anti-P^n antilichamen bevonden.

De fraktie, die tijdens het elutieproces aan het hars werd gebonden (antigene determinanten P^n) werd vervolgens van de hars zelf losgemaakt door middel van een 3M PBS oplossing van ammoniumthiocyanaat volgens de in J. of Solid-Phase Biochemistry 2, 45, 1977 beschreven methode.

het verkregen produkt werd gedialyseerd tegen gedestilleerd water en tegen PBS met een pH van 7,2 en vervolgens door RIA gecontroleerd door meting van de inhibitie van de bindingscapaciteit van een ^{125}I-P^n $\leftrightarrow$ anti-P^n RIA-systeem.

Er werd vastgesteld dat het produkt antigene determinanten P^n in een concentratie van 50 γ/ml bevatte, bepaald volgens de Lowry-methode.

Voorbeeld III.

Een PBS-oplossing met een pH van 7,2, die Tween 80 (0,5-%'s) en het antigene mengsel K/P^k (1 mg/ml), verkregen in voorbeeld I (eerste geëlueerde piek) bevatte, werd gechromatografeerd over een bioabsorptiekolom met Sepharose® 4B, waarin zich anti-P^k antilichamen bevonden.

De niet-gebonden fraktie, die antigene determinanten K bevatte, werd tot een klein volume geconcentreerd en door RIA gecontroleerd door meting van de inhibitie van de bindingscapaciteit van een ^{125}I-K $\leftrightarrow$ anti-K RIA-systeem.

Zo werd bevestigd, dat de niet-gebonden fraktie antigene determinanten K in een concentratie van 0,1 mg/ml in het PBS-Tween-mengsel bevatte.

De gebonden fraktie, dat wil zeggen de fraktie, die werd gebonden aan de anti-P^k antilichamen van de kolom, werd losgemaakt door elutie met een 3 M PBS-oplossing van ammoniumthiocyanaat volgens het in voorbeeld II beschreven voorschrift.

Het eluaat werd vervolgens gedialyseerd tegen tweemaal gedestilleerd water en vervolgens tegen PBS en het gehalte ervan werd gecontroleerd door RIA op basis van de inhibitie van de bindingscapaciteit van een ^{125}I-P^K $\leftrightarrow$ anti-P^k RIA-systeem. Zo werd bevestigd dat de geëlueerde fraktie antigene determinanten P^k in een concentratie van 0,15 mg/ml bevatte.

Het bovenbeschreven voorschrift werd herhaald onder toepassing van een bioabsorptiekolom met Sepharose® 4B, waarin zich anti-P^n antilichamen bevonden. Tijdens de elutie van het antigene mengsel K/P^k werden de antigene determinanten door kruisreactie aan de anti-P^n antilichamen van de kolom gebonden en dit werd bewezen door het feit dat de antigene determinanten P^k in een concentratie van 0,15 mg/ml uit de gebonden fraktie werden gewonnen. De controle van het gehalte aan P^k werd opnieuw uitgevoerd door RIA, zoals boven wordt beschreven, aan de hand van een ^{125}I-$P^k \leftrightarrow$ anti-P^k RIA-systeem.

Voorbeeld IV.

Een PBS-oplossing van het volgens voorbeeld I verkregen antigene mengsel K/P^k werd in een concentratie van 1 mg/ml geëmulgeerd met een gelijk volume van een suspensie van Freund's compleet adjuvans. Het verkregen mengsel werd gebruikt voor 4 subcutane injecties op 4 verschillende plaatsen van de rug van een Tibetaanse geit. De injecties werden driemaal herhaald met tussenpozen van 15 dagen. Na de derde injectie werd de immunologische respons onderzocht: van het dier werd bloed afgetapt en de titer van serum werd als volgt gecontroleerd: verdunningsreeksen van het serum werden gedurenede één nacht bij 37°C geincubeerd met 100 µl van een PBS-oplossing, die 1,5 ng/ml van de met ^{125}I als radioisotoop gejodeerde antigene determinanten K of volgens een ander voorschrift met ^{125}I als radioisotoop gejodeerd antigeen mengsel K/P^k bevatte.

Na de incubatie werden 0,1 ml van een 1/10 PBS-oplossing van anti-geit-immunoglobulinen, gevormd in konijnen, en 0,1 ml van een 1/1000 PBS-oplossing van normaal geiteserum toegevoegd. Het mengsel werd vervolgens gecentrifugeerd (5000 x g x 15' bij 4°C), de bovenstaande vloeistof werd verwijderd en de radioactiviteit werd aan het precipitaat gemeten met een gamma-teller. Het titer van het antiserum werd berekend als de verdunning van antilichaam, die in staat was tot het binden van 50% van de totale hoeveelheid gemerkt antigeen. Het verkregen anti-K/P antiserum bleek een gemiddelde titer van 1/50.000 te bezitten.

Volgens analoge methoden maar onder toepassing van antigene determinanten K of antigene determinanten P^k, verkregen volgens voorbeeld III, of antigene determinanten P^n, verkregen volgens voorbeeld II in plaats van het antigene mengsel K/P^k werden anti-K antiserum, anti-P^k antiserum respectievelijk anti-P^n antiserum verkregen.

Voorbeeld V.

Het in voorbeeld IV verkregen anti-K/P^k antiserum (1 ml) werd

behandeld met een 14-%'s PEG 6000 oplossing in 0,1 M Veronal-buffer met een pH van 8,6 (9 ml).

Het verkregen precipitaat werd opgenomen met de minimale hoeveelheid 0,02 M fosfaatbuffer met een pH van 8 en gezuiverd over DEAE-cellulose.

De in de uitgangsbuffer geëlueerde eiwitten (5 ml) werden weer geprecipiteerd met 20-%'s PEG 6000-oplossing in 0,1 M Veronal-buffer met een pH van 8,6 (45 ml). Het precipitaat werd opgenomen met PBS en 0,5-%'s Tween 80 (1 ml) en verder gezuiverd over een bioabsorptiekolom met Sephadex® 4B, waarin zich antigenen K/P^k in gebonden toestand bevonden.

De anti-K/P^k immunoglobulinen, die aan de kolom gebonden bleven, werden vervolgens verwijderd door elutie met ammoniumthiocyanaat volgens het in voorbeeld II beschreven voorschrift, wat anti-K/P^k antilichamen opleverde. Volgens een analoge methode werden uitgaande van de anti-K, anti-P^k en anti-P^n antisera, verkregen in voorbeeld IV, anti-K, anti-P^k respectievelijk anti-P^n antilichamen verkregen.

Voorbeeld VI.

Het volgens het voorschrift van voorbeeld IV verkregen anti-K/P^k antiserum (0,1 ml) werd gedurende 24 uren bij 37°C geïncubeerd met normaal menselijk plasma (8 ml) en het mengsel werd gecentrifugeerd (5000 x g x 15' bij 4°C). Elke hoeveelheid van 0,1 ml van de bovenstaande vloeistof werd opnieuw gedurende 24 uren bij 37°C geïncubeerd met 4 ml normaal menselijk plasma en opnieuw gecentrifugeerd onder de hierboven aangegeven omstandigheden.

De bovenstaande vloeistof werd afgescheiden en de immunologische activiteit ervan werd gecontroleerd op basis van de capaciteit ervan met betrekking tot het in dezelfde mate binden van een met ^{125}I als radioisotoop gemerkt antigeenmengsel K/P^k, zowel bij aanwezigheid als bij afwezigheid van normaal menselijk plasma. De afwezigheid van een kruisreactie met normaal menselijk plasma, dat wil zeggen met antigene determinanten P^n, toonde aan dat het verkregen antiserum anti-K antiserum was.

Het verkregen serum werd op de geschikte verdunningen gebracht en gebruikt voor de immunologische bepalingen van antigene determinanten K aan menselijk plasma of andere biologische vloeistoffen of weefselextrakten.

Voorbeeld VII.

Het volgens het voorschrift van voorbeeld IV verkregen anti-K/P^k antiserum (0,1 ml) werd gedurende 24 uren bij 37°C geïncubeerd met een

oplossing van antigene determinanten P^n in PBS van 50 γ/ml, verkregen volgens het voorschrift van voorbeeld II (1,8 ml). Na incubatie werd het mengsel gecentrifugeerd (5000 x g x 15' bij 4°C).

Elke hoeveelheid van 0,1 ml van de bovenstaande vloeistof werd weer gedurende 24 uren bij 37°C opnieuw geïncubeerd met de oplossing van antigene determinanten P^n in PBS van 50 γ/ml (1,8 ml).

Na centrifugeren onder dezelfde omstandigheden, als hierboven zijn vermeld, werd de bovenstaande vloeistof op de geschikte verdunningen gebracht en gebruikt als het anti-K antiserum voor immunohistochemische bepalingen.

De anti-K immunologische activiteit van het antiserum werd gecontroleerd aan de hand van de capaciteit ervan op histologische preparaten adenocarcinoomcellen en geen normale cellen aan te tonen: voor de test werd de peroxidase-kleurmethode gevolgd, zoals wordt beschreven door Sternberger L.A. in Immunocytochemistry - 2e druk - John Wiley and Sons - New York, 1879.

Voorbeeld VIII.

BALB/c-muizen van 8 weken oud werden geïmmuniseerd door intraperitoneale injectie van een emulsie, verkregen door mengen van antigene determinanten K, bereid volgens het voorschrift van III (100 µg) met een gelijk volume van Freund's compleet adjuvans.

Na 30 dagen werden de injecties intraperitoneaal herhaald met geringere hoeveelheden antigene determinanten K. Controle van de immunologische respons werd bij de dieren uitgevoerd zoals wordt beschreven in voorbeeld IV.

Onder toepassing van dieren, die positief waren ten opzichte van de controle werd somatische hybridisatie uitgevoerd met murine-myelomacellen volgens het in Nature 256, 495-497, 1975 beschreven voorschrift uitgevoerd.

De specificiteit van de verkregen produkten werd onderzocht door de RIA-test door meting van de bindingscapaciteit van een ^{125}I-K antigeen.

De hybriden, die positief op de test reageerden, werden vervolgens geïsoleerd en gecloned.

Grote hoeveelheden anti-K monoclonaal antilichaam werden verkregen door intraperitoneale injectie in BALB/c-muizen van cellen, die het monoclonale anti-K antilichaam afscheidden.

De groei van de tumor tengevolge van de geïnjecteerde cellen vertoonde zich als de vorming van een ascitische vloeistof, die tot 20 mg/ml monoclonale anti-K antilichamen bevatte. Op analoge wijze, maar

830357

onder toepassing van antigene determinanten P^k of P^n in plaats van antigene determinanten K voor de immunisatie werden anti-P^k monoclonale antilichamen respectievelijk anti-P^n monoclonale antilichamen verkregen.

Voorbeeld IX.

Een oplossing van antigene determinanten K, bereid volgens het voorschrift van voorbeeld III, (10 µg) in PBS (20 µl) met een pH van 7,2 werd gedurende 5 minuten in een ijsbad behandeld met een oplossing van $Na^{125}I$ (1 mCi) in PBS (10 µl) en een oplossing (20 µl), die Chloramine-T in PBS in een concentratie van 0,5 mg/ml bevatte.

Vervolgens werden 20 µl van een oplossing, die natriummetabisulfiet in een concentratie van 2 mg/ml in PBS bevatte, en 20 µl van een oplossing, die kaliumjodide in een concentratie van 20 mg/ml PBS bevatte, aan het mengsel toegevoegd. Het reactieprodukt werd gezuiverd door HPLC teneinde vrij ^{125}I te verwijderen en zo werden met de radioisotoop ^{125}I gejodeerde antigene determinanten K (^{125}I-K) kwantitatief verkregen.

Volgens een analoog voorschrift werden met radioisotopen gejodeerde antigene determinanten P^k (^{125}I-P^k) en met radioisotopen gejodeerde antigene mengsels K/P^k (^{125}I-K/P^k) bereid.

Voorbeeld X.

Menselijke serummonsters van 335 in een ziekenhuis opgenomen patienten, die leden aan niet-neoplastische ziekten, werden onderzocht met behulp van het anti-K antiserum, verkregen in voorbeeld VI, onder toepassing van de reagentia en het analytische voorschrift, dat in het onderstaande wordt beschreven.

Reagentia.

(1) Referentiebuffer, die bevatte:
- fosfaatbuffer, 70 mmolair, pH 7,2;
- natriumchloride 70 mmolair;
- natriumazide 31 mmolair; en
- runderalbumine 0,4% (gewicht/volume).

(2) Anti-K antiserum, verkregen in voorbeeld VI, op geschikte wijze 1:50.000 verdund in:
- fosfaatbuffer 70 mmolair, pH 7,2;
- natriumchloride 70 mmolair;
- EDTA dinatriumzout 33 mmolair;
- natriumazide 31 mmolair; en
- normaal geiteserum 0,1% (volume/volume).

(3) Met radioisotoop gejodeerde merker, die ^{125}I-K/P^k antigeen

mengsel bevatte, dat zodanig in buffer (1) was verdund dat een concentratie van 1,5 ng/ml en een specifieke activiteit van 60 mCi/mg aanwezig was.

(4) Tweede antiserum: antiserum precipiterende geite-immunoglobulinen, afkomstig van konijnen en op geschikte wijze verdund in buffer (1).

(5) Negatieve controle: normaal menselijk plasma.

(6) Positieve controle: normaal menselijk plasma, waaraan een bekende hoeveelheid van K/P^k antigeen mengsel was toegevoegd.

Analytisch voorschrift.

	"Blanco"	Negatieve controle	Positieve controle	Monster
referentiebuffer (1)	0,5 ml	-	-	-
negatieve controle (5)	-	0,5 ml	-	-
positieve controle (6)	-	-	0,5 ml	-
monster	-	-	-	0,5 ml
anti-K antiserum (2)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
meng, incubeer 5 uren bij kamertemperatuur				
met radioisotoop gejodeerde merker (3)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
incubeer gedurende één nacht bij kamertemperatuur				
tweede antiserum (4)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
incubeer 1 uur bij kamertemperatuur, centrifugeer 30 minuten bij 4000 omwentelingen per minuut, schenk af en meet de radioactiviteit in het precipitaat met behulp van een gamma-teller.				

Berekening:

De P.I., waarin de radioactiviteit van het monster respectievelijk van de controle ten opzichte van de radioactiviteit van de "blanco" tot uitdrukking komt, werd op de volgende wijze berekend:

$$\text{P.I. (monster)} = 100 - \frac{\text{activiteit van het monster}}{\text{activiteit van de "blanco"}} \times 100$$

$$\text{P.I. (controle)} = 100 - \frac{\text{activiteit van de controle}}{\text{activiteit van de "blanco"}} \times 100$$

Een waarde van de P.I.-index hoger dan 15 werd beschouwd als indicatie voor de aanwezigheid van adenocarcinoom terwijl een waarde van de P.I.-index lager dan 15 werd beschouwd als een indicatie voor de afwezigheid van adenocarcinoom.

De bovengenoemde 335 monsters werden ook parallel onderzocht onder

8303571

toepassing van twee in de handel verkrijgbare samenstellen voor het opsporen van het menselijk CEA, namelijk de CEA Roche-test en de Liso-fase CEA Kit van Lepetit.

De verkregen resultaten worden samengevat in tabel A:

Tabel A

Aantal gevallen	Aandoeningen	Onjuiste positieve resultaten		
		Roche-test	Lepetit-test	test volgens de uitvinding
30	levercirrhosis	4 (13,3%)	3 (10%)	2 (6,6%)
17	pulmonale ontstekingsziekten	4 (23,5%)	4 (23,5%)	2 (11,7%)
18	obstructieve bronchopneumopathieën	3 (16,6%)	3 (16,6%)	1 (5,5%)
20	andere niet-neoplastische ziekten	4 (1,5%)	5 (1,8%)	1 (0,3%)
335	totaal	15 (4,5%)	15 (4,5%)	6 (1,8%)

Voorbeeld XI.

Menselijke serummonsters van 84 patiënten, die leden aan vastgestelde adenocarcinomen, werden parallel geanalyseerd onder toepassing van de reagentia en het analytische voorschrift, dat wordt beschreven in voorbeeld X, en onder toepassing van de twee in de handel verkrijgbare samenstelling, die worden genoemd in voorbeeld X.

De resultaten worden samengevat in tabel B:

Tabel B

Aantal gevallen	Aandoeningen	Onjuiste negatieve resultaten		
		Roche-test	Lepetit-test	test volgens de uitvinding
60	gastrointestinaal adenocarcinoom	5 (8,3%)	7 (11,6%)	2 (3,3%)
24	long-adenocarcinoom	2 (8,3%)	2 (8,3%)	0 (0%)
84	totaal	7 (8,3%)	9 (10,7%)	2 (2,4%)

Voorbeeld XII.

Dezelfde menselijke plasmamonsters van de voorbeelden 10 en 11 werden ook onderzocht onder toepassing van de reagentia en het alterna-

tieve analytische voorschrift, die in het onderstaande worden beschreven.

Reagentia.

(1) Anti-K antilichamen, verkregen volgens het in de voorbeelden V en VI beschreven voorschrift, geabsorbeerd aan polystyreenparels.

(2) Als verdunningsmiddel dienende buffer, die bevatte:
- fosfaatbuffer 70 mmolair, pH 7,2;
- natriumchloride 70 mmolair;
- natriumazide 31 mmolair; en
- runderalbumine 1% (gewicht/volume).

(3) Enzymatisch conjugaat, dat anti-K antilichamen zoals die van het boven aangegeven reagens (1), geconjugeerd met β-galactosidase (volgens het in FEBS Letters 95, 311, 1978 beschreven voorschrift) bevatte en op geschikte wijze was verdund in buffer (2).

(4) Enzymatisch substraat, dat bevatte:
- fosfaatbuffer 15 mmolair, pH 7,0; en
- o-nitrofenylgalactoside 2,3 mmolair.

(5) Blokkeermiddel: 1 M natriumcarbonaat.

(6) Negatieve controle: normaal menselijk plasma.

(7) Positieve controle: normaal menselijk plasma, waaraan een bekende hoeveelheid antigeen mengsel K/P^k was toegevoegd.

Analytisch voorschrift.

	"Blanco"	Negatieve controle	Positieve controle	Monster
als verdunningsmiddel dienende buffer (2)	0,2 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
negatieve controle (6)	-	0,1 ml	-	-
positieve controle (7)	-	-	0,1 ml	-
monster	-	-	-	0,1 ml
anti-K antilichamen (1)	1 parel	1 parel	1 parel	1 parel
incubeer onder schudden gedurende 5 uren bij kamertemperatuur.				
Doe de vloeistoffase weg. Was tweemaal met 2 ml zoutoplossing.				
enzymatisch conjugaat (3)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
incubeer onder schudden gedurende 2 uren bij kamertemperatuur.				
Doe de vloeistoffase weg. Was tweemaal met 2 ml zoutoplossing.				
enzymatisch substraat (4)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
incubeer gedurende 1 uur bij 37°C.				
blokkeermiddel (5)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
meet absorptie bij 420 nm met een spectrofotometer.				

Berekening.

De positiviteitsindex P.I. werd berekend aan de hand van de optische dichtheid (O.D.) van de "blanco" volgens de uitdrukking

$$P.I. = \frac{\text{O.D. van het monster}}{\text{O.D. van de "blanco"}}$$

Een waarde van de positiviteitsindex van meer dan 3 werd beschouwd als een indicatie voor de aanwezigheid van adenocarcinoom, terwijl een waarde van de positiviteitsindex van minder dan 3 werd beschouwd als een indicatie voor de afwezigheid van adenocarcinoom.

Er werden resultaten verkregen, die overeenkomen met die van de voorbeelden X en XI.

Voorbeeld XIII.

Met formaline gefixeerde en in paraffine ingesloten weefselcoupes van menselijk colon adenocarcinoom, menselijk mamma-adenocarcinoom en van beenmerg van patienten met borst-adenocarcinoom werden onderzocht onder toepassing van de reagentia en het analytische voorschrift, die hieronder worden aangegeven:

Reagentia.

(1) Wasbuffer, die bevatte:

8303371

- fosfaatbuffer 10 mmolair, pH 7,3; en
- natriumchloride 150 mmolair.

(2) Blokkerende buffer, die bevatte:
- fosfaatbuffer 10 mmolair, pH 7,3;
- natriumchloride 150 mmolair; en
- normaal ezelserum 3% (volume/volume).

(3) Enzymatisch conjugaat, dat bevatte anti-geit-immunoglobuline antilichamen, gevormd in ezels, gemerkt met β-galactosidase (volgens de in FEBS Letters 95, 311, 1978) beschreven methode en op geschikte wijze verdund in buffer (1).

(4) Enzymatisch substraat, dat bevatte:
- fosfaatbuffer 10 mmolair, pH 7,4;
- natriumchloride 10 mmolair;
- magnesiumchloride 1 mmolair;
- 5-broom-4-chloor-indolylgalactoside 1 mmolair;
- kaliumhexacyanoferraat(II) 6 mmolair; en
- kaliumhexacyanoferraat(III) 6 mmolair.

(5) Contrast-kleurmiddel, dat bevatte:
- aluminiumkaliumsulfaat; en
- carbaminezuur.

(6) Anti-K antilichamen, gevormd in geiten, verkregen volgens het voorschrift van voorbeeld VII en op geschikte wijze verdund in de bovenvermelde buffer (1).

Analytisch voorschrift.

De weefselcoupes werden ontdaan van paraffine in xyleen, in een ethanolreeks van 100 tot 50% en vervolgens in de wasbuffer (1). Elk reagens werd in een zodanige hoeveelheid toegevoegd dat het gehele weefseldeel bedekt was.

Blokkerende buffer (2).
Incubeer 20 minuten bij 37°C in een vochtige ruimte. Verwijder de overmaat reagens door schudden.
Voeg anti-K antilichamen (6) toe.
Incubeer 2 uren bij 37°C in een vochtige ruimte.
Voeg enzymatisch conjugaat (3) toe.
Incubeer 30 minuten bij 37°C in een vochtige ruimte. Was het weefseldeel gedurende 5 minuten met buffer (1).
Voeg enzymatisch substraat (4) toe.
Incubeer 30 minuten bij 37°C. Verwijder de overmaat reagens door wassen.

Voeg het contrast-kleurmiddel (5) toe.

Was na 1 minuut de weefselcoupe in stromend water en onderzoek met een lichtmicroscoop.

Anderzijds werd het bovenbeschreven analytische voorschrift uitgevoerd met incubaties gedurende één nacht bij kamertemperatuur in een vochtige ruimte, behalve voor de incubatie met het enzymatische substraat (4), die gedurende 1 uur bij kamertemperatuur in een vochtige ruimte werd uitgevoerd.

Steeds als alternatief in het bovenbeschreven voorschrift werden de weefselcoupes na de laatste wassing in stromend water en voor het onderzoek met de microscoop eerst geklaard door leiden door de wasbuffer (1), de ethanolreeks van 50 - 100% en xyleen en vervolgens geplaatst in Eukitt®.

Uit de microscopische analyse van de weefselcoupes bleek een intensief blauwe kleuring uitsluitend gelokaliseerd te zijn op het cytoplasma en de membranen van de tumorale cellen zonder enige positieve kleurreactie in de cellen van het aangrenzende normale weefsel, zoals bijvoorbeeld granulocyten. Deze resultaten bleken een scherpe tegenstelling te vormen met de resultaten, die werden verkregen bij analyse van dezelfde preparaten met behulp van de in de handel verkrijgbare samenstellen voor het histochemisch opsporen van het CEA-complex door middel van anti-CEA antilichamen, namelijk de DAKO PAP KIT en de IMMUNOLOK HISTOSET KIT.

De genoemde, in de handel verkrijgbare reagentia vertoonden in feite een zeer lage specificiteit doordat ze niet alleen de tumorcellen bleken te kleuren maar ook, in een verschillende mate, de normale weefselcellen, met een bijzonder aanzienlijke fout in het geval van de analyse van beenmergweefsels.

Hetzelfde voorschrift als boven werd gevolgd voor de analyse van bevroren weefselcoupes en er werden analoge resultaten verkregen.

Voorbeeld XIV.

Het doxorubicine werd geconjugeerd met de anti-K antilichamen volgens een covalente verbindingsmethode.

Een oplossing van doxorubicine (40 mg/ml) in met 0,015 M fosfaat gebufferde zoutoplossing van pH 7,2 werd gemengd met een geringe molaire overmaat 0,1 M $NaIO_4$ en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur in het donker geïncubeerd.

Aan het eind van de incubatie werd 1 M glycerol toegevoegd tot een uiteindelijke concentratie van 0,05 M.

De oplossing van geoxydeerd doxorubicine werd gemengd met 1 ml oplossing van anti-K antilichamen (20 mg/ml) in 0,15 M kaliumcarbonaatbuffer met een pH van 9,5 en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd.

Aan het eind van de incubatie werd $NaBH_4$ toegevoegd tot een uiteindelijke concentratie van 0,3 mg/ml en men liet de reactie gedurende 2 uren bij 37°C verlopen.

Aan het eind van de reactie werd het mengsel gechromatografeerd over een gel-filtratiekolom (15 x 1,5 cm) met Bio-gel® P 100, geëquilibreerd in PBS.

De frakties in het opgevangen volume bevatten het aan geneesmiddel gebonden antilichaam, dat vrij was van het niet-geconjugeerde geneesmiddel.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze, geschikt voor toepassing in de diagnostiek van menselijk adenocarcinoom door bepalen van aan adenocarcinoom gerelateerd antigeen materiaal in een van een menselijke patient genomen monster, met het kenmerk, dat men (a) anti-K antilichaam of (b) anti-P^k antilichaam gebruikt voor de bepaling van het materiaal in het monster dat (a') uitsluitend die antigene determinanten K, die specifiek zijn voor adenocarcinoom of (b') die antigene determinanten P^k, die geassocieerd zijn met de determinanten K op het adenocarcinoom, bevat.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men als monster een biologische vloeistof of weefselextrakt of -deel gebruikt.

3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat men de bepaling van antigene determinanten K respectievelijk P^k kwalitatief, kwantitatief of semi-kwantitatief uitvoert.

4. Werkwijze volgens conclusie 1 - 3, met het kenmerk, dat men monoclonale anti-K antilichamen of monoclonale anti-P^k antilichamen gebruikt.

5. Anti-K antilichamen, die specifiek zijn voor de antigene determinanten K.

6. Werkwijze voor de bereiding van de anti-K antilichamen volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat men antilichamen, die zijn geproduceerd met een mengsel van antigene determinanten K en P^k, absorbeert met antigene determinanten P^n of P^k teneinde de immunologische bindingsplaatsen P op deze antilichamen te verzadigen.

7. Werkwijze voor de bereiding van de anti-K antilichamen volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat men

1) dieren immuniseert met antigene determinanten P^n of P^k voor het vormen van anti-P^n of anti-P^k antilichamen;

2) een mengsel van antigene determinanten K en P^k zuivert met behulp van volgens 1) geproduceerde anti-P^n of anti-P^k antilichamen, waarbij antigene determinanten K worden verkregen; en

3) dieren immuniseert met volgens 2) verkregen antigene determinanten K.

8. Anti-P^k antilichamen, die specifiek zijn voor de antigene determinanten P^k.

9. Werkwijze voor de bereiding van de anti-P^k antilichamen volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat men dieren immuniseert met antigene determinanten P^k.

10. Anti-P^n antilichamen, die specifiek zijn voor de antigene determinanten P^n.

11. Werkwijze voor de bereiding van de anti-P^n antilichamen volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat men dieren immuniseert met antigene determinanten P^n.

12. Antigene determinanten K, die specifiek zijn voor menselijk adenocarcinoom.

13. Werkwijze voor de bereiding van de antigene determinanten K volgens conclusie 12, met het kenmerk, dat men een mengsel van antigene determinanten K en P^k zuivert met behulp van anti-P^n of anti-P^k antilichamen.

14. Antigene determinanten P^k, waarbij deze antigene determinanten P^k die antigene determinanten zijn, die geassocieerd zijn met de antigene determinanten K op het menselijk adenocarcinoom.

15. Werkwijze voor de bereiding van antigene determinanten P^k volgens conclusie 14, met het kenmerk, dat men een mengsel van antigene determinanten K en P^k zuivert met behulp van anti-P^n antilichamen.

16. Antigene determinanten P^n, waarbij deze antigene determinanten P^n die antigene determinanten zijn, die aanwezig zijn in normaal plasma of serum en kruisreactie vertonen met de antigene determinanten P^k.

17. Werkwijze voor de bereiding van de antigene determinanten P^n volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat men normaal plasma of serum extraheert en vervolgens zuivert door immunoaffiniteit met daarvoor specifieke antilichamen.

18. Monoclonale anti-K antilichamen, die specifiek zijn voor afzonderlijke antigene determinanten K.

19. Monoclonale anti-P^k antilichamen, die specifiek zijn voor afzonderlijke antigene determinanten P^k.

20. Monoclonale anti-P^n antilichamen, die specifiek zijn voor afzonderlijke antigene determinanten P^n.

21. Werkwijzen voor de bereiding van de monoclonale antilichamen volgens conclusie 18, 19 of 20, met het kenmerk, dat men de monoclonale antilichamen verkrijgt volgens de hybridomatechniek.

22. Reagenssysteem voor toepassing bij een methode voor de diagnose van menselijk adenocarcinoom volgens conclusie 1 - 4, gekenmerkt, doordat dit als wezenlijke component anti-K antilichamen bevat, die specifiek zijn voor de antigene determinanten K.

23. Reagenssysteem volgens conclusie 22, gekenmerkt, doordat dit monoclonale anti-K antilichamen bevat.

24. Reagenssysteem voor toepassing bij een methode voor de diagnose van menselijk adenocarcinoom volgens conclusie 1 - 4, gekenmerkt,

doordat dit als wezenlijke component anti-P^k antilichamen bevat, die specifiek zijn voor de antigene determinanten P^k.

25. Reagenssysteem volgens conclusie 24, gekenmerkt, doordat dit monoclonale anti-P^k antilichamen bevat.

26. Reagenssysteem voor toepassing bij een radioimmunotestmethode voor de diagnose van menselijk adenocarcinoom volgens conclusie 1 - 4, gekenmerkt, doordat dit in hoofdzaak bevat:

1) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichaam;

2) met radioïsotoop gemerkte antigene determinanten K respectievelijk P^k of, anderzijds een met radioisotoop gemerkt antigeen mengsel K/P^k;

3) controlemiddelen; en

4) buffers.

27. Reagenssysteem volgens conclusie 26, gekenmerkt, doordat dit als extra component een tweede antilichaam bevat, dat specifiek is voor de immunoglobulinen van de soort waarin het anti-K respectievelijk anti-P^k antilichaam van de component 1) is gevormd.

28. Reagenssysteem volgens conclusie 26 of 27, gekenmerkt, doordat de met radioisotoop gemerkte component 2) ^{125}I-K, ^{125}I-P^k of ^{125}I-K/P^k is.

29. Reagenssysteem voor toepassing bij een enzymimmunotestmethode voor de diagnose van menselijk adenocarcinoom volgens conclusie 1 - 4, gekenmerkt, doordat dit in hoofdzaak bevat:

1) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen, gebonden aan een vaste fase;

2) met enzym geconjugeerde anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen;

3) een enzymatisch substraat;

4) controlemiddelen; en

5) buffers.

30. Reagenssysteem volgens conclusie 29, gekenmerkt, doordat het enzym van de component 2) β-galactosidase is en de enzymatische substraatcomponent 3) o-nitro-fenyl-galactopyranoside omvat.

31. Reagenssysteem voor toepassing bij een immunohistochemische methode voor de diagnose van menselijk adenocarcinoom volgens conclusie 1 - 4, met het kenmerk, dat dit in hoofdzaak bevat

1) anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen;

2) met enzym gemerkte antilichamen, die specifiek zijn voor de immunoglobulinen van de soort, waarin de anti-K respectievelijk anti-P^k antilichamen van de component 1) zijn gevormd;

3) een enzymatisch substraat; en

4) buffers.

32. Reagenssysteem volgens conclusie 31, gekenmerkt, doordat het enzym van de component 2) β-galactosidase is en de enzymatische substraatcomponent 3) 5-broom-4-chloor-indolyl-galactoside omvat.

33. Gemerkte antigene determinanten K, P^k en P^n of gemerkte anti-K, anti-P^k en anti-P^n polyclonale of monoclonale antilichamen.

34. Gemerkte antigene determinanten of antilichamen volgens conclusie 33, gekenmerkt, doordat de antigene determinanten en antilichamen met radioisotopen gemerkt zijn.

35. Gemerkte antigene determinanten of antilichamen volgens conclusie 33, gekenmerkt, doordat de antigene determinanten en antilichamen met enzymen gemerkt zijn.

36. Polyclonale of monoclonale anti-K of anti-P^k antilichamen voor de toepassing als dragers van anti-tumorgeneesmiddelen of cytotoxische middelen in de therapie van menselijk adenocarcinoom.

37. Conjugaten van een polyclonaal of monoclonaal anti-K of anti-P^k antilichaam met een anti-tumorgeneesmiddel of een cytotoxisch middel.

38. Conjugaten volgens conclusie 37, gekenmerkt, doordat het anti-tumorgeneesmiddel daunorubicine, doxorubicine, epirubicine en/of methotrexaat is.

39. Conjugaten volgens conclusie 37, gekenmerkt, doordat het cytotoxische middel ricine is.

****