

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTSCHRIFT** A5

(11)

640 639

(21) Gesuchsnummer: 3731/78

(22) Anmeldungsdatum: 06.04.1978

(30) Priorität(en): 16.06.1977 JP 52-71349

(24) Patent erteilt: 13.01.1984

(45) Patentschrift
veröffentlicht: 13.01.1984(73) Inhaber:
Kabushiki Kaisha Saikin Kagaku Kenkyujo,
Sendai-shi/Miyagi-ken (JP)
Kabushiki Kaisha Kayaku Kosei Bushitsu
Kenkyujo, Toshima-ku/Tokyo-to (JP)(72) Erfinder:
Yoshiji Matsuda, Sendai-shi/Miyagi-ken (JP)
Keiji Tamura, Sendai-shi/Miyagi-ken (JP)
Hiroaki Motoki, Koganei-shi/Tokyo-to (JP)
Fumio Kitame, Sendai-shi/Miyagi-ken (JP)
Nakao Ishida, Sendai-shi/Miyagi-ken (JP)(74) Vertreter:
Bovard AG, Bern 25(54) **Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Immunerums.**

(57) Durch Ionenaustauschchromatographie von Serum, peritonealer oder thorakaler Flüssigkeit oder anderen Körperflüssigkeiten oder Flüssigkeiten, die von Plazenta des Menschen extrahiert wurden, wird ein saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 2,9 - 3,3 gewonnen. Das erhaltene Protein wird in nicht menschlichen Lebewesen immunisiert und dann in normalem, menschlichem Serum absorbiert. Das Immuneserum eignet sich zur Diagnose von Krebs durch quantitative Messung des IAP ohne komplexe chemische Analysen und aufwendige Instrumente und Einrichtungen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Immunsersums, dadurch gekennzeichnet, dass ein saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 2,9 bis 3,3, erhalten durch Ionenaustauschchromatographie von Serum, peritonealer oder thorakaler Flüssigkeit, Urin, anderen Körperflüssigkeiten oder Flüssigkeiten, die von Plazenta des Menschen extrahiert wurden, in nicht menschlichen Lebewesen immunisiert wird und dass dieses immunisierte Serum im normalen, menschlichen Serum absorbiert wird.

2. Spezifisches Immunsersum erhalten nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1.

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Immunsersums, das wirksam ist für die Diagnose von Krebs.

Bei den üblichen immunologischen oder chemischen Diagnosen von Krebs werden Serumproteine, Serumenzyme oder Hormone geprüft oder quantitativ bestimmt. Das Serum von Patienten, die unter Krebs leiden, weist im allgemeinen einen Gehalt oder eine steigende Menge von α_1 -Globulin, α_2 -Globulin und β -Globulin auf. Diese Globuline enthalten immunoregulatorisches α_2 -Globulin (IRA), Glycoprotein, α_1 -Fetoprotein, carcinoembryonales Antigen (CEA), α_2 -Macroglobulin und α_1 -Antitrypsin. Das Auftreten von α_1 -Fetoprotein und CEA im Serum ist besonders bemerkenswert. Das erstgenannte tritt in einer Menge von 50 bis 80% im Serum von Patienten auf, die unter idopathischem Leberkrebs leiden, während das letztgenannte in einer Menge von 70 bis 90% im Serum von Patienten auftritt, die unter colorektalen Carcinoma leiden.

Bei der 35. Generalversammlung der japanischen Krebsvereinigung (1976) berichteten MATSUDA et al., dass ein saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 2,9 bis 3,3 und einem Molekulargewicht von 59,000, das eine kleine Menge Zucker enthält, im Serum von peritonealen Flüssigkeiten von Patienten vorkommt, die unter Krebs des Magens, des Darms, der Blase und Lymphosarcoma leiden, und dass dieses Protein abgetrennt und gereinigt werden kann durch negative Ionenaustauschchromatographie und Dünnschicht-Gelenkelektrofokussieren. Da dieses Protein die Immunität hemmt, wird es auch «immunosuppressives, saures Protein» genannt und im folgenden bezeichnet als «IAP».

Es wurden daher ausgedehnte Studien und Experimente durchgeführt, um den quantitativen Anstieg von IAP und anderen Mitteln, die bei der Diagnose von Krebs verwendet werden, und die Bedingung des Patienten nach der Operation festzustellen. Hierbei wurde gefunden, dass ein Immunsersum oder Antiserum, das hergestellt wird indem IAP nicht menschlichen Lebewesen injiziert wird, mit IAP reagiert und eine antigen-antikörper Reaktion hervorruft. Auf diese Weise wurde eine quantitative Messung des IAP möglich ohne die Verwendung von komplexen chemischen Analysen und aufwendigen Instrumenten und Einrichtungen.

Physikalische und chemische Charakteristika von IAP

Das Ausgangsprodukt oder IAP wird hergestellt, indem ein Serum, eine peritoneale oder thoracale Flüssigkeit, Urin, andere Körperflüssigkeiten von Krebspatienten oder Flüssigkeiten, die von Plazenta von gesunden Menschen gewonnen werden, einer negativen Ionenaustauschchromatographie unterworfen und das Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 2,0 bis 3,3 gewonnen wird. Die auf diese Weise erhaltene Substanz hat die folgenden Eigenschaften:

1. Molekulargewicht: etwa 59000 (gemessen durch Elektrophorese mit 7,5%igem Polyacrylamid Gel enthaltend Natriumdodecylsulfat)

2. Aussehen: weisses Pulver

3. Löslichkeit: löslich in Wasser, in 0,01 M mit Phosphat gepufferter Salzlösung. Unlöslich in Methanol, Äthanol, Butanol, Aceton, Äthylacetat und Chloroform.

4. Isoelektrischer Punkt: pI 2,9 bis 3,3 (durch Dünnschicht Gel-Elektrofokussieren)

5. Aminosäurezusammensetzung: Hydrolyse von 1 mg der Substanz in 2 ml 6N Salzsäure bei 120 °C während 15 Stunden ergibt eine positive Reaktion mit Ninhydrin, wodurch die Anwesenheit von Aminosäuren angegeben wird.

6. Farbreaktionen: Positiv gegen die von Euler, Ehrlich, Biuret und Molisch Reaktionen, jedoch negativ gegenüber Ferrichlorid und Lieberman Reaktion.

7. Zersetzungspunkt: 265 °C

8. Infrarotabsorptionsspektrum (mit 0,5% KBr): siehe Figur 1

9. Ultravioletabsorptionsspektrum (gelöst in destilliertem Wasser auf 0,02%): siehe Figur 2.

10. Stabilität:

Bedingungen: 2 mg des sauren Proteins wurden in 10 ml mit Phosphat gepufferter Salzlösung (pH = 7,2) gelöst.

100 °C, 5 Minuten	inaktiviert
60 °C, 30 Minuten	inaktiviert
4 °C, 24 Stunden	stabil
18 ~ 20 °C, 2 Tage	stabil
- 20 °C, 7 Tage	stabil

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung eines spezifischen Immunsersums, dadurch gekennzeichnet, dass ein saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 2,9 bis 3,3, erhalten durch Ionenaustauschchromatographie von Serum, peritonealer oder thorakaler Flüssigkeit, Urin, anderen Körperflüssigkeiten oder Flüssigkeiten, die von Plazenta des Menschen extrahiert wurden, in nicht menschlichen Lebewesen immunisiert wird und dass dieses immunisierte Serum im normalen menschlichen Serum absorbiert wird.

Beispielsweise Herstellung des spezifischen Immunsersums (Anti-IAP-Serum)

Zur Durchführung der vorliegenden Erfindung wird das Serum, die peritoneale oder thorakale Flüssigkeit, Urin, oder andere Körperflüssigkeiten von Krebspatienten oder die Flüssigkeit, die aus dem Plazenta von gesunden Patienten extrahiert wird und die IAP oder gereinigtes IAP enthält, zugegeben zu «Freund's vollständigem Adjuvants» (ein Produkt der Firma Difco Co.), emulgiert und bei Tieren z.B. Kaninchen, Schafen, Pferden oder Kühen subkutan injiziert. Die Injektionen wurden in geeigneten Intervallen wiederholt und wenn die Antikörperkonzentration ein vorbestimmtes Niveau erreicht hat, den Tieren Blut abgezapft. Dieses Immunsersum wurde mit normalem menschlichen Serum oder in unlöslichem menschlichen Serum, hergestellt durch Behandlung von normalem menschlichen Serum mit Glutaraldehyd, adsorbiert, d.h. das Immunsersum wurde zu dem menschlichen Serum oder zu dem normalen unlöslichen menschlichen Serum zugegeben und 30 Minuten bis 2 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Das gebildete Sediment wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und die überstehende Flüssigkeit wurde zu derselben Menge von frischem normalen menschlichen Serum zugegeben und bei 4 °C über Nacht stehen gelassen. Das Sediment wurde wieder abgetrennt durch Zentrifugieren und die überstehende Lösung wurde als das gewünschte spezifische Immunsersum gewonnen.

Dieses Immunsersum wurde dann der Antigen-Antikörperreaktion mit IAP, extrahiert von Krebspatienten wie unten im Beispiel 1 beschrieben, unterworfen. Es wurden verschiedene Verfahren angewandt wie doppelte Immunodiffu-

sion, einfache Immunodiffusion, Immunelektrophorese, Antigen-Antikörper Kreuz-Immunelektrophorese, Antigen-Antikörper gegenläufige Immunelektrophorese, Rocket-Elektrophorese, sensitivierte Blutzellenagglutination, Radioimmuno Enzym-Immunität-Prüfung usw., um quantitative Messungen des IAP Gehalts im menschlichen Serum, in peritonealer oder thorakaler Flüssigkeit oder anderen Körperflüssigkeiten bei der Diagnose von Krebs durchzuführen.

Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die Beispiele in Verbindung mit den Zeichnungen im einzelnen beschrieben.

Figur 1 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum von IAP,

Figur 2 zeigt das Ultraviolett-Absorptionsspektrum von IAP und

Figur 3 zeigt das Verhältnis zwischen dem Durchmesser des Rings der Ausfällung und der Menge von IAP, wenn diese Menge IAP mit dem spezifischen Immunsérum, hergestellt nach dem erfindungsgemässen Verfahren, bestimmt wurde.

Beispiel 1

Extraktion und Reinigung von IAP 10 ml peritoneale Flüssigkeit, enthaltend IAP, extrahiert von einem Patienten, der unter Magenkrebs leidet, wurde auf einen pH-Wert von 5,5 mit Essigsäure eingestellt und in Diäthylaminoäthyl (DEAE) Zellulose (Produkt der Firma Watmann Co.), das mit 0,02 M Acetat Puffer auf ein pH von 5,5 eingestellt war, absorbiert. Die absorbierte peritoneale Flüssigkeit wurde gelöst in einem 0,02–0,5 Acetat Puffer und in 4 Teilen fraktioniert. Es wurde festgestellt, dass das saure Protein in der dritten Fraktion durch Dünnschicht Gel-Elektrofokussieren bei einem pH-Wert von 2,5–6,0 eluiert wurde. Da diese Fraktion andere Substanzen enthielt, wurde sie einer Dialyse in einem 0,02 M Acetat Puffer unterworfen und dann wieder in DEAE Cellulose, eingestellt auf einen pH-Wert von 5,1 mit 0,04 M Acetat Puffer absorbiert. Darauf wurde die absorbierte Substanz mit einem 0,04–0,4 M Acetat Puffer, pH-Wert 5,1 einer Ionengradientenchromatographie unterworfen und in drei Fraktionen getrennt. Das IAP konnte in der zweiten Fraktion durch Dünnschicht Gel-Elektrofokussieren eluiert werden. Es wurde ausgesalzen, gefroren und getrocknet. Es wurden 27,2 mg eines weissen IAP Pulvers erhalten.

Beispiel 2

Gemäss dem Verfahren von Beispiel 1 wurden 20 mg der dritten Fraktion, erhalten bei dem ersten chromatographischen Verfahren, einer isoelektrischen Kolonnenelektrophorese (pH-Wert 2,5–6,0) unterworfen, wobei IAP bei einem pH-Wert von 2,9–3,3 als einzige Substanz erhalten wurde. Diese Fraktion wurde dann zur Entfernung der Sucrose und des Ampholit-Trägers weiterer Dialyse unterworfen.

Es wurde dann gefroren und getrocknet. Es wurden 4 mg eines weissen gereinigten IAP Pulvers erhalten.

Beispiel 3

10 ml eines Serums von einem Menschen, der unter Magenkrebs leidet, wurde mit 50% Phosphat gepufferter Salzlösung und 4 ml der verdünnten Lösung in fünf Behälter gegossen. Es wurde soviel Ammoniumsulfat zugegeben, dass die Lösungen einen Sättigungsgrad von 30, 40, 50, 60 bzw. 70% aufweisen. Es wurde eine Stunde lang bei $10.000 \times g$ zentrifugiert. Die Pellets wurden in 5 ml einer 0,14 M phosphatgepufferten Salzlösung gelöst und einer Dialyse und Entsalzung unterworfen. Die überstehenden Lösungen wurden ebenfalls dialysiert mit der phosphatgepufferten Salzlösung und entsalzt. Die entsalzten Proben wurden einer Dünnschicht Gel-Elektrofokussierung unterworfen. Es wurde gefunden, dass das IAP mit einem isoelektrischen Punkt von 2,9–3,3 nicht ausgefällt wurde aus den Proben mit einem geringeren Sättigungs-

grad als 50% Ammoniumsulfat, während 100 mg bzw. 130 mg IAP erhalten wurden aus den Lösungen mit 60 bis 70% Sättigung an Ammoniumsulfat.

Beispiel 4

10 Plazentas von Menschen wurden fein verteilt und zu einer Lösung von 1 l 0,1 M Natriumchlorid zugefügt und eine kurze Zeit gemischt. Das extrahierte plazentale Blut wurde zentrifugiert und 2 l überstehende Lösung erhalten. Nach dem Verfahren von Beispiel 1 wurden 1,6 g IAP mit einem isoelektrischen Punkt von 2,9–3,3 erhalten.

Beispiel 5

1000 ml Urin, enthaltend IAP von einem Patient, der an Krebs leidet, wurde einer Dialyse mit destilliertem Wasser unterworfen, gefroren und getrocknet. Die gefrorene Substanz wurde fein verteilt und in 50 ml einer Phosphat gepufferten 1/15 M Salzlösung (pH-Wert 7,4) gelöst.

Die Lösung wurde in eine «Sephadex» G-75 (Produkt der Firma Pharmacia Co.) Kolonne gegeben, mit derselben Pufferlösung äquilibriert. Durch Dünnschicht Gel-Elektrofokussieren, pH-Wert 2,5–6,0, wurde gefunden, dass das IAP in der ersten Proteinfraction eluiert wurde. Diese Fraktion wurde an DEAE Cellulose, die mit 0,02 M Acetat-Puffer, pH-Wert 4,0, äquilibriert war, absorbiert und wurde in einer einstufigen Eluierung mit einem 0,02–0,4 M Acetat-Puffer, pH-Wert 4,0, extrahiert. Das IAP wurde konzentriert zwischen 0,2 bis 0,4 M Acetat-Puffer. Diese Fraktionen wurden entsalzt, eingefroren und getrocknet, wobei nach isoelektrischer Kolonnenelektrophorese, pH-Wert von 2,9–3,3, 10 mg gereinigtes IAP erhalten wurde.

Beispiel A

IAP, erhalten nach dem Verfahren von Beispiel 2, wurde mit Salzlösung in 4 mg/ml und 0,5 ml Portionen aufgeteilt, zu einer gleichen Menge von «Freund's vollständigem Adjuvants» zugefügt und emulgiert. Die Mischung wurde an verschiedenen Stellen des Rückens von Kaninchen mit einem Gewicht von 2 kg subkutan injiziert. Zwei Wochen später wurde 1 ml derselben emulgierten IAP Mischung injiziert und 2 Wochen danach wiederum dieselbe Menge. Zehn Tage nach der letzten Injektion wurde dem Kaninchen Blut abgenommen und das Serum abgetrennt und 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert. Zur Sterilisation der Probe wurde Natriumazid zugegeben, so dass eine Konzentration von 0,05% erhalten wurde. 1 ml des auf diese Weise hergestellten Immunsérum wurde zu normalem menschlichem, unlöslichem Serum zugegeben und zwei Stunden lang bei 37 °C gebrütet. Es wurde dann 30 Minuten lang bei 4 °C und 5000 min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde wieder zu derselben Menge des normalen unlöslichen menschlichen Serums zugegeben und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Dieses wurde wieder zentrifugiert, wobei das spezifische Immunsérum erhalten wurde.

Die spezifische Reaktion der IAP Antikörper in dem hergestellten Immunsérum wurde durch ein Verfahren mit doppelter Immunodiffusion (Microoucherlony) und durch Immunelektrophorese mit einem Antigen, das von einem Serum oder einer peritonealen Flüssigkeit eines Patienten, der an Krebs leidet, stammt, bestätigt. Ferner reagierte dieses Immunsérum nicht mit gesundem menschlichem Serum in demselben Test. Hierdurch wurde bestätigt, dass das Immunsérum keine andere Antikörper als IAP Antikörper enthält.

Beispiel B

Agargel (oder gereinigter Agar) wurde zu 1/15 M phosphatgepufferter Salzlösung (pH = 7,4) in der Weise zugegeben, dass die Konzentration 1,2% (1,0%) beträgt. Die Mi-

schung wurde erhitzt und in einen Behälter gegossen, so dass eine Gelschicht von 1,5 mm Dicke und mit einer glatten Oberfläche gebildet wurde. Hierin wurden Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm und 3 mm Abstand voneinander gebildet. Das erfindungsgemäss hergestellte Antiserum, das zu prüfende Serum und das Referenzserum, enthaltend IAP, wurden so eingebracht, dass sie die Löcher vollständig ausfüllten, und dann wurde 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Ausbildung von Fällungslinien zwischen dem Immuns serum und dem zu prüfenden Serum wurden kontrolliert und diejenigen, die derartige Linien aufwiesen, wurden als positiv für IAP bewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle I angegeben.

Tabelle I

Subjekt	Anzahl getestet	Anzahl der positiven Fälle
Gesunder Mensch	20	1
Darmkrebspatient	10	10
Magenkrebspatient	10	10
Lymphosarcomapatient	10	10

Beispiel C

Gereinigter Agar wurde zu 1/15 M phosphatgepufferter Salzlösung (pH = 7,4) zur Herstellung eines 1%igen Gels zugefügt. Die Mischung wurde bei 55 °C geschmolzen und das ⁵ Immuns erum wurde bis zu einer Konzentration von 3% zugefügt. Die Mischung wurde in der Weise in einen Behälter gegossen, dass sich eine Gelschicht mit einer glatten Oberfläche und einer Dicke von 1,0 bis 1,5 mm bildete. Es wurden Löcher hergestellt wie in Beispiel 2 beschrieben und IAP Referenzlösungen verdünnt auf 1/1, 1/4 und 1/16 und eine Probe ¹⁰ (jeweils genau 5 µl) in die Löcher eingebracht und 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Durchmesser der Ringe der Ausfällung wurde wie in Figur 3 angegeben, gemessen. Es wurde bestätigt, dass die Menge des IAP eine ¹⁵ Funktion des Durchmessers der Ringe oder der Banden der Ausfällung ist.

20

Fig. 1

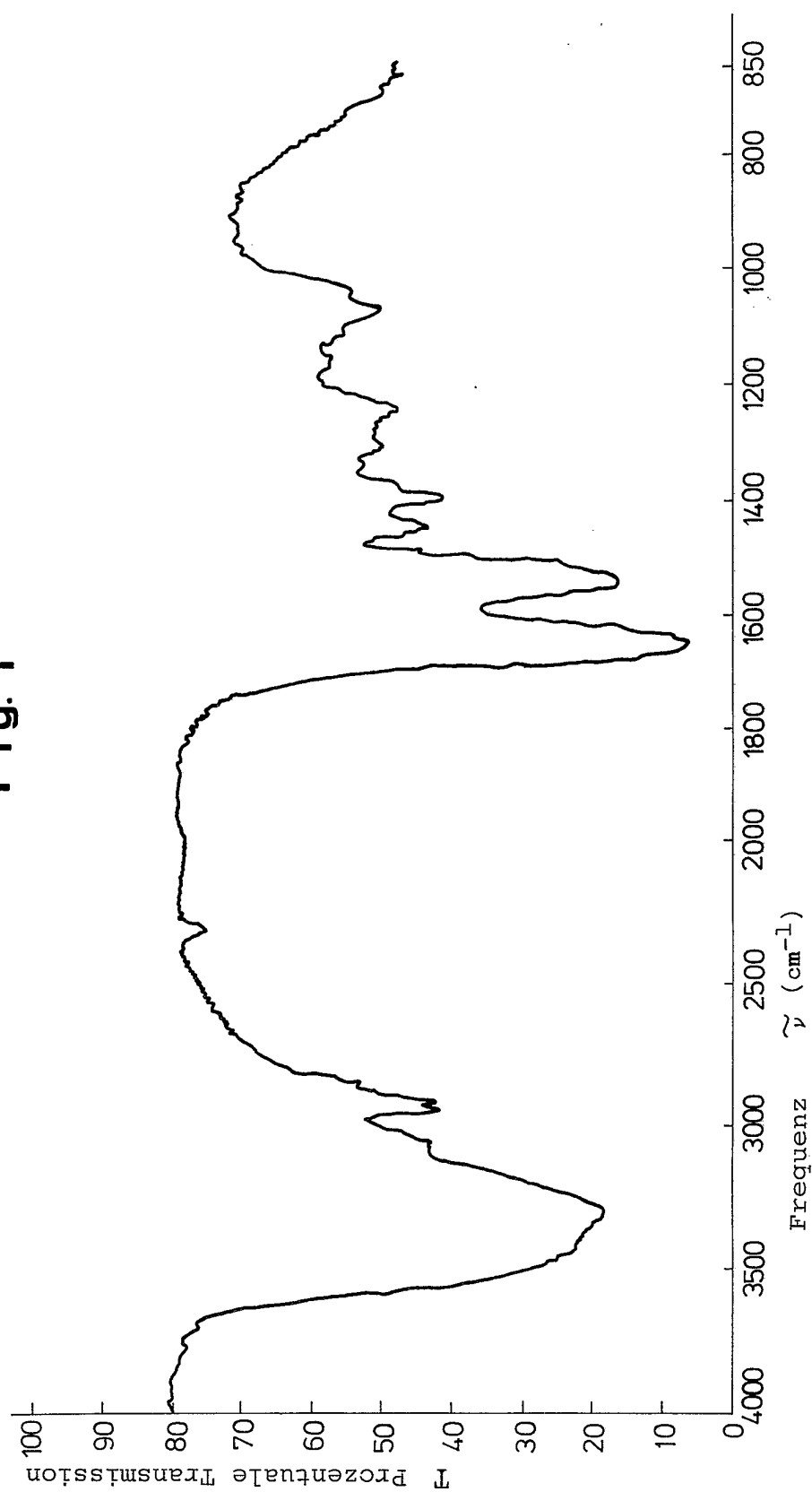


Fig. 2

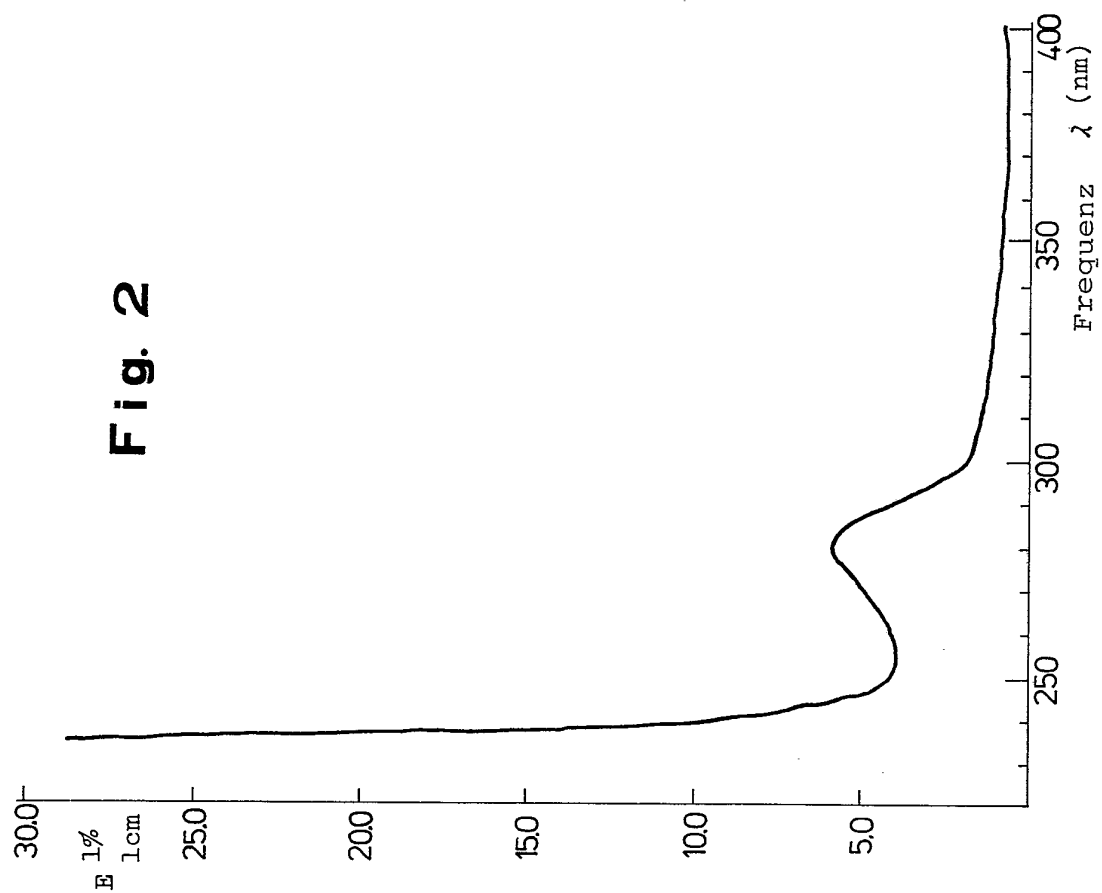


Fig. 3

