

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 801078 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 801078

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
G01N 33/50

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 03.04.1980

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 03.04.1980

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 01.01.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

10.04.1979 US 028,732

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Bristol-Myers Co, 345 Park Avenue, New York, N.Y. 10022, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Crooke, Stanley T., TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Galvan, Louis, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Diagnostinen menetelmä.

Diagnostiskt förfarande.

Diagnostinen menetelmä

Tämä keksintö kohdistuu diagnostiseen menetelmään, jolla voidaan todeta pahanlaatuisia kasvaimia.

5 Uusia syövän toteamismenetelmiä tarvitaan nykyään ilmeisen selvästi.

Monissa tapauksissa havaittaessa syöpä kyllin varhaisessa vaiheessa mahdollisuudet taudin täydelliseen parantamiseen lisääntyisivät huomattavasti.

10 Kirjallisuuden mukaan on aikaisemminkin yritetty määrittää kasvaimille spesifisiä komponentteja, kuten hormoneja ja antigeenejä syöpäpotilaiden verestä. Yritykset ovat kuitenkin suurimmaksi osaksi epäonnistuneet, ja siten käytännöllinen ei-invasiivinen diagnostinen menetelmä, joka perustuisi kasvaimelle spesifisen seerumikomponentin pitoisuuteen, on jäänyt toistaiseksi tavoittamattomaksi päämääräksi.

Äskettäin on löydetty DNA:han sitoutuvia proteiineja sellaistaisten potilaiden seerumista, joilla on neoplasias, 20 systeeminen lupus erythematosus tai muita tulehdustauteja (katso esim. FEBS Letters 92 (2) (1978) 211...213, Europ. J. Biochem. 71 (1976) 1...8, Amer. J. Med. 65 (1978) 437...445). Näissä julkaisuissa ei kuitenkaan ole esitetty mitään tällaisten seerumiproteiinien sopivaa määritysmenetelmää, joka olisi välttämätön käytännöllistä diagnostista 25 menetelmää varten. Sitä paitsi aikaisemmissa julkaisuissa kuvatut seerumiproteiinit eivät ole osoittautuneet kyllin selektiivisiksi, jotta niitä voitaisiin käyttää syövän toteamiseen.

30 Esillä olevassa keksinnössä käytetty inhibiittori-seerumiproteiini on kuvattu yhteenvedossa The Pharmacologists (Abs.) 20 (3) (1978) 238. Yhteenvedossa ei kuitenkaan ole millään tavalla mainittu, että proteiinia esiintyisi eri pitoisuuksina syöpäpotilailla kuin potilailla, 35 joilla syöpää ei ole.

Esillä oleva keksintö kohdistuu yleisesti käyttökelpoiseen diagnostiseen testimenetelmään, jolla voidaan todeta pahanlaatuisia kasvaimia ihmisistä. Tarkemmin sanottuna keksintö kohdistuu diagnostiseen menetelmään, jolla voidaan todeta pahanlaatuisia kasvaimia määrittämällä ihmisseeruminäytteistä spesifinen DNA:han sitoutuva proteiini. Menetelmällä voidaan todeta pahanlaatuinen kasvain varhaisessa vaiheessa, ja sitä voidaan käyttää syöpäpotilasta hoidettaessa taudin kulun seuraamiseen.

Esillä oleva menetelmä perustuu siihen havaintoon, että tietty DNA:n sitoutuva proteiini (nimitetään tästä lähtien inhibiittoriproteiini X:ksi) esiintyy huomattavasti pienempinä pitoisuuksina syöpäpotilaiden seerumissa kuin potilailla, joissa syöpää ei ole. Nyt on kehitetty herkkä menetelmä tämän proteiinin määrittämiseksi, joten esillä olevan keksinnön avulla syöpä pystytään toteamaan nopeasti, ei-invasiivisesti ja tarkasti.

Tietty DNA:han sitoutuva proteiini löydettiin ihmisseerumista tutkittaessa bleomysiinin indusoimaa PM-2-DNA:n hajaantumista (Pseudomonas-bakteriofagi, joka on kovalenttisesti sitoutunut rengasmaiseen DNA:han). Havaittiin, että ihmisseerumi pystyi estämään tämän hajoamisen, jolloin alettiin puolestaan tutkia inhibiittimekanismia ja inhibiittoriyhdiste yritettiin identifioida.

Oletamus, jonka mukaan seerumiproteiini estäisi PM-2-DNA:n hajoamisen, saatiin vahvistetuksi pronaasikäsittelyllä, jolloin inhibiittoriaktiivisuus hävisi. Käsittely DNA-aasi I:llä tai haiman RNA-aasilla ei vaikuttanut seerumin inhiboivaan aktiivisuuteen. Koirien tai vasikoiden seerumi ei vaikuttanut inhiboivasti, eikä myöskään ihmisen albumiini eikä immunoglobuliinit.

Inhibiittoriproteiini puhdistettiin ei-denaturoivissa olosuhteissa käyttämällä molekyyli-suodattimia, dialyysia ja Sephadex-pylväskromatografiaa. Proteiini saa-

tiin puhdistetuksi huomattavasti paremmin sitomalla proteiini DNA:han, eristämällä DNA:n ja proteiinin muodostama k9mpleksi vapaasta proteiinista ja sen jälkeen hajottamalla DNA:n ja proteiinin muodostama kompleksiksi ureakäsittelyllä. Käyttämällä puhdistukseen SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesia ja isoelektristä fokuointia puhdistustuloksen on arveltu olevan yli 2000-kertainen. Isoelektroforeesilla on todettu, että inhibiittori on proteiini, jonka molekyylipaino on noin 64 000 daltonia ja jonka pI on 5,9. Tälle proteiinille on tässä yhteydessä annettu nimi inhibiittoriproteiini X.

Inhibiittoriproteiini X:n inhiboiva vaikutus perustuu siihen, että se sitoutuu DNA:han. Inhibiittoriproteiinin sitoutuminen DNA:han on todettu agarosigeelielektroforeesilla, eristämällä DNA:n ja proteiinin muodostama kompleksiksi, fluoresenssitutkimuksilla ja sitoutumisessa muodostuvalla kaksivärisellä kehäkuviolla.

Tutkittaessa inhibiittoriproteiini X:n ominaisuuksia havaittiin yllättäen, että syöpäpotilaiden seerumissa tämän proteiinin pitoisuus oli huomattavasti erilainen kuin sellaisten potilaiden seerumissa, jotka eivät sairastaneet syöpää. Tämän havainnon pohjalta alettiin kehittää herkkää ja nopeaa menetelmää, jolla inhibiittoriproteiini X voitaisiin määrittää ihmisseerumista.

PM-2-DNA:ta on aikaisemmin käytetty bleomysiinin biokemiallisen aktiivisuuden spektrofotofluorometriseen määrittelyyn (Cancer Res. 38 (1978) 3322...3326). Bleomysiinin toimintamekanismi näyttää liittyvän sen kykyyn hajottaa DNA:ta, jolloin bleomysiiniaktiivisuus voidaan määrittää tutkimalla fluoresenssispektrometrian avulla, kuinka paljon bleomysiinin indusoima etidiumbromidin (2,7-diamino-10-etyyli-9-fenyyli-fenantridiniumbromidin) sitoutuminen PM-2-DNA:n vähenee.

Kuten edellä on mainittu, inhibiittoriproteiini X:n on havaittu toimivan bleomysiinin indusoiman PM-2-DNA:n hajoituksen inhibiittorina. Täten fluorometristä määrittä-

tä, jota aikaisemmin on käytetty bleomysiiniaktiivisuuden määrittämiseen, voidaan käyttää myös inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuden määrittämiseen ihmisseerumista. Inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuden perusteella voidaan sitten arvioida syövän todennäköisyys tutkittavassa potilaassa.

Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän avulla voidaan täten todeta syöpä ihmisistä; menetelmään kuuluu seuraavat vaiheet:

- 10 a) potilaasta, jonka epäillään sairastavan syöpää, otetaan verinäyte,
- b) näytteestä määritetään inhibiittoriproteiini X:n pitoisuus, ja
- c) verrataan vaiheesta (b) saatua pitoisuutta normaaliin inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuteen (määritetty selllaisten potilaiden seerumista, jotka eivät sairasta syöpää), jolloin inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuden ollessa huomattavasti pienempi kuin normaalipitoisuus syövän todennäköisyys on suuri.
- 20 Menetelmä, jota vaiheessa (b) käytetään seerumin inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuden määrittämiseen, ei sinänsä ole ratkaiseva; ja täten keksintö laajimmassa merkityksessään kohdistuu siihen havaintoon, että inhibiittoriproteiini X:n pitoisuutta (voidaan määrittää millä tahansa menetelmällä) voidaan käyttää diagnostisena välikappaleena mitä erilaisimpien ihmisen syöpälaatuja toteamiseen.

Eräs määrittämenetelmä, joka on havaittu edulliseksi, on PM-2-DNA:n fluoresenssimäärittäminen (Canser Res. 38 (1976) 3322...3326). Tämän määrittämenetelmän käyttö perustuu inhibiittoriproteiini X:n inhiboivaan vaikutukseen hyvin tunnettuun bleomysiinin indusoimaan PM-2-DNA:n hajoitusreaktioon. Tätä määrittämenetelmää käytettäessä inhibiittoriproteiini X:n pitoisuus ilmaistaan tarkoituksenmukaisesti IC_{50} -arvona, jolloin IC_{50} määritellään sellaiseksi inhibiittoriproteiini X:n pitoisuudeksi, joka tarvitaan inhiboimaan 50-%:sti bleomysiinin indusoima PM-2-DNA:n

hajoitus. Tätä IC_{50} -arvoa voidaan sitten verrata normaaliin IC_{50} -arvoon (määritetty sellaisten potilaiden seerumista, jotka eivät sairasta syöpää), jolloin IC_{50} -arvon ollessa huomattavasti suurempi kuin normaali IC_{50} -arvo syövän todennäköisyys on suuri.

PM-2-DNA:n fluoresenssimäärittäminen inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuden selville saamiseksi esitetään yksityiskohtaisesti seuraavassa:

Aluksi potilaasta otettu seeruminäyte (esim. 50 μ l) sekoitetaan puskuriliuokseen (pH 9,5), joka sisältää bleomysiiniä, PM-2-DNA:ta ja 2-merkapttoetanolia. Tavallisesti 50 μ l:n seeruminäyte sekoitetaan 450 μ l:aan liuosta, joka sisältää 35 nM bleomysiiniä, 8,3 μ M PM-2-DNA:ta ja 25 mM 2-merkapttoetanolia natriumboraattipuskurissa, jonka pH on 9,5 (0,015 -m NaCl:0,05 -m natriumboraatti).

Seosta inkuboidaan sen jälkeen 37°C:ssa 30 minuuttia.

Seuraavaksi valmistetaan etidiumbromidiliuos denaturointipuskuriin, jonka pH on 12,1, lisäämällä 0,1 ml etidiumbromidiliuosta (22 μ g etidiumbromidia yhtä ml:aa kohti denaturointipuskuria, jonka pH on 12,1) 0,9 ml:aan denaturointipuskuria (pH 12,1). Sopiva denaturointipuskuri sisältää seuraavia aineita seuraavissa moolisuhteissa: 0,09 moolia Na_3PO_4 :0,01 moolia EDTA:0,01 moolia NaCl (pH säädetty arvoon 12,1 0,15-m NaOH:lla). 1 ml:aan tätä etidiumbromidiliuosta lisätään näyte (esim. 100 μ l) edellä valmistettua inkuboitua seerumiseosta.

Etidiumbromidi/PM-2-DNA-seoksen fluoresenssi mitataan spektrofotofluorometrillä (herätyskohta 530 nm ja emission mittaus 590 nm:n kohdalta). Etidiumbromidin sitoutuminen PM-2-DNA:han aiheuttaa taustaa suuremman fluoresenssin, jolloin määritettäessä fluoresenssin muutos nollakokeeseen verrattuna (muuten samanlainen kuin tutkittava näyte, paitsi että se ei sisällä bleomysiiniä) saadaan selville bleomysiinin indusoiman PM-2-DNA:n hajoamisaste. Fluoresenssiarvoista voidaan helposti määrittää seerumissa olevan inhibiittoriproteiini X:n aiheuttama PM-2-DNA:n hajoamisen prosentuaalinen inhibointi.

Seuraavaksi määritetään seeruminäytteestä inhibiittoriproteiini X:n pitoisuus tavanomaisella Lowryn menetelmällä (foliininifenolireagenssi) julkaisussa J.Biol. Chem. 193 (1951) 265...275 kuvatulla tavalla.

5 Esittämällä tulokset graafisesti x-y-koorinaatistossa, jossa toisena koordinaattina on PM-2-DNA:n hajotamisen prosentuaalinen inhibiointi ja toisena inhibiittoriproteiini X:n pitoisuuden logaritmi, tietyn seeruminäytteen IC_{50} -arvo saadaan helposti määritetyksi.

10 Kun tietyn potilaan seerumista IC_{50} -arvo on määritetty, tätä arvoa voidaan käyttää sellaisenaan arvioitaessa syövän todennäköisyys kyseisessä potilaassa. Laajat tutkimukset terveillä potilailla (joilla syöpää ei ole) ja toisaalta potilailla, joilla on hyvin erilaisia pahanlaatu-
15 laatuksia kasvaimia, ovat osoittaneet, että inhibiittoriproteiini X:ää on löydetty huomattavasti pienempinä pitoisuuksina syöpää sairastavien potilaiden seerumista. Siitä johtuen syöpäpotilaiden IC_{50} -arvon on havaittu olevan huomattavasti suurempi kuin terveiden yksilöiden
20 normaalin IC_{50} -arvon. Tähän IC_{50} -arvon selvään eroavuuteen pohjautuen syöpä voidaan todeta yksinkertaisella ja tarkalla menetelmällä, ja tähän esillä oleva keksintö olennaisesti perustuu.

Terveiden yksilöiden verinäytteistä määritetty tarkka
25 IC_{50} -arvo vaihtelee jonkin verran eri yksilöillä. Tähänastisissa tutkimuksissa terveiden yksilöiden keskimääräiseksi IC_{50} -arvoksi on saatu $90,2 \pm 11,0$ $\mu\text{g/ml}$ (merkitsevyytaso 0,001). Korkein terveestä yksilöstä määritetty IC_{50} -arvo on ollut 120 $\mu\text{g/ml}$.

30 Syöpäpotilailla IC_{50} -arvot vaihtelivat syöpäläadun mukaan, mutta toistaiseksi arvo on ollut kaikissa tapauksissa huomattavasti korkeampi kuin terveillä yksilöillä. Alhaisin syöpäpotilaasta määritetty IC_{50} -arvo on

ollut toistaiseksi 270 $\mu\text{g/ml}$. Yleisesti ottaen kuitenkin IC_{50} -arvon ollessa korkeampi kuin noin 200 on hyvin todennäköistä, että potilaalla on jonkintyyppinen pahanlaatuinen kasvain.

5 Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää on käytetty menestyksellisesti hyvin erilaisten syöpälaatuojen toteamiseen, ja sen uskotaan täten soveltuvan yleisesti syövän diagnoosiin. Todetuista kasvaintyypeistä voidaan mainita esimerkkeinä eturauhassyöpä, imukudoskasvain,
 10 leukemia, rintarauhassyöpä, keuhkojen pienten solujen rauhassyöpä, keuhkojen suurten solujen rauhassyöpä, paksusuolen rauhassyöpä ja melanooma. Menetelmä näyttää myös olevan spesifinen syövän diagnoosiin, sillä potilailla, joilla syövän sijasta on muita sairauksia, ei ole havaittu
 15 syöväälle tunnusomaisia kohonneita IC_{50} -arvoja.

Edellä kuvattu esillä olevan keksinnön mukaisen inhibiittoriproteiini X:n fluoresenssimääritys perustuu tälle yhdisteelle spesifiseen ominaisuuteen: kykyyn inhiboida bleomysiinin indusoima PM-2-DNA:n hajoitus. Tällä
 20 menetelmällä määritettyjen seerumin proteiinipitoisuuksien perusteella on arvioitu pahanlaatuisen kasvaimen todennäköisyys. Kun puhdistettua inhibiittoriproteiini X:ää on saatavissa, sen määrittämiseen voidaan käyttää myös monia muita biokemian ja kliinisen kemian tunnettuja menetelmiä. Näistä tärkeimpiä ovat immunologiset menetelmät,
 25 kuten radioimmunomääritys, fluoroimmunomääritys, entsyymi-immunomääritys (esim. ELISA), spinimmunomääritys, kemiluminesenssiin perustuva immunomääritys, fluoresenssipolarisaatioon perustuva immunomääritys, lisäksi nefelometrinen määritys, geelidiffuusiomenetelmät ja klassiset menetelmät, kuten hemagglutinaatioon ja komplementin kiinnitykseen perustuvat menetelmät. Lisäksi muita inhibiittoriproteiini X:n toiminnallisia ominaisuuksia voidaan
 30 käyttää hyväksi määritettäessä proteiinia biologisista nesteistä. Molekyylin katalyyttisiä ominaisuuksia voidaan käyttää hyväksi spektrofotometrisissa tai spektrofluorometrisissa kineettisissä tai reaktion päätepidettä mitta-

vissa määrityksissä. Lisäksi kyseistä nestettä voidaan fraktioida eri tavoin, minkä jälkeen proteiini voidaan määrittää eri menetelmillä, esimerkiksi spektraalisesti tai densitome-¹risesti ja immunologisesti. Koska edellä
 5 mainituilla menetelmillä inhibiittoriproteiini X voidaan spesifisesti määrittää, näillä menetelmillä määritettyjen seerumin proteiinipitoisuuksien perusteella voidaan määritellä pahanlaatuisen kasvaimen todennäköisyys.

Inhibiittoriproteiini X puhdistettiin seuraavilla
 10 menetelmillä:

Osittainen puhdistus - menetelmä A

Inhibiittoriproteiini X puhdistettiin osittain Sephadex-pylväskromatografialla. Ihmisseerumia (1 ml) lisättiin Sephadex G-75-pylvääseen (88 cm x 2 cm), ja
 15 seerumi eluointiin natriumfosfaattipuskurilla (0,07-m, pH 6,8) huoneen lämpötilassa eluointinopeuden ollessa 6...8 ml/h. Inhibiittori sisältyi välisijatilavuuteen, ja tämä fraktio lyofilisoitiin, suspendoitiin uudelleen 1 ml:aan vettä, ja suspensiota dialysoitiin 24 tunnin
 20 ajan 4°C:ssa käyttäen 20-kertaista määrää vettä, ja sen jälkeen dialyysituote kaadettiin Sephadex G-2-0-pylvääseen, joka oli tasapainotettu samalla puskurilla.

Analysoitaessa Sephadex G-200-pylväästä saadut eluointituotteet havaittiin kolme piikkiä, jotka absorboivat 280 nm:n kohdalla. Piikin III aiheuttanut fraktio, joka muodosti 7,7 % eluoidusta kokonaisproteiinimäärästä, sisälsi inhibiittoriproteiini X:n. Tämä käsiteltiin edellä kuvatulla tavalla ja kaadettiin sitten uudelleen Sephadex G-200-pylvääseen. Eluointi suoritettiin edellä mainitulla fosfaattipuskurilla. Fraktiot
 30 (3 ml) kustakin pylväästä kerättiin fraktionkerääjällä (Gilson Medical Electronics, Inc., Middleton, Wis), ja eluointituotteet analysoitiin mittaamalla absorbanssi spektrofotometrillä 280 nm:n kohdalta. Proteiinipitoisuudet määritettiin Lowryn menetelmällä.
 35

Puhdistus - menetelmä B

Inhibiittoriproteiinin puhdistus suoritettiin käyttämällä molekyylisuodatusta Amicon-suodattimilla sekä käyttämällä dialyysia ja Sephadex-geelipylväskromatografiaa. Ihmisseeruminäytteitä (1...5 ml) sentrifugoi-
 5 tiin kartionmuotoisissa Amicon-suodatinputkissa (Amicon, Lexington, Mass.) kierrosnopeudella 5000 g 10 minuutin ajan 4°C:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen suodatinkartioon jäänyt aines suspendoitiin uudelleen deionisoituun veteen
 10 siten, että suspension tilavuus oli sama kuin alkuperäisen seeruminäytteen. Suodatinkartioon jääneestä aineesta ja suodoksesta otettiin näytteet, joiden inhibiittoriaktiivisuus määritettiin. Suodatinkartioon jäänyt aines, joka osoittautui aktiiviseksi, dialysoitiin selluloosa-
 15 putkessa käyttäen 20-kertaista määrää deionisoitua vettä 4°C:ssa 24 tunnin ajan. Suodatinkartioon jäänyt aines ja dialyssaatti lyofilisoitiin ja suspendoitiin uudelleen deionisoituun veteen. Näistä kahdesta fraktiosta se näyte, joka oli otettu suodatinkartioon jääneestä aineesta, oli
 20 inhibitoorisesti aktiivinen. Suodatinkartioon jäänyt aines (1 ml) kaadettiin Sephadex G-50-pylvääseen ja eluoi- tiin natriumfosfaattipuskurilla (0,07-m, pH 6,8) 4°C:ssa eluointinopeuden ollessa 30 ml/h. Eluaatti (5 ml yhtä putkea kohti) kerättiin Buchler Fractomette Alpha 200-
 25 fraktionkerääjällä (Searle, Fort Lee, N.J.). Kustakin fraktiosta mitattiin absorbanssi 280 nm:n kohdalta spektrofotometrillä, ja fraktiot yhdistettiin absorptiohuippujen mukaan. Yhdistetyt fraktiot lyofilisoitiin ja dialysoitiin, ja niiden inhibiittoriaktiivisuus määritettiin kuten edel-
 30 lä. Aktiivinen välisijatilavuusfraktiossa oleva materiaali kaadettiin Sephadex G-75-pylvääseen ja Sephadex G-100 pylvääseen ja eluoi- tiin samalla tavalla G-50-pylvääseen. Inhi- biittoriaktiivisuutta havaittiin molempien pylväiden väli- sijatilavuus fraktioista. Aktiivinen materiaali, joka oli
 35 kerätty Sephadex G-200-pylvään välisijatilavuus fraktioon, eluoi- tiin natriumfosfaattipuskurilla (0,07-m, pH 6,8) huo- neen lämpötilassa eluointinopeuden ollessa 6...8 ml/h. Frak- tiot kerättiin (3 ml yhtä putkea kohti) Gilson-mikrofrak-

tionkerääjällä (Gilson, Middleton, Wis.). Eluaattifraktioista yhdistettiin ne fraktiot, jotka kuuluivat samaan 280 nm:n kohdalla absorboivaan absorptiohuippuun. Näin saadut yhdistetyt fraktiot lyofilisoitiin ja dialysoitiin, ja niiden inhibiittoriaktiivisuus määritettiin kuten edellä. Inhibiittoriaktiivisuutta löydettiin fraktiosta III. Fraktioon III kuuluva aine kaadettiin uudelleen Sephadex-G-200-pylvääseen ja eluoiitiin samoissa olosuhteissa. Sephadex G-200-pylväästä saatu inhibiittoriproteiini X:n sisältävä fraktio III oli paremmin kuin 1000-kertaisesti puhdistettu.

PM-2-DNA:n fluoresenssimääritysmenetelmä inhibiittoriproteiini X:n määrittämiseksi kuvataan yksityiskohdaisemmin seuraavassa:

15 Inhibiittoriproteiini X:n pitoisuutta kuvaavan
IC₅₀-arvon määrittäminen

Inhibiittoriproteiini X:n pitoisuutta kuvataan IC₅₀-arvon (proteiinin pitoisuus, joka vaaditaan estämään 50-%:sesti PM-2-DNA:n hajoaminen) määrittäminen ihmisseerumista suoritetaan kahdessa vaiheessa:

1) Seerumin proteiinipitoisuus määritetään Lowryn menetelmällä.

2) Käytetään PM-2-DNA:n fluoresenssimääritystä bleomysiinille, jolloin saadaan seerumiproteiini-inhibiittorin annoksesta riippuva käyrä. IC₅₀-arvot määritetään graafisesta kuvaajasta, joka on saatu esittämällä toisella akselilla DNA:n hajoamisen prosentuaalinen inhibiointi ja toisella proteiinipitoisuuden logaritmi.

Menetelmät:

30 1) Lowryn reaktio.

A. Varastoliuosten valmistus:

Liuos A. 2 % Na₂CO₃ 0,1-n NaOH:ssa.

Liuos B. 1-% CuSO₄·5H₂O:n vesiliuos.

Liuos C. 2-% Na,K-tartraatin vesiliuos.

35 Liuos D. 2-n Folin-Ciocalteu-fenoli-reagenssi.

B. Reagenssiliuosten valmistus

- Reagenssiliuos 1: Sekoitetaan 1 tilavuusosa
varastoliuosta B yhteen ti-
lavuusosaan varastoliuosta C.
- 5 Reagenssiliuos 2: Sekoitetaan 50 tilavuusosaa
varastoliuosta A yhteen tila-
vuusosaan reagenssiliuosta 1.
- Reagenssiliuos 3: Sekoitetaan yksi tilavuusosa
varastoliuosta D yhteen tila-
vuusosaan vettä.
- 10

C. Reaktiot:

- 1) Laimennetaan seerumi suhteessa 1:10 vedellä.
- 2) Siirretään 10 μ l laimennettua seerumia lasiseen
koeputkeen (13 x 100 mm) ja lisätään 290 μ l vettä.
- 15 3) Lisätään 1 ml reagenssiliuosta 2, sekoitetaan
hyvin ja inkuboidaan seosta 10 minuuttia huoneen lämpö-
tilassa.
- 4) Lisätään 100 μ l reagenssiliuosta 3, sekoitetaan
hyvin, ja inkuboidaan seosta 30 minuuttia huoneen lämpö-
20 tilassa.
- 5) Määritetään spektrofotometrillä absorbanssi 750
nm:n kohdalta.
- 6) Määritetään proteiinipitoisuus BSA-vertailukäy-
rältä.

25 D. Härän seerumin albumiinin (BSA) vertailukäyrä.

- 1) Valmistetaan BSA:n sarjalaimennukset (esim. 25,
50, 75, 100 ja 150 μ g/ml) lopullisen tilavuuden ollessa
0,3 ml.
- 2) Suoritetaan vaiheessa C mainitut reaktiot alkaen
30 kohdasta 3 (lisätään reagenssiliuosta 2).
- 3) Esitetään absorbanssi 750 nm:n kohdalta BSA-pi-
toisuuksien funktiona.

II. Inhibiittoriproteiinin määrittäminen

A. Suoritetaan seerumiproteiinin sarjalaimennukset Lowryn reaktiolla määritettyjen seerumiproteiinipitoisuuksien perusteella. Laimennukset tehdään vakiotilavuuteen natriumboraattipuskuria (0,05-m, pH 9,5).

B. Lisätään seerumiproteiininäytteet (tilavuus 50 μ l) lasisessa koeputkessa (13 x 100 mm) olevaan 10 μ l:n tilavuuteen bleomysiiniä (34,5 nanomoolia).

C. Lisätään 390 μ l natriumboraattipuskuria (0,05-m, pH 9,5), joka sisältää 25 millimoolia 2-merkapttoetanolia.

D. Lisätään 50 μ l PM-2-DNA:ta ($8,3 \times 10^{-6}$ -m 0,15-m NaCl-liuoksessa).

E. Inkuboidaan 30 minuuttia 37°C:ssa.

F. Siirretään kolme rinnakkaisnäytettä (100 μ l) lasisiin koeputkiin (13 x 100 mm), joissa on 0,9 ml Na_3PO_4 (0,09-m, pH 12,1), joka sisältää 0,01-m EDTA ja 0,01-m NaCl. Sekoitetaan hyvin.

G. Lisätään 100 μ l etidiumbromidia ($55,7 \times 10^{-6}$ -m) Na_3PO_4 -puskurissa (pH 12,1). Sekoitetaan hyvin.

H. Nollakokeet:

1) Natriumboraattiliuos (0,5-m, pH 9,5), joka sisältää 2-merkapttoetanolia, mutta ei bleomysiiniä eikä proteiineja.

2) Proteiini ilman bleomysiiniä ja PM-2-DNA:ta.

3) Proteiini ilman bleomysiiniä.

4) Natriumboraattiliuos (0,05-m, pH 9,5), joka sisältää 2-merkapttoetanolia, nollanäytteenä.

I. Spektrofotofluorometria (Aminco-Bowman)

Siirretään näyte 1 cm:n kvartsikyvetiin ja mitataan fluoresenssi herätyskohdan ollessa 530 nm ja emissio-

Patentkrav

1. Sätt att påvisa cancer hos människa, k ä n n e t e c k -
n a t d ä r a v , a t t m a n

- (a) avdrar ett blodprov från en patient som skall undersökas med avseende på cancer;
- (b) bestämmer koncentrationen av inhibitorprotein X i provet; och
- (c) jämför den i steg (b) uppmätta koncentrationen med den normala koncentration av inhibitorprotein X som är associerad med serum från cancerfria patienter, varvid en signifikant minskning av koncentrationen av inhibitorprotein X i förhållande till den normala koncentrationen anger möjligheten till cancer.

2. Sätt att påvisa cancer hos människa enligt krav 1, k ä n -
n e t e c k n a t d ä r a v , a t t m a n

- (a) avdrar ett blodprov från en patient som skall undersökas med avseende på cancer;
- (b) bestämmer den koncentration av inhibitorprotein X i provet som krävs för att inhibera 50% av bleomycininducerad nedbrytning av PM-2 DNA; och
- (c) jämför det i steg (b) uppmätta IC_{50} -värdet med det normala IC_{50} -värde som är associerat med serum från cancerfria patienter, varvid en signifikant förhöjning av IC_{50} -värdet jämfört med normalvärdet anger möjligheten till cancer.

3. Sätt enligt krav 2, k ä n n e t e c k n a t d ä r a v , a t t b e -
s t ä m m i n g e n a v IC_{50} -värdet i steg (b) utförs genom att man

- (1) framställer en blandning av blodprovet med en lösning av bleomycin, PM-2 DNA och 2-merkaptoetanol i en buffert med pH 9,5;

- (2) inkuberar blandningen från steg (1) 30 minuter vid en temperatur av 37°C;
- (3) sätter en alikvot av blandningen från steg (2) till en blandning av etidiumbromid i en denatureringsbuffert med pH 12,1;
- (4) bestämmer fluorescensen hos blandningen av etidiumbromid och PM-2 DNA från steg (3) med en spektrofotofluorometer vid 530 nm excitation och 590 nm emission;
- (5) bestämmer den procentuella inhiberingen av bleomycininducerad nedbrytning av PM-2 DNA med ledning av ändringen i fluorescens hos provet jämfört med ett kontrollprov, som icke innehåller något bleomycin;
- (6) bestämmer koncentrationen av inhibitorprotein X medelst Lowry-metoden; och
- (7) med ledning av de i stegen (5) och (6) erhållna värdena fastställer den koncentration av inhibitorprotein X som krävs för att inhibera 50% bleomycin-inducerad nedbrytning av PM-2 DNA.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

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

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

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

THE PHARMACOLOGIST (+ BS.) 20 (3)
1978 s. 338 (KPL 2 LAUSE 1)

FEB'S LETTERS 72 (2) 1978 s. 211 - 213

Piia Kallio

Allekirjoitus: