



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**  
**UTLÄGNINGSSKRIFT** 77895

C (45) Patent No. 8203041-2  
Patent No. 8203041-2

(51) Kv.lk./Int.Cl.<sup>4</sup> C 12 Q 1/48, G 01 N 33/53

## SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	840134
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.01.84
(23) Alkuperä - Giltighetsdag	10.05.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	13.01.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.89
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/SE83/00190
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	14.05.82
Ruotsi-Sverige(SE) 8203041-2	

(71)(72) Jan-Simon Gronowitz, Pettbols skola, Pl 2670, Hargshamn,  
Clas Fredrik Runesson Källander, Vallby Husbyborg, Uppsala,  
Ruotsi-Sverige(SE)

(74) Papula Rein Lahtela Oy

(54) Menetelmä deoksitymidinikinaasi-isoentsyymiaktiivisuuden määrittämiseksi ja sen käyttämiseksi sairauksien diagnoosissa - Förfarande för bestämning av deoxithymidinkinas-isoentsymaktivitet och dess användning för diagnosis av sjukdomar

(57) TIIVISTELMÄ

Menetelmä määrittää dTk-isoentsyymitasoja ihmisen tai eläimen ruumisnesteestä tai solunäytteestä, jolloin mainittu näyte saatetaan reagoimaan substraatin kanssa mainittua isoentsyymiä varten fosfaatin luovuttajan ja puskurijärjestelmän läsnäollessa ja fosforyloidun muodostuneen tuotteen määrä mitataan, joka määrä on suhteessa mainittuun isoentsyymitasoon. Menetelmälle on tunnusomaista se, että käytetään yhdistelmää, johon kuuluu (a) puskurijärjestelmä pH:ssa välillä 5-9 ja konsentraatio on ei enemmän kuin 250 mM, (b) substraatti muodostuu 2'-deoksi-5-halouridinista, josta osa on radiomerkitty 5-halogenilla, ja joka on läsnä konsentraatiossa välillä  $2 \times 10^{-9}$  -  $5 \times 10^{-6}$  M, ja (c) fosfaatin luovuttaja on läsnä konsentraatiossa ei yli 20 mM. Menetelmän herkkyys sallii pienien dTk-määrien mittauksen, ja menetelmää voidaan käyttää esim. tautien diagnoosiin, ennustamiseen ja tarkkailuun johtuen muuttuneesta ATP:n välittämästä dTk-aktiivisuudesta, kuten syöpälajeja, kasvaimia ja tiettyjä virusinfektioita varten tai muuttunutta CTP:n välittämää dTk-aktiivisuutta varten, kuten HSV tyyppi 1, tyyppi 2 ja VZV infektioita varten.

## (57) SAMMANDRAG

En metod att bestämma dTk-isoenzymnivåer i en kroppsvätska eller cellprov hos människa eller djur, vilket omfattar stegen att låta provet reagera med ett substrat för nämnda isoenzym i närvaro av en fosfatgivare och ett buffertsystem och mäta mängden fosforylerad produkt som bildats, vilken mängd är proportionell mot nämnda isoenzymnivå. Metoden kännetecknas av att man i kombination använder

- a) ett buffertsystem vid ett pH från 5 till 9 och som är närvarande i en koncentration av högst 250 mM,
- b) ett substrat bestående 2'-deoxi-5-halouridin, av vilket en del har en radiomärkt 5-halogen, och som är närvarande i en koncentration från  $2 \times 10^{-9}$  -  $5 \times 10^{-6}$  M, och
- c) fosfatgivaren är närvarande i en koncentration, som inte överstiger 20 mM.

Metodens känslighet medger mätning av mycket små dTk-mängder, och metoden kan användas för t.ex. diagnos, prognos och övervakning av sjukdomar inbegripande förändrad ATP-medierad dTk-aktivitet, såsom cancrar, tumörer och vissa virusinfektioner, eller förändrad CTP-medierad dTk-aktivitet såsom HSV typ 1, typ 2 och VZV-infektioner.

MENETELMÄ DEOKSITYMIDINIKINAASI-ISOENTSYYMIAKTIIVISUUDEN  
MÄÄRÄÄMISEKSI JA SEN KÄYTTÄMISEKSI SAIRAUKSIEN DIAGNOO-  
SISSA - FÖRFARANDE FÖR BESTÄMNING AV DEOXITHYMidINKI-  
NAS-ISOENTSYMAKTIVITET OCH DESS ANVÄNDNING FÖR DIAGNOSIS  
5 AV SJUKDOMAR

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää iso-  
entsyymi-dTk:n (deoksitymidiinikinaasi) määrittämiseksi  
ihmisen tai eläimen kehonesteestä tai solunäytteistä.  
10 Edelleen keksintö koskee mainitun menetelmän käyttöä  
sairauksien diagnoosissa ja ennustamisessa, joissa  
vallitsee ATP (adenosiinitrifosfaatti) välitteinen  
dTk-aktiivisuus, kuten syövä, kasvaimet ja tietyt  
virusinfektiot samaten kuin sairaudet, joita karakteri-  
15 soi CTP (sytidiinitrifosfaatti) välitteinen dTk-aktiivi-  
suus, kuten HSV (Herpes Simplex Virus) tyyppi 1- ja  
tyyppi 2- sekä VZV (Varicella Zoster Virus)-infektiot.  
Keksintö koskee myös mainitun menetelmän käyttöä dTk-  
isoentsyymien tyyppityksessä.

20 Deoksitymidiinikinaasientsyymi (dTk) tarjoaa  
eukaryoottisolulle deoksitymidiinin (dT) hyväksikäyttö-  
keinon, mikä dT ei ole välituote tymidylaattisynteesissä  
de novo. dTk:a pidetään hyödyllisenä entsyyminä, sillä  
se tuo dT:ta DNA-metabolismiin. Koska pääosa imettäväi-  
25 sen solussa olevasta dTk-muodosta esiintyy vain solun  
jakautumisen aikana, dTk:ta on nimitetty puhdistavaksi  
entsyymiksi.

Kolmea erilaista sellulaarista isoentsyymiä  
ihmisen soluissa on kuvattu. Sytosolaarinen dTk, kutsu-  
30 taan dTk-F, joka esiintyy optimaalisin määrin solujen  
jakaantuessa (vaiheet G1-S) (Bello, Exptl. Cell. Res.  
89:263, 1974; Littlefield, Biochim. Biophys. Acta.  
115:398, 1966) ja on enemmän tai vähemmän poissa lepo-  
vaiheessa olevista soluista. Ihmisessä tätä entsyymiä  
35 koodaa 17. kromosomi lähellä galaktokinaasin paikkaa.  
Toinen sellulaarinen isoentsyymi on mitokondriaalinen,  
jota nimitetään dTk-A:ksi ja joka esiintyy mitokondriaa-

limatriisissa. Tämän dTk:n aktiivisuus on suhteellisen vakio eri soluvaiheiden aikana (Adelstein et al; Develop. Biol. 26:537, 1971), ja dTk-A:ta koodaa 16. kromosomi. Kolmas dTk, vähemmän aktiivinen dTk-B, on mainittu vain jatkuvissa solulinjoissa HeLa ja KB, ja sen sanotaan olevan rajoittunut mitokondriaalikalvon sisäpuolelle (Kit'n katsaus, Pharmacol. Ther. 4:501, 1979).

Nämä kolme solun sisäistä dTk:ta eroaa toisistaan biokemiallisten ominaisuuksien osalta. dTk-F ja dTk-B, jotka ovat melko samankaltaisia, eroavat toisistaan sijaintinsa lisäksi isoelektrisen fokusoinnin osalta, jolloin niillä on erilaiset pI:t, sekä elektroforeettisen liikkuvuuden osalta. Päinvastoin kuin dTk-F ja dTk-B, dTk-A hyväksyy sytidiinitrifosfaatin (CTP) fosfaatin luovuttajana eikä ole yhtä herkkä kuin muut dTTP-feedbackinhititille (deoksitymidiinitrifosfaatti-feedbackinhitio). dTk-A myös fosforyloi deoksitytidiiniä (dC), ja sitä inhiboi dCTP (Kit'n katsaus, Pharmacol. Ther. 4:501, 1979).

Virusten suhteen spesifisiä isoentsyymejä, joita virusgenomi koodaa, on osoitettu olevan solussa Herpes-ryhmän ja Pox-ryhmän virusinfektioinnin jälkeen. Entsymaattisesti ihmisen viruksille spesifiset dTk:t muistuttavat dTk-A:ta, paitsi rokotteen dTk, mikä ei voi käyttää CTP:a fosfaatin luovuttajana eikä voi myöskään fosforyloida deoksisytidiiniä. Tämä dTk erotetaan helposti ihmissolun dTk:sta elektroforeesin avulla (Kit et al., Progr. Med. Virol. 21:13, Karger Basel 1975). Sekä HSV-dTk:t että VZV-dTk omaavat laajemman spektrin mahdollisia fosfaatin luovuttajia ja ne hyväksyvät erilaisia pyrimidiinejä sekä pyrimidiinianalogeja substraattina (Cheng et al, Biochim. Biophys. Acta. 452:370, 1976, ja J. Virol. 31:172, 1979). dTk-isoentsyymien välitteinen dT:n muuttuminen dTmp:ksi (deoksitymidinimonofosfaatti) kompetitiivisella blokkauksella, jonka aiheuttaa dT-analoginen 2'-deoksi-5-jodouridiini (IUdR), on tunnettu kauan. Radiomerkityn IUdR:n käyttö

suoraan substraattina suuren tarkkuuden aikaansaamiseksi virus-dTk:ien analyysissä osoitettiin hakijan taholta (Gronowitz et Källander, *Infec. Immun.* 29:425, 1980).

5 Kuten mainittiin dTk-F:n esiintyminen soluissa liittyy solujen jakaantumiseen, ja se on enemmän tai vähemmän poissa erilaistuneista soluista (Munch-Petersen et Tyrsted, *Biochim. Biophys.* 478:364, 1977). dTk-aktiivisuustutkimukset istutettavissa hiirikasvaimissa ovat paljastaneet korkeita dTk-aktiivisuuksia korreloiden 10 kasvunopeuden kanssa (Bresnick et al, *Cancer Res.* 29:1969, and *Cancer Res.* 31:743, 1971). Viimeiset raportit ovat osoittaneet lisääntyntä dTk-F:a periferaalisissa veren lymfosyyteissä eräillä potilailla, jotka 15 kärsivät pahanlaatuisesta non-Hodgkin's lymfoomasta ja lymfaattisesta leukemiasta (Ellins et al, *Cancer Res.* 41:691 ja *Brit. J. Haematol.* 49:479, 1981). Nämä tutkimukset ovat myös osoittaneet kohonneita seerumin dTk:n tasoja eräillä potilailla non-Hodgkin'in ryhmästä (Ellins et al *Blood* 59:926, 1981). Seurauksena tavanomaisesta käytetystä dTk-analyysistä, jossa käytetään 20  $^3\text{H}$ -dT:a korkeassa konsentraatiossa ( $5 \times 10^{-6}\text{M}$ ), dTk-aktiivisuutta voitiin havaita vain harvoissa potilaissa, joilla oli pitkälle edistynyt sairaus. Edelleen dTk-aktiivisuutta voitiin arvioida prognostisena merkinä 25 vain mikäli erotusanalyysi koskien dTk-F:a ja dTk-A:a suoritettiin.

Tavanomaisesti dTk-aktiivisuus on mitattu täten seuraamalla joko  $^3\text{H}$ - tai  $^{14}\text{C}$ -merkityn dT:n muuttumista dT<sub>mp</sub>:ksi ATP:n ollessa fosfaatin luovuttajana.

30 Hakijat ovat viime aikoina suunnitelleet parannetun dTk-analyysijärjestelmän viruksien dTk-isoentsyymeille, jossa käytetään  $^{125}\text{I}$ -jododeoksiuridiinia (IUdR) substraattina. Saavutettu parantunut tarkkuus salli dTk:n havainnoimisen niin pienestä määrästä kuin 25 HSV-infektoituneesta solusta. Päinvastoin konventionaalinen analyysi, joka perustuu  $^3\text{H}$ -dT:n käyttöön, käytettynä 35 tavallisesti konsentraatiossa  $10^{-5}\text{M}$ , edellyttää ainakin

450 kertaa enemmän entsyymejä. Kuitenkin, vaikka tämä parannettu analyysijärjestelmä olikin hyödyllinen viruksien dTk:ien tutkimuksissa, se ei ollut sopiva pitkäaikaisiin solujen dTk-F:n analyysihin, osittain johtuen tämän entsyymin epästabiilisuudesta. Tämän menetelmän epästabiilisuus seerumin pienien dTk:n määrien havainnoimiseksi havaitaan helposti tutkimuksista, jotka koskivat virus dTk:n salpaavia vasta-aineita (dTk-ab). Näissä tutkimuksissa enemmän kuin 275 ihmisen verinäytettä analysoitiin dTk-ab:n suhteen, mutta häiriintyneitä seerumin dTk-aktiivisuuksia todettiin vain kahdessa tapauksessa (Gronowitz et Källander, *Infec. Immun.* 29:425, 1980; Gronowitz et Källander, *J. Med. Virol* 8:177, 1981; Källander et al, *Infec. Immun.* 36:30, 1982).

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin diagnoosimenetelmä tiettyjä virusinfektioita ja pahanlaatuisia kasvaimia varten sekä pahanlaatuisten kasvannaisten tarkasteluun eri tarkoituksia varten.

Keksinnön tarkoituksena on edelleen tuoda esiin herkkä analyysijärjestelmä, jolla voidaan tutkia ihmis- ja eläinruumiin nesteissä ja solunäytteissä olevia pieniä dTk-määriä, esim. seerumissa, rakkoeritteissä, selkäydinnesteessä, rakkulanesteessä ja sentapaisissa kliinisisissä näytteissä, joka järjestelmä on myös suunniteltu minimoimaan solun sisältämä dTk-A:n vaikutus.

Edelleen keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin menetelmä dTk-F:n analysoimiseksi ja kasvaintautien ennustamiseksi ja tautien muutosten tutkimiseksi sekä uudelleen sairastuneiden tutkimiseksi.

Edelleen keksinnön tarkoituksena on käyttää mainittua analyysimenetelmää arvioitaessa etäispesäkkeitä keuhkosyövän yhteydessä.

Edelleen keksinnön tarkoituksena on käyttää mainittua analyysimenetelmää leukemian yhteydessä määrittämään, mittaamalla selkäydinnesteessä läsnäoleva

dTk, esiintyykö etäispesäkkeitä aivoselkäydinjärjestelmässä.

5 Vielä eräänä keksinnön tarkoituksena on käyttää mainittua menetelmää ryhmäspesifisenä merkinä tiettyjä infektioita varten virussairauksien yhteydessä.

Vielä eräänä keksinnön tarkoituksena on käyttää mainitun analyysimenetelmän modifikaatiota esim. seerumissa tai rakkulanesteessä läsnäolevan herpes-viruksen spesifisen dTk:n tutkimukseen.

10 Yllämainittuja ja muita keksinnön tarkoituksia selostetaan yksityiskohtaisesti seuraavassa keksinnön mukaisen analyysimenetelmän ja sen sovellutuksien kuvauksessa.

15 Keksintö tuo täten esille parannetun analyysijärjestelmän dTk-tasojen mittaamiseksi, erityisesti dTk-F-tasojen mittaamiseksi esim. seerumissa. Tämä analyysijärjestelmä on huomattavasti herkempi kuin aiemmat järjestelmät, ja on todettu, että herkkyys on niin korkea, että on mahdollista käyttää käytännössä  
20 hyvin yksinkertaista analyysijärjestelmää, ei ainoastaan patologisten dTk-tasojen määrittämiseen, vaan myös normaalien tasojen määrittämiseen terveillä yksilöillä (vrt. kuvia 1 ja 6). Tämän analyysijärjestelmän ei todettu ainoastaan olevan hyvin herkkä ja toistettava dTk-F  
25 määrittäminen antaen lineaarisia muutosnopeuksia yli kahden tunnin ajan, vaan sen todettiin antavan myös 2 - 6 kertaa korkeampia nopeuksia kuin aiemmat järjestelmät virus-dTk:ien määrittämiseksi. Toinen tärkeä etu, verrattuna tavanomaiseen analyysijärjestelmään on dTk-A:n  
30 suhteellisen alhainen muutosnopeus tämän isoentsyymin vaikuttaessa minimaalisesti mitattaessa dTk-F:a tai virus-dTk:a puhdistamattomista näytteistä.

Tämän analyysijärjestelmän muuntelu, käyttäen  
35 CTP:a ATP:n sijasta fosfaatin luovuttajana todettiin hyödylliseksi spesifisessä herpesvirusindusoidussa dTk:n määrittämisessä silloin, kun analysoitavia näytteitä esi-inkuboitettiin anti-herpesvirus-dTk:ta salpaavalla

seerumilla.

Tässä kuvatut edut ja odottamattomat tekniset vaikutukset saavutetaan keksinnön mukaan käyttäen yhdistelmää, jossa on alhaisessa konsentraatiossa ja alhaisen ionisen voiman omaavaa puskuriliuosta, spesifisen tyypistä radiomerkittyä substraattia, mikä on läsnä alhaisessa konsentraatiossa, ja alhaisella konsentraatiolla olevaa fosfaatin luovuttajaa.

Laajimmassa sovellutuksessaan keksintö koskee menetelmää määrätä dTk-isoentsyymitasoja ihmis- tai eläinruumiin nesteestä tai solunäytteestä, jolloin mainittu näyte saatetaan reagoimaan substraatin kanssa mainittua isoentsyymiä varten fosfaatin luovuttajan ja puskurijärjestelmän läsnäollessa, ja jolloin muodostuneen fosforyloidun tuotteen määrä mitataan mainitun määrän ollessa suhteessa mainittuun isoentsyymitasoon. Keksinnön mukaan mainittu menetelmä on tunnusomainen siitä, että menetelmässä käytetään yhdistelmää

- a) puskurisysteemi, jonka pH on välillä 5 - 9 ja joka on läsnä konsentraatiossa vähemmän kuin 250 mM,
- b) substraatti sisältäen 2'-deoksi-5-halouridiinia, josta osa on radiomerkittyä 5-halogeeniä, ja on läsnä konsentraatiossa  $2 \times 10^{-9}$  -  $5 \times 10^{-6}$ M ja
- c) fosfaatin luovuttaja, joka on läsnä konsentraatiossa ei yli 20 mM.

Päinvastoin kuin aiemmin kuvatut analyysimenetelmät, joissa käytetään  $^{125}\text{I}$ -IUdR:a substraattina, keksinnön mukainen menetelmä antaa substraatin lineaarisen muutosnopeuden solun dTk-F:lle yli kahdeksi tunniksi, ja herkkyys parantui merkittävästi, kuten voidaan nähdä kuvasta 1. Tämä kuva on keksinnön mukaisen analyysimenetelmän (-o-o-o) ja mainitun aiemman analyysimenetelmän (- $\Delta$  - $\Delta$  - $\Delta$ ) vertailu (Gronowitz and Källander, *Infec. Immun.* 29:425, 1980). A = 2 seerumia sisältäen ihmisen dTk-F, joka on peräisin leukemiapotilailta. B = HSV tyyppi 2 dTk alkuperältään soluviljelmästä. Läsnäoleva kokonaismäärä  $^{125}\text{I}$ -IUdR oli  $550 \times 10^3$  cpm.

Piirustuksissa:

5 Kuvat 1A ja B ovat diagrammeja esittäen entsyymiaktiivisuutta piirrettynä ajan mukana ja valaisten keksinnön mukaisen menetelmän olennaisesti parantunutta herkkyyttä verrattuna lähimpään tekniikan tasoon.

Kuvat 2A ja B valaisevat - tlc-käyrien avulla - radiokemiallisen puhtauden vähentymistä keksinnön mukaisessa ensisijaisessa substraatissa,  $^{125}\text{I}$ -IUdR, varastossa.

10 Kuva 3 on diagrammi valaisten entsyymiaktiivisuuden laskentaa yksiköissä käytettäessä sisäistä substraatin vertailunäytettä.

Kuva 4 on diagrammi valaisten estymisvaikutusta korkeissa seerumikonsentraatioissa dTk-mittauksissa.

15 Kuva 5 valaisee - diagrammin avulla - virus-dTk:n tyyppitystä erilaisissa kliinisisissä näytteissä.

Kuva 6 on diagrammi valaisten normaalia dTk-aktiivisuuden jakaumaa verenluovuttajilla ja raskaana olevilla naisilla.

20 Kuva 7 on diagrammi valaisten dTk-aktiivisuuksia, mitattuina keksinnön mukaan, potilaiden seerumissa, joilla on tulehdusperäinen mononukleoosi, ja esitettynä ajan mukanaan taudin puhkeamisen jälkeen.

25 Kuva 8 on diagrammi valaisten dTk-aktiivisuuksia, joita on todettu seerumissa potilailta, jotka kärsivät eri virusinfektioista, mycoplasma pneumoniae- ja psittacosis-taudeista.

30 Kuvat 9a ja 9b ovat diagrammeja valaisten korrelaatiota keksinnön mukaan mitatun seerumin dTk-aktiivisuuden ja NHL-taudista kärsivien potilaiden taudin tilan välillä.

Kuvat 10a ja 10b valaisevat todennäköisyyttä jäädä eloon NHL-potilailla keksinnön mukaan mitattujen esikäsitellyn seerumin dTk-tasojen mukaan.

35 Kuvat 11 ja 12 ovat diagrammeja valaisten seerumin dTk-tasojen pitkittäisiä tutkimuksia NHL-potilailla kliinisen etenemisen vaihdellessa.

Keksinnön ensisijaisessa sovellutuksessa mainittu puskurijärjestelmä on läsnä konsentraatiossa vähemmän kuin noin 150 mM, erityisesti noin 100 mM. Puskurin pH on edullisesti välillä 6,5 - 8, erityisesti noin 7,4. Parhaat tulokset on saatu puskureilla, jotka eivät sisällä maleaattia, ja reaktiivisia tai primäärisiä aminoryhmiä; erityisesti puskureilla, jotka ovat olennaisesti vapaita TRIS-maleaatista; HEPES-puskurin ollessa erityisesti ensisijainen puskuri.

10 Substraatin pitäisi olla radiomerkitty tymidiinianalogi, erityisesti 2'-deoksi-5-halogeeni-uridiini, jolloin merkkiaine on edullisesti reaktiivinen halogeeni-isotooppi. Ensisijainen substraatti on  $^{125}\text{I}$ -2'-deoksi-5-jodouridiini. Ensisijainen substraattikonsentraatio on välillä  $1 \times 10^{-8}$  -  $5 \times 10^{-7}\text{M}$ , erityisesti noin  $10^{-7}\text{M}$ .

Ensisijainen fosfaatin luovuttaja dTk-F-määrittäyksessä on ATP, ja ensisijainen fosfaatin luovuttaja virus-dTk:n määrittäyksessä on CTP. Ensisijainen fosfaatin luovuttajan konsentraatio on vähemmän kuin 10 mM, erityisesti noin 0,5 - 5 mM. Fosfaatin luovuttajia, joilla on tunnetusti per se sama isoentsyymispesifisyys kuin ATP:lla ja CTP:lla, voidaan myös käyttää.

25  $\text{Mg}^{2+}$ :n pitäisi olla edullisesti läsnä ainakin ekvimolaarisessa konsentraatiossa fosfaatin luovuttajan suhteen. Pelkistävä aine, kuten ditiothreitoli, on edullisesti myös läsnä.

Fosforyloidun tuotteen mittausta voidaan toteuttaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä (kts. esim. Gronowitz et Källander, *Infec. Immun.* 29:425, 1980).

30 Keksinnön mukaisen analyysimenetelmän sovellutus dTk-aktiivisuuksien tutkimukseen kliinisissä näytteissä, esim. seerumissa tai rakkoeritteissä muodostaa uuden työkalun tiettyjen virusinfektioiden ja pahanlaatuisten kasvaimien diagnoosia varten. Myös epänormaalien seerumin dTk-tasojen (esim.  $>10$  yksikköä), jotka havaittiin kuvatus menetelmän mukaisella yksinkertaisella

dTk-analyysillä, havaittiin erinomaiseksi merkiksi taudin ennustusta varten, samaten kuin toistuvat dTk-arvot tarkkailtaessa pahanlaatuisen taudin kehitystä tai laantumista. Näillä potilailla seerumin dTk-tasot olivat lisäksi hyödyllisiä merkinä taantumisista tai terapiavaikutusten arvioinnissa. Näitä kaikkia on havainnollistettu esimerkein alla.

Ensisijaisessa sovellutuksessa, joka on toteutettu käytännössä toteutettaessa alla mainittuja kokeita, substraattina on käytetty  $^{125}\text{I}$ -IUdR:a. Ainekokoomus ja määrasuhteet, sisältäen lopulliset konsentraatiot, ensisijaisessa analyysijärjestelmässä on esitetty taulukossa 1 alla.

#### 15 TAULUKKO 1

dTk-analyysissä käytetyn puskurin ainekokoomus

	<u>Osa-aine</u>	<u>Näyteliuos</u>	<u>Lopullinen konsentraatio<sup>a</sup></u>
20	$^{\text{p}}$ HEPES	0.1 M	86 mM
	MgCl <sub>2</sub>	17 mM	15 mM
	KCl	20 mM	17 mM
	NaF	1.2 mM	1.0 mM
	ATP	4.6 mM	3.9 mM
25	dithiothreitol	2.7 mM	2.3 mM
	sarvialbumini	0.33 mg/ml	0.28 mg/ml
	glyseroli	6.6 %	5.7 %
	IUdR	-	$1.1 \times 10^{-7}$ M
	pH	7.4	7.4

30

<sup>a</sup>) Yhden kaksoisnäytteen mittasuhteet ovat: 51.5  $\mu\text{l}$  analyysiseosta, 6  $\mu\text{l}$  substraattiliuosta ( $^{125}\text{I}$ -IUdR:n lopullinen konsentraatio  $1 \times 10^{-7}\text{M}$ , 130 - 160 Ci/mM), ja 2.5  $\mu\text{l}$  entsyymiliuosta esim. seerumia (lisätty reaktion alkaessa), joka antaa lopulliseksi tilavuudeksi 60  $\mu\text{l}$ .

35

<sup>b</sup>) N-2-hydroksietyyli-piperatsiini-N-2-etaanisulfony-

happo.

Yleensä valmistetaan yksi kaksoisnäyte, johon kuuluu 51.5  $\mu$ l reaktioliuosta, joka sekoitetaan 6  $\mu$ l substraattiliuokseen välittömästi ennen käyttöä. Reaktio  
5 aloitetaan sitten lisäämällä 2.5  $\mu$ l entsyymiliuosta (esim. seeruminäyte). Tästä standarditilavuudesta, yhteensä 60  $\mu$ l, otetaan kaksi näytettä, kumpikin 25  $\mu$ l. Näyteliuosten yhdistelmä kokeita varten muodostuen useista kaksoisnäytteistä, jotka on otettu erilaisten  
10 inkubointiaikojen jälkeen, lasketaan kertomalla komponenttien tilavuudet standardinäytteessä halutulla kaksoisnäytteiden lukumäärällä. Analyysi suoritetaan lämpötilassa 37°C, ja kaikki komponentit esilämmitetään 2 min ennen reaktion aloittamista. Entsyymireaktio pääte-  
15 tään pipetoimalla näyte 1 cm<sup>2</sup> suuruiselle palalle Whatman paperia DEAE-81, jota säilytetään lämpötilassa 90 - 100 °C. Tuotteen erottamiseksi substraatista paperi pestään 4 x 6 mM ammoniumformaattiliuoksella, kerran tislattulla vedellä ja lopuksi metanolilla. Pesunesteet  
20 pannaan 1 l lasiastioihin, joita sekoitetaan magneettisekoittimella. 10 - 15 paperilevyä, joita pidetään su-lattimessa käsitellään samanaikaisesti. Suodatin siirretään uuteen pesukylpyyn joka 5. minuutti. Lopuksi pape-rilevyt analysoidaan automaattisella gammalaskimella.  
25 dTk-analyysin päivävaihtelun eliminoimiseksi saadut reaktionopeudet laskettiin uudelleen yksiköit-täin. Syy siihen, että entsyymimäärien määrittämisessä käytetään yksiköitä, on vaihtelu radiokemiallisessa puhtaudessa yhdistettynä kaupallisesti saatavan <sup>125</sup>I-  
30 -IUdR:n havaittuun biologiseen hajoamiseen, mikä tekee kokonaisaktiivisuuden lisättynä näytekohtaisella ei-re-levantilla aktiivisuudella entsyymiaktiivisuuden laske-mista varten. Kts. kuva 2, mikä esittää kaupallisesti saatavan <sup>125</sup>I-IUdR:n panoksien erotusta ohutkerroskroma-  
35 tografialla käyttäen esipinnoitettuja silikageelilevyjä (Merck 60 F<sub>254</sub>) 15 % metanolia, 85 % kloroformia käytet-tiin eluenttina. A esittää profiileja suorituspäivänä,

indikoiden 62 % radiokemiallista puhtautta. B esittää samaa panosta 150 pv jäädyttimessä olon jälkeen. Valmistajat väittivät alunperin >90 % radiokemiallista puhtautta. Tämän sijasta jokaiseen analyysiin sisällytettiin sisäinen biologinen vertailunäyte, joka mittasi käytettävän radioaktiivisuuden. Tämä vertailunäyte oli 100-kertainen ylimäärä HSV tyyppi 2 dTk-valmistetta, jolloin saatiin suuri substraatin kulutus. 1 h kestävän analyysin yhteydessä olevan radkioaktiivisuuden määrä tässä vertailunäytteessä todettiin olevan noin 85 % koskemattoman  $^{125}\text{I}$ -IUdR:arvoista, laskettuna ohutkerroskromatografiasta. Huomioiden biologisessa vertailunäytteessä havaittu taso (85 %), 1 yksikkö entsyymiä on se määrä entsyymiä, joka muuttaa  $4,3 \times 10^{-15}$  moolia substraattia tunnissa (kuvatuissa olosuhteissa). Tämä suhde yksikön ja arvioidun moolisen muuttumisen välillä valittiin, koska 1 yksikkö ilmaistaan käytännöllisesti arvolla noin 1000 cpm, normaalisti käytetyn isotoopin määrän kanssa (taulukko 1). Toinen etu tästä biologisesta isotooppikontrollista oli, käsiteltäessä se samalla tavoin kuin koenäytteet, se, että mahdolliset tuotteen talteenottamisesta johtuvat vaihtelut yksiköissä eliminoiduivat. Menetelmä yksiköiden laskemiseksi on esitetty esimerkein kuvassa 3. Arvot sekä näytteelle (-o-o-) että vertailunäyttelle (-\(\Delta\)-\(\Delta\)-) on esitetty. A on sisäisen vertailun näyte yksiköinä cpm, mikä on suhteessa läsnäolevaan radiomerkityn substraatin kokonaismäärään. B on tuotteen arvo, jonka tutkittu näyte muodostaa ilmaistuna yksiköissä cpm/h. Yksiköt

$$(U) = \frac{B \cdot x}{A \cdot x} \cdot \frac{(S)}{5.3} \cdot \frac{x}{x} \cdot \frac{v}{10^{-15}}$$

Jossa (S) on substraatin konsentraatio (M) ja v on näytetilavuus (l).

Seerumin dTk-aktiivisuuksien määrittäminen. Seerumin dTk:n määrällinen määrittäminen suoritettiin mikrotiitterilevyillä. Jokaista 20 seeruminäytettä varten tehtiin taustavertailunäytteet ja sisäinen substraattivertailu-

näyte (kts. yllä), ja sarja suoritettiin täten yksikönä. Käytetyn seeruminäytteen määrät olivat 5 µl (tai vähemmän)/120 µl lopputilavuudessa, koska suurempi seerumimäärä saattaisi olla inhiboivaa. Kts. kuva 4, 5 dTk-aktiivisuudet määrättiin näytteiden avulla 120 minuutissa. Entsyymiaktiivisuus on piirretty seerumin konsentraation mukaan 60 µl näytettä kohti. Käyrä (o-o) esittää seerumia NHL-taudista kärsivästä ihmisestä, käyrä (△-△) seerumia aktiivisesta CLL-taudista kärsivästä ihmisestä. Tämä inhiboiva vaikutus on todennäköisesti seuraus nukleotidien tai nukleosidien, kuten esim. tymidiinin, tymidiinitrifosfaatin, tai eräissä seerumissa läsnäolevien katabolisten entsyymien läsnäolosta. Kaksoisnäytteet otettiin 60 ja 120 min kuluttua. Väli- 15 aineen muuttuminen tuntia ja 25 µl näytettä kohden laskettiin taustan korjaamisen jälkeen jokaisesta kaksoisnäytteestä erillisesti. Sitten määrättiin keskimääräinen nopeusarvo 60 ja 120 min näytteen ostoista, ja sitä käytettiin jatkolaskennassa (kts. yllä), jos <20 % 20 vaihtelua todettiin.

dTk-aktiivisuuksien määrittäminen selkäydinnesteessä. Käytettiin olennaisesti samaa menetelmää kuin seerumia varten. <sup>125</sup>I-IUDR:n spesifinen aktiivisuus nostettiin arvoon noin Ci/mM. Selkäydinnesteet voidaan 25 konsentroida ennen entsyymimäärityksiä.

dTk-isoentsyymien kvalitatiivinen määrittäminen. Kliiniset näytteet, esim. rakkulanesteitä tai seerumia, sisältäen dTk-aktiivisuutta esi-inkuboitiin isoentsyymille spesifisellä dTk:ta salpaavalla aineella, ja 30 jäännösentisyymiaktiivisuus määrättiin yllä kuvatulla menetelmällä. ATP alyysiseoksessa korvattiin CTP:lla, joka aiheutti dTk-F-aktiivisuuden poissulkemisen. Tutkittavat näytteet laimennettiin sarjoissa kaksinkertaisesti (lähtien tavallisesti arvosta 1:6), ja 15 µl 35 siirrettiin kustakin laimennuksesta neljään kuoppaan mikrotiitterilevyllä, jotta saatiin neljä identtistä laimennussarjaa. Esilaimennettua VZV dTk:ta salpaavaa

seerumia (25 ml) lisättiin yhteen kuoppaan, HSV tyyppi  
1 dTk:ta salpaavaa seerumia toiseen kuoppaan, HSV tyyppi  
2 dTk:ta salpaavaa seerumia kolmanteen kuoppaan ja  
viimeiseen kuoppaan negatiivista seerumia. Seokset  
5 inkuboitiin lämpötilassa 37°C 90 min sallien entsyymi-  
vasta-ainereaktion tapahtuvan. Sitten määrättiin jään-  
nösentyymiaktiivisuudet. Reaktio aloitettiin lisäämällä  
20 µl liuosta, joka sisälsi 6 µl substraattiliuosta  
sekoitettuna 40 µl reaktioliuokseen. Jokaista laimennus-  
10 ta varten eri antiseerumien läsnäollessa saadut arvot  
laskettiin uudelleen negatiivisen seerumin kanssa saa-  
tujen arvojen prosenttiosuutena. Esimerkit tällaisista  
jäännösentyymiaktiivisuuksista piirrettiin näytteiden  
laimennuksen  $\log_2$  funktiona, kuten on esitetty kuvassa  
15 5, jolloin jäännösaktiivisuus inkuboinnin jälkeen anti-  
-VZV dTk-seerumilla ( $\triangle-\triangle$ ), anti-HSV tyyppi 1 dTk:lla  
(seerumi) ( $\bullet-\bullet$ ), ja anti-HSV tyyppi 2 seerumilla ( $o-o$ )  
negatiivisella seerumilla suoritetun vertailuinkuboinnin  
suhteen on piirretty seuraavien näytteiden eri laimen-  
20 nuksilla: A = rakkulaneste ihmisestä, joka kärsii HSV  
tyyppi 2 infektiosta; B = rakkulaneste ihmisestä, joka  
kärsii VZV infektiosta; C = rakkulaneste ihmisestä,  
joka kärsii HSV tyyppi 1 infektiosta; D = seerumi ihmi-  
sestä, joka kärsii VZV-infektiosta. Inhibitiomalleista  
25 voidaan helposti näyttää toteen dTk-tyyppi (kts. myös  
taulukko 2 alla).

30

35

TAULUKKO 2. Virus-dTc-aktiivisuuden tutkiminen ja  
tyypitys kliinisissä näytteissä

Näyte- tyyppi	Näyte- koodi	Entsyymiaktiivi- suus <sup>a</sup> (cpm x 10 <sup>-3</sup> )	Entsyymiaktiivi- suuden jäännös inkuboinnin jälkeen seerumilla	Entsyymiaktiivi- suuden jäännös inkuboinnin jälkeen seerumilla	dtk:n immu- nologinen tyyppi	Klininen diagnoosi	
			VZV	HSV 1	HSV 2		
Rakkula- neste	1	2.5 x 10 <sup>2</sup>	17	92	123	VZV	Herpes zoster
	2	8.1 x 10 <sup>2</sup>	7	118	85	VZV	Herpes zoster
	3	6.6 x 10	6	119	104	VZV	Varicellae
	4	-	-	-	-	-	vesicles non viral origin
	5	7.6 x 10 <sup>2</sup>	99	89	5	HSV 2	Genital Herpes
	6	5.9 x 10 <sup>1</sup>	9	127	109	VZV	Varicellae
	7	8.8 x 10 <sup>3</sup>	101	70	8	HSV 2	Genital Herpes
	8	1.2 x 10 <sup>2</sup>	11	124	104	VZV	Herpes zoster
	9	2.3 x 10 <sup>1</sup>	107	4	95	HSV 1	Herpes stomatitis
	10	1.2 x 10 <sup>3</sup>	16	89	118	VZV	
	11	2.8 x 10 <sup>2</sup>	5	87	91	VZV	Varicellae
	12	6.5 x 10 <sup>2</sup>	7	109	116	VZV	Varicellae
	13	1.5 x 10	10	92	89	VZV	Generalized Herpes zoster
Seerumi- näytteet	A	2.8 x 10 <sup>2</sup>	18			VZV	Varicellae
	B	1.2 x 10 <sup>2</sup>	18			VZV	Varicellae
	C	1.6 x 10 <sup>1</sup>	8	96	85	VZV	Varicellae
	D	3.4 x 10 <sup>1</sup>	12	114	85	VZV	Varicellae
	E	4.0 x 10 <sup>1</sup>	16			VZV	Varicellae
	F	9.6 x 10	11			VZV	Varicellae
Vertailu- dtk kasva- tuksesta	dtkA	1.0 x 10 <sup>2</sup>	120	111	98		
	VZV	8.5 x 10 <sup>2</sup>	7	106	112		
	HSV 1	1.3 x 10 <sup>1</sup>	96	11	94		
	HSV 2	7.5 x 10 <sup>1</sup>	112	89	9		

a) Vertailunäytteen aktiivisuus (näyte inkuboitu negatiivisella seerumilla) käytettäessä 5  $\mu$ l  
näytettä ja IUDR:a spesifisessä aktiivisuudessa 370 CI/mm.

Keksinnön eräs tärkeä piirre on merkittävästi parantunut tutkimusherkyys, mikä mahdollistaa mittauksen jopa dTk-F:n normaaleilla seerumitasoilla terveissä ihmisissä, kuten voidaan nähdä kuvasta 6, mikä esittää dTk-aktiivisuuden jakaumaa 99 verenluovuttajan seerumista (täyttämättömät pylväät) ja 25 ensimmäisellä kaudella raskaanaolevan naisen seerumeista (varjostetut pylväät). Keskiarvo on 2.4 yksikköä/ $\mu$ l ja standardipoikkeama 1.25.

Tulehdussairauksista kärsivien ihmisten seeruminäytteiden tutkimukset johtavat 10 - 40 kertaa kohonneiden dTk-pitoisuuksien havaitsemiseen potilaiden seerumissa tiettyjen virusinfektioiden akuuteissa vaiheissa, esim. mononukleosi-infektiossa, rubella- ja morbillivirus infektioiden. Kuva 7 esittää dTk-aktiivisuutta/ $\mu$ l, joka on muodostunut potilaiden seerumissa, jotka kärsivät tulehdusperäisestä mononukleosista ajan funktiona sairauden kehittymisen jälkeen. Samalla kirjaimella merkityt symbolit tarkoittavat seerumia samasta potilaasta, ja katkoviiva esittää terveiden ihmisten normaaliarvoa. Kuva 8 esittää dTk-aktiivisuutta/ $\mu$ l, joka on todettu potilaiden akuutissa (●) ja toipilasajan (○) seerumissa, jotka kärsivät erilaisista virusinfektioista, mycoplasma pneumoniae- ja psittacosistaudeista. Katkoviiva esittää arvoa, joka on neljä kertaa terveiden ihmisten normaaliarvo.

Herpes-viruksien osalta tulokset osoittavat kohonneita seerumin dTk-aktiivisuuksia primääristen infektioiden yhteydessä. dTk-aktiivisuuksien lisääntymistä (>10 yksikköä) ei havaittu muiden infektioiden yhteydessä (kuva 8). Seerumiaktiivisuuksien luonteenominaisuuksia on tähän mennessä demonstroitu viruksen varicella zoster (VZV) spesifisen dTk:n (taulukko 2) ja solu-dTk-F:n läsnäololla. On todettu, että vaatimuksen mukaista menetelmää voidaan käyttää rakkulanesteissä läsnäolevalle virukselle ominaisten dTk:n määrittämiseen infektioiden nopeaa diagnoosia varten (taulukko 2). Kaik-

ki löydettyt seerumin dTk-aktiivisuudet virusinfektioiden yhteydessä häviävät vähittäin saavuttaen normaalit tasot 2 - 6 viikon kuluessa.

5 Pahanlaatuisista kasvaimista kärsivien potilaiden osalta rajoitettu tutkimus, jossa käytettiin keksinnön mukaista analyysimenetelmää, osoitti kohonneita seerumin dTk-pitoisuuksia ei ainoastaan lymfo-proliferatiivisesta järjestelmästä peräisin olevista pahanlaatuisista kasvaimista kärsivien potilaiden keskuudessa, 10 vaan myös potilailla, joilla on toisten solujen pahanlaatuisia kasvaimia etäispesäkkeineen lymfo-proliferatiivisessa järjestelmässä (taulukko 3).

Lisätutkimuksia on suoritettu hyvin määritetyillä suurilla seerumimateriaaleilla potilaista, jotka 15 kärsivät lymfo-proliferatiivisista taudeista, kuten non-Hodgkin's lymfomasta (NHL), Hodgkinin taudista (HD), kroonisesta ja aktivoituneesta lymfaattisesta leukemias- ta (CLL) ja myelomasta. Yksityiskohtaiset tulokset NHL-ryhmässä olivat seuraavat: todettiin normaaleja ja 20 erisuuruisia kohonneita seerumin dTk-tasoja. Nämä dTk-tasot vastaavat sairauden vaihetta (kts. kuva 9a, mikä esittää seerumin dTk:ta 155 käsittelemättömällä potilaalla korreloituna sairauden tilan mukaan), so. mitä pitemmälle edistynyt sairaus, sitä korkeampi dTk-arvo. 25 Kun dTk-tasoja verrattiin kasvainsolujen pahanlaatuisuuteen (Kiel-järjestelmän mukainen luokitus), todettiin hyvä korrelaatio korkeiden dTk-tasojen ja pahanlaatuisuuden kesken (kts. kuva 9b, mikä esittää seerumin dTk:a 101 NHL-potilaalla vaiheessa III - IV jaettuna kolmeen 30 pahanlaatuisuuden vaiheeseen).

Keksinnön mukaisen analyysimenetelmän käyttökelpoisuus ennustavia tarkoituksia varten osoitettiin korkeasti spesifisillä eroilla eloonjäämisajoissa potilasryhmien välillä, jotka muodostettiin jakamalla potilaat ryhmiin, joissa mitatut dTk-arvot olivat <10 yksikköä ja >10 yksikköä. Kuva 10a esittää todennäköisyyden 35 jäädä eloon NHL-potilailla vaiheessa III - IV esikäsi-

TAULUKKO 3  
dTk-tasot erilaisista kasvainsairauksista kärsivien  
potilaiden seerumissa

5	Sairaustyyppi	Sairauden tila	dTk-aktiivisuus (yksikköä/ $\mu$ l)
	Keuhkosityöpä <sup>a)</sup>	ei etäispesäkkeitä	5
	Keuhkosityöpä	ei etäispesäkkeitä	2
10	Keuhkosityöpä	etäispesäkkeitä	163
	Keuhkosityöpä	etäispesäkkeitä	19
	HD	etäispesäkkeitä	108
	HD	etäispesäkkeitä	28
	HD	ei etäispesäkkeitä	4
	HD	ei etäispesäkkeitä	3
15	NHL	edistynyt vaihe	333
	NHL	edistynyt vaihe	14
	NHL	varhainen vaihe	3
	NHL	varhainen vaihe	5
	Adenocarcinoma	aktiivinen	72
20	Leukemia	akuutti	40
	Leukemia	akuutti	185
	B-solu leukemia	aktiivinen	52
	CML	aktiivinen	3500 <sup>a)</sup>
	CML	aktiivinen	45
25	CLL	aktiivinen	62
	CLL	aktiivinen	18
	CLL	puoliaktiivinen	11
	CLL	puoliaktiivinen	12
	CLL	ei-aktiivinen	2.8 <sup>b)</sup>
30	Terveet yksilöt		2.4 <sup>c)</sup>
	Akuutti leukemia	ei etäispesäkkeitä	0.07 <sup>a)</sup>
	Akuutti leukemia	ei etäispesäkkeitä	0.02 <sup>a)</sup>
	Akuutti leukemia	etäispesäke	1.3 <sup>a)</sup>
	Akuutti leukemia	etäispesäke	1.6 <sup>a)</sup>
35	<sup>a)</sup> Terapia kaksi päivää aikaisemmin		
	<sup>b)</sup> Keskiarvo 6 potilaalta; arvot vaihtelivat välillä 0.5 - 5.4		
	<sup>c)</sup> Katso edellinen jakso		
40	<sup>a)</sup> Kaikki keuhkosityövät tässä tutkimuksessa olivat kaurasolutyyppiä (oat cell type)		
	<sup>a)</sup> dTk-aktiivisuuden määrittäminen selkäydinnesteestä, 5 $\mu$ l laimentamatonta selkäydinnestettä käytettiin 120 $\mu$ l lopullista tilavuutta kohti analyysissä.		
45	Käytetyt lyhennykset: HD; Hodgkinin tauti		
	NHL; Non-Hodgkin-lymfooma		
	CMK; krooninen myeloinen leukemia		
	CLL; krooninen lymfaattinen leukemia		
50			
55			

tellyllä seerumi dTk:lla <10 yksikköä (-o-o-, n = 50) ja >10 yksikköä (-●-●-, n = 51). Numerot sulkeissa tarkoittavat elossaolevia tarkasteltavia ihmisiä 32 kuukauden kuluttua. Kuva 10b esittää todennäköisyyttä  
 5 jäädä eloon NHL-potilailla vaiheissa III - IV, joilla on "korkea-asteinen" pahanlaatuinen kasvain. Seerumin dTk:n esikäsittelytaso <10 (-o-o-, n = 11) ja >10 yksikköä (-●-●-, n = 27). Numerot sulkeissa tarkoittavat elossaolevia tarkasteltavia ihmisiä 32 kuukauden kulut-  
 10 tua.

Lisäksi seerumin dTk-tasojen pitkäaikaistutkimukset NHL-potilaille osoittivat muutoksia vastaten sairauden muutoksia, so. alhaisempia arvoja sairauden taantuessa, korkeampia sairauden edistyessä ja muuttumattomia arvoja sairaustilan ollessa vakio. Kuva 11  
 15 esittää mitattujen seerumin dTk-tasojen vaihteluja A kolmella potilaalla, joilla oli edistyvä tauti, B, kahdella potilaalla, jotka käsiteltiin taudin heikentämiseksi, C neljällä potilaalla, jotka käsiteltiin taudin poistamiseksi kokonaan. Kuvassa 12 seerumin dTk:a seurataan pituussuunnassa potilailla, jolloin sekä taudin edistymistä (a) että hellittämistä (b) tapahtuu. (A) oli kaksi potilasta, joilla oli edistyvä tauti, jotka hoidon muutoksen jälkeen käsiteltiin taudin poistamiseksi osittain ennen kuin tauti edistyi jälleen. (B) oli kolme potilasta, jotka käsiteltiin taudin heikentämiseksi (A.H. ja E.L. osittain, G.E. taudin poistamiseksi täysin). Kaikki he sairastuivat myöhemmin uudelleen. A.H. palasi lyhyeksi aikaa uudelleen terapiaan. Nämä  
 30 tulokset osoittavat selvästi mahdollisuuden tarkkailla terapian tehoa ja myös nopeasti tutkia uudelleen sairastumisia sekä ennen että jälkeen käsittelyn kasvavien dTk-arvojen perusteella.

Käytettäessä keksinnön mukaista analyysimenetelmää muiden yllä mainittujen lymfo-proliferatiivisten sairauksien yhteydessä todettiin vaihtelevia seerumin dTk-tasoja, esim. kroonisessa CLL:ssa todettiin norma-

leja arvoja, kun taas puoliaktiivinen CLL antoi alhaisempia mutta patologisia arvoja (>10 yksikköä), ja aktiivinen CLL korkeita, dTK-tasojen mahdollinen käyttö, kuten on esitetty esimerkein NHL-taudin osalta, ovat myös relevantteja CLL-taudin kohdalla. Lisäksi leukemiasta kärsivien potilaiden selkäydinnesteen tutkimuksissa havaittiin dTk:n läsnäolo leukemiasolujen ollessa läsnä aivo-selkäydinjärjestelmässä. Syövän osalta, kaurasolutyyppistä keuhkosyöpää sairastavien potilaiden tutkimustulokset osoittavat mahdollisuutta käyttää hyväksi seerumin dTk-tasojä merkkinä etäispesäkkeistä samoin kuin muista syöpälajeista. Nämä tulokset ilmevät taulukosta 3.

Luonnollisesti on oltava tietoinen mahdollisesti ohimenevistä kohonneista seerumin dTk-tasoista potilailla, joilla on pahanlaatuinen tauti, jotka tasot voivat olla seurauksena yllä mainituista virusinfektioista. Kuitenkin nämä virussairaudet esiintyvät tavallisesti nuoruusiässä, kun taas pahanlaatuiset kasvaintaudit esiintyvät yleensä aikuisilla. Toinen relevantti tekijä seerumin dTk-tasojen käyttämiseksi yllä mainittuja tarkoituksia varten on kohonneiden dTk-aktiivisuuksien esiintymisen harvinaisuus tutkittaessa valitsematonta seerumimateriaalia, joka on peräisin potilailta, joiden sairautta ei ole määritelty, joilla dTk-tasoilla on siten diagnostista merkitystä. Lääketieteellisissä julkaisuissa tutkimukset näistä ja myös muista potilaisista ovat osoittaneet, että sekä patologiset arvot maksan toimintakokeissa että leukosytoosissa eivät tavallisesti liity seerumin lisääntyneisiin dTk-tasoihin.

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä dTk-isoentsyymipitoisuuden määrittämiseksi ihmisen tai eläimen kehoneste- tai solunäytteestä käsittäen vaiheet: näyte saatetaan reagoimaan mainittua isoentsyymiä varten olevan substraatin kanssa fosfaatin luovuttajan ja puskurisysteemin läsnäollessa, ja muodostuneen fosforyloidun tuotteen määrä mitataan, joka määrä on suhteessa mainittuun isoentsyymipitoisuuteen, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä käytetään yhdistelmää, jossa

a) puskurisysteemi on oleellisesti vapaa maleaatista ja systeemin pH on välillä 5 - 9, puskurisysteemin sisältämien komponenttien kokonaiskonsentraation ollessa alle 250 mM,

b) substraatti on 2'-deoksi-5-halouridiini, josta osa on radiomerkittyä 5-halogeenia, ja substraatin konsentraatio on välillä  $2 \times 10^{-9}$  -  $5 \times 10^{-6}$  M, ja

c) fosfaatin luovuttajan konsentraatio on alle 20 mM; jotka mainitut konsentraatiot ovat näyteliuoksen konsentraatioita.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pH on noin 6.5 - 8, substraatin konsentraatio on  $10^{-8}$ - $5 \times 10^{-7}$  M, ja fosfaatin luovuttajan konsentraatio on noin 0.5 - 5 mM.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fosfaatin luovuttaja valitaan ryhmästä, johon kuuluu ATP ja CTP.

4. Jokin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmään kuuluu vaihe, jossa määritetään läsnäoleva radiomerkitty substraatti käyttäen vertailunäytettä, joka muodostuu dTk-isoentsyymistä, jota on ylimäärin ja joka riittää aiheuttamaan pääasiassa kaiken substraatin käytön, jolloin vertailunäyte käsitellään samalla tavoin kuin mainittu näyte ennen mainitun fosforyloidun tuotteen radioaktiivisuuden mittausta.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisen menetelmän käyttö, t u n n e t t u siitä, että menetelmää käytetään sairauksien diagnosoissa, jotka sairaudet sisältävät muuttuneen ATP-välitteisen dTk-aktiivisuuden, kuten syöpä, kasvaimet ja tietyt virusinfektiot.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisen menetelmän käyttö, t u n n e t t u siitä, että menetelmää käytetään sairauksien diagnosiin, jotka sairaudet sisältävät muuttuneen CTP-välitteisen dTk-aktiivisuuden, kuten HSV tyyppi 1-, tyyppi 2- ja VZV-infektiot.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukaisen menetelmän käyttö dTk-isoentsyymin tyypitykseen, t u n n e t t u siitä, että menetelmään kuuluu vaihe, jossa mainittu näyte esi-inkuboidaan dTk-isoentsyymin tyyppispesifisillä salpaavilla aineilla, kuten vasta-aineilla.

#### PATENTTKRAV

1. Förfarande att bestämma dTk-isoenzymkoncentration i en kroppsvätska eller cellprov hos människa eller djur, vilket omfattar stegen att låta provet reagera med ett substrat för nämnda isoenzym i närvaro av en fosfatgivare och ett buffertsystem och mäta mängden fosforylerad produkt som bildats, vilken mängd är proportionell mot nämnda isoenzymkoncentration, k ä n n e t e c k n a t av att man i förfarandet använder en kombination, vari

a) ett buffertsystem är väsentligen fri från maleat och pH av systemet är från 5 till 9, och en total komponentkoncentration av buffertsystemet är under 250 mM,

b) ett substrat består av 2'-deoxi-5-halouridin, av vilket en del har en radiomärkt 5-halogen, och som är närvarande i en koncentration från  $2 \times 10^{-9}$  -  $5 \times 10^{-6}$  M, och

c) fosfatgivaren är närvarande i en koncentration, under 20 mM; vilka nämnda koncentrationer är koncentrationer av provlösningen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c n a t av att nämnda pH är från ca 6,5 - 8, nämnda substratkoncentration är från  $10^{-8}$  -  $5 \times 10^{-7}$ M, och nämnda fosfatgivarkoncentration är från ca 0,5-5 mM.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t av att nämnda fosfatgivare är vald ur den grupp, som består av ATP och CTP.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t av att det omfattar steget att bestämma tillgängligt radiomärkt substrat genom att införliva en kontroll, som består av dTk-isoenzym i ett överskott tillräckligt för att orsaka substratutarmning, varvid nämnda kontroll behandlas på samma sätt som nämnda prov före mätning av radioaktiviteten hos nämnda fosforylerade produkt.

5. Användning av förfarandet enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t av att förfarandet användas för diagnos av sjukdomar inbegripande förändrad ATP-medierad dTk-aktivitet, såsom cancer, tumörer och vissa virusinfektioner.

6. Användning av förfarandet enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t av att förfarandet användas för diagnos av sjukdomar inbegripande förändrad CTP-medierad dTk-aktivitet såsom HSV typ 1, typ 2 och VZV-infektioner.

7. Användning av förfarandet enligt något av patentkraven 1 - 4 för dTk-isoenzymtypning, k ä n n e t e c k n a t av att det omfattar steget att förinkubera nämnda prov med dTk-isoenzym-typspecifika blockerande agens, såsom antikroppar.

#### Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

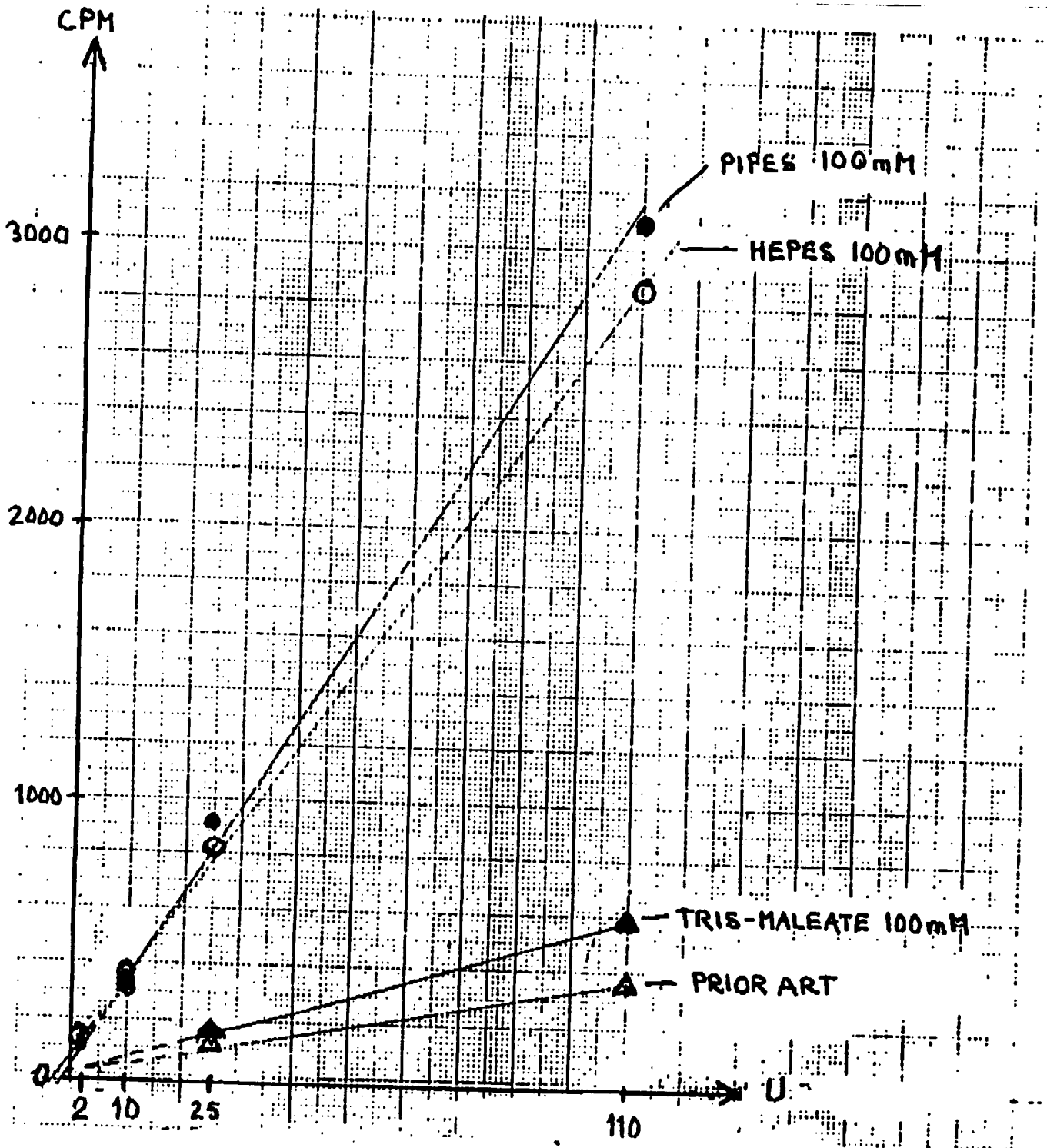
- Infection and Immunity, vol. 29, 1980, p. 425-434 ja/och vol. 36, 1982, p. 30-37.  
 Methods in Enzymology, vol. 51, 1978, p. 354-360, p. 360-365 ja/och p. 365-371.  
 The Journal of Biological Chemistry, vol. 254, p. 10747-10753.  
 Biochimica et Biophysica Acta, vol. 452, 1976, p. 370-381.

Erilaisten puskurisysteemien vertailu seerumin tymidiini-  
kinaasin määrittämisessä

Tulokset 10 min jälkeen seeruminäytteiden konversiosta.

Mitatut arvot (CPM) näytteissä olevan entsyymimäärän funktiona (U).

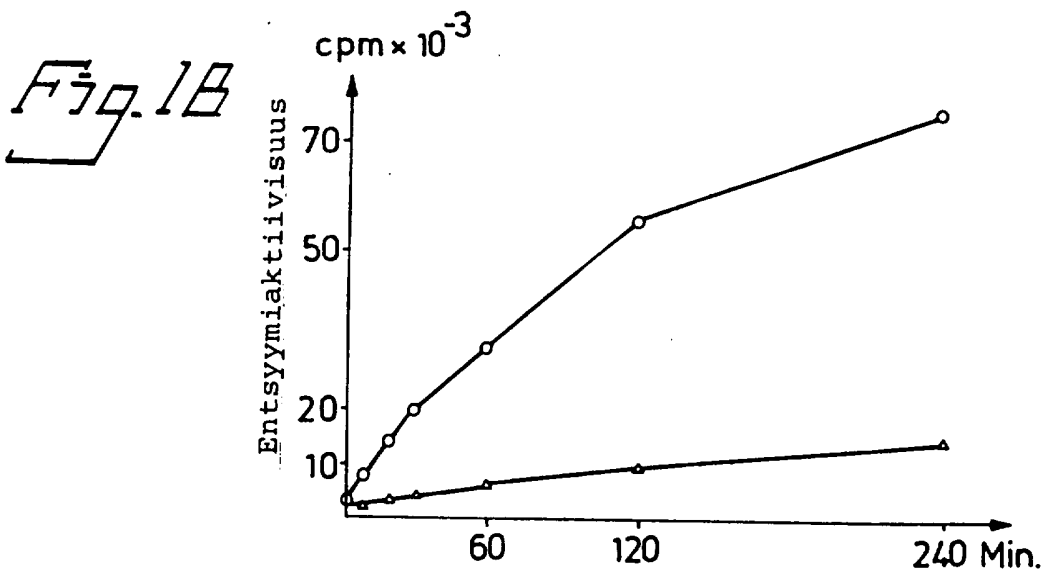
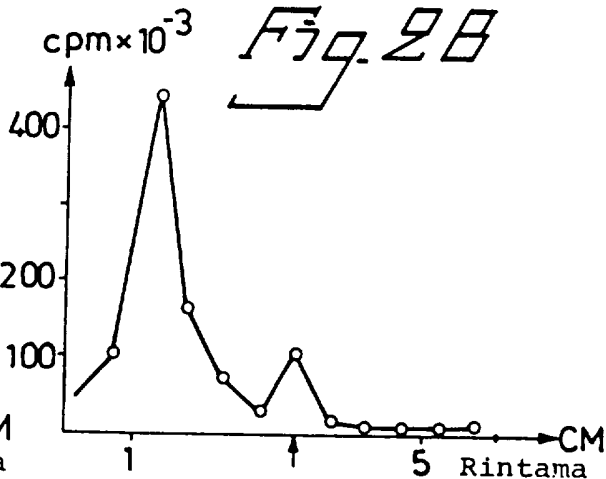
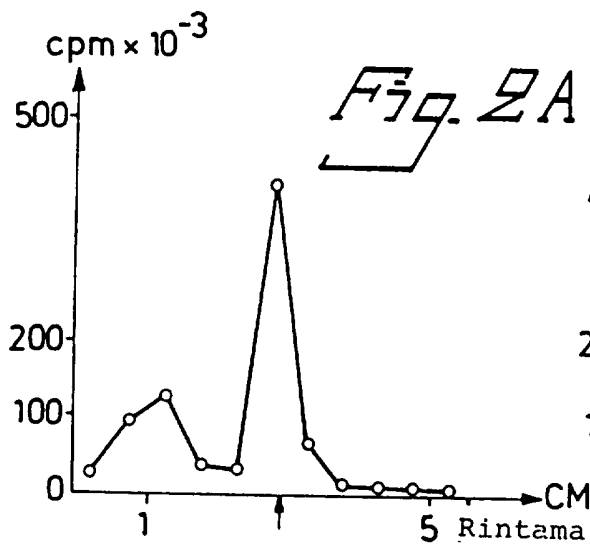
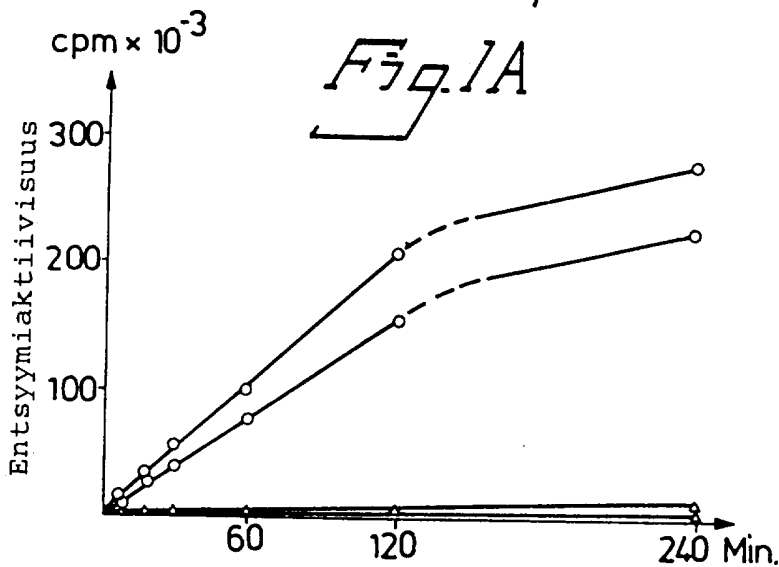
Prior art = Infection and Immunity 29, 1980, 425 - 434.

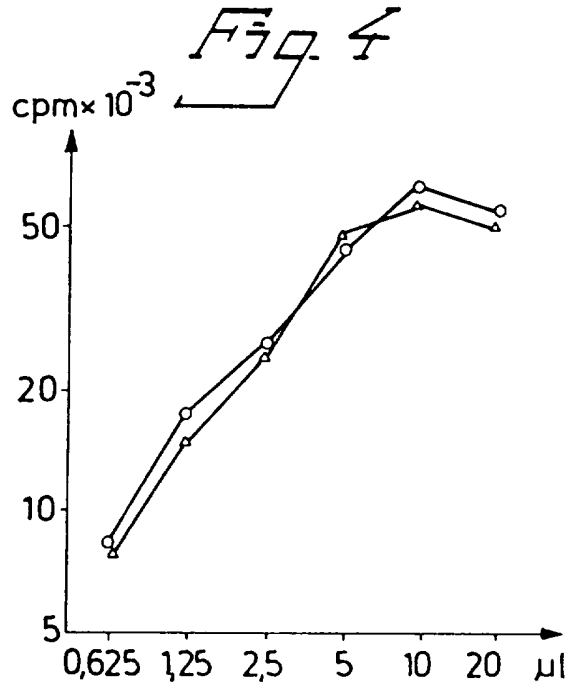
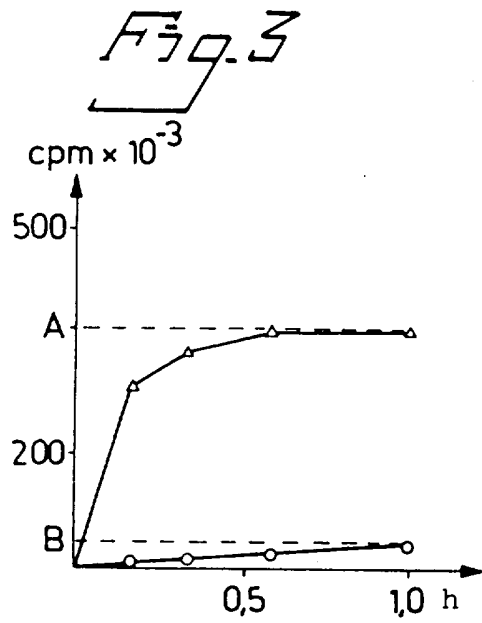


77895

TAULUKKO BPuskurisysteemin vaikutus seerumin tymidiinikinaasin  
entsyymaattiseen aktiivisuuteenMitatut entsyymiaktiivisuudet (cpm/10 min) puskurikon-  
sentraatiolla 200 mM

S-TK Aktiivisuus (U)	T-maleaatti	T-HCl	Pipes	Hepes
500	3256	9481	12574	13037
110	489	3015	3230	3767
25	190	701	888	902
5	-	184	222	201





**Fig. 5**

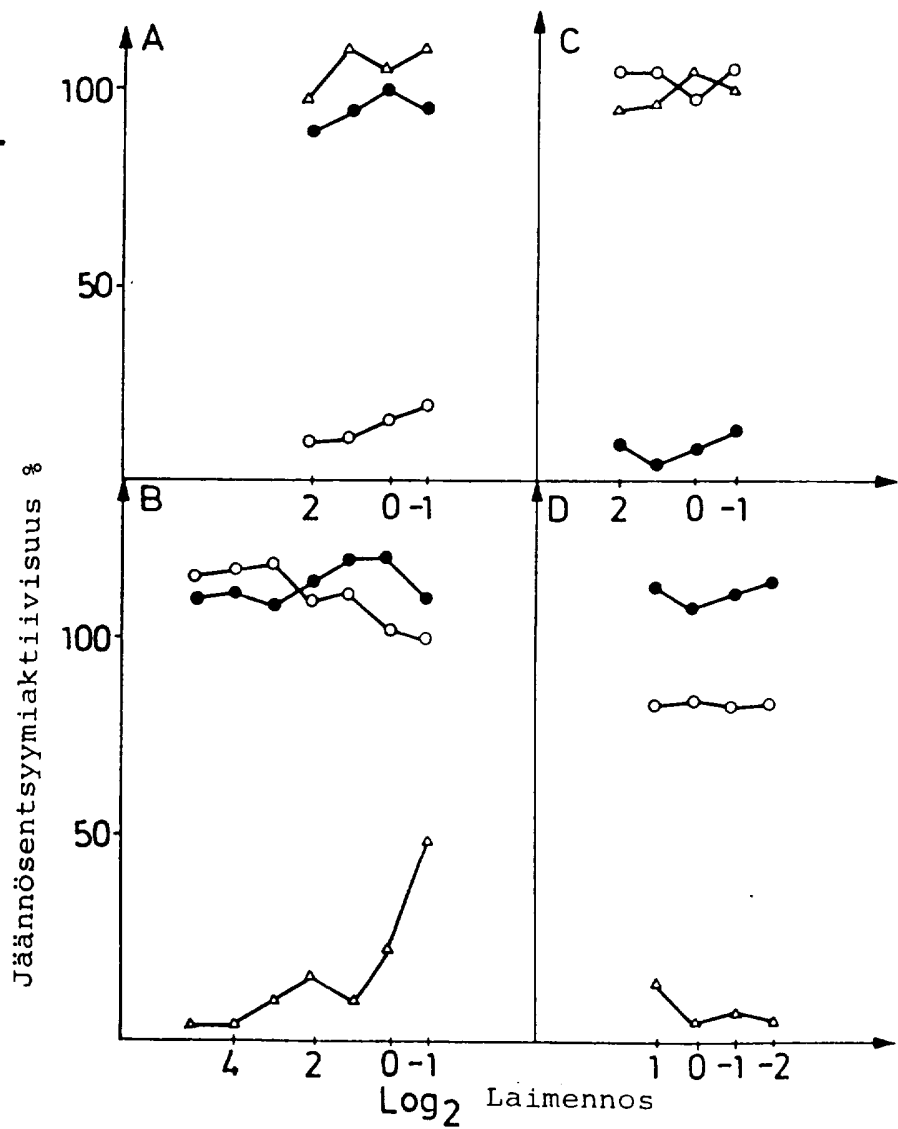


Fig. 6

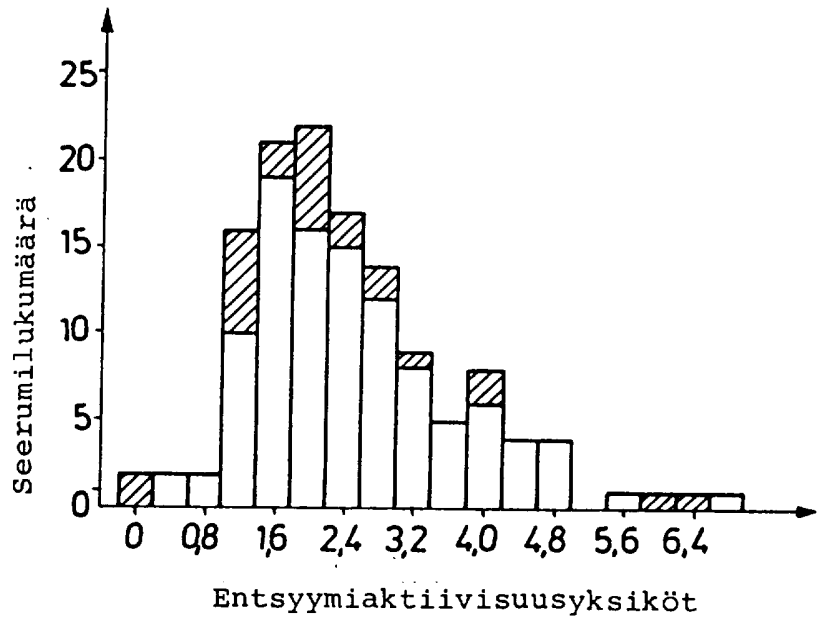


Fig. 7

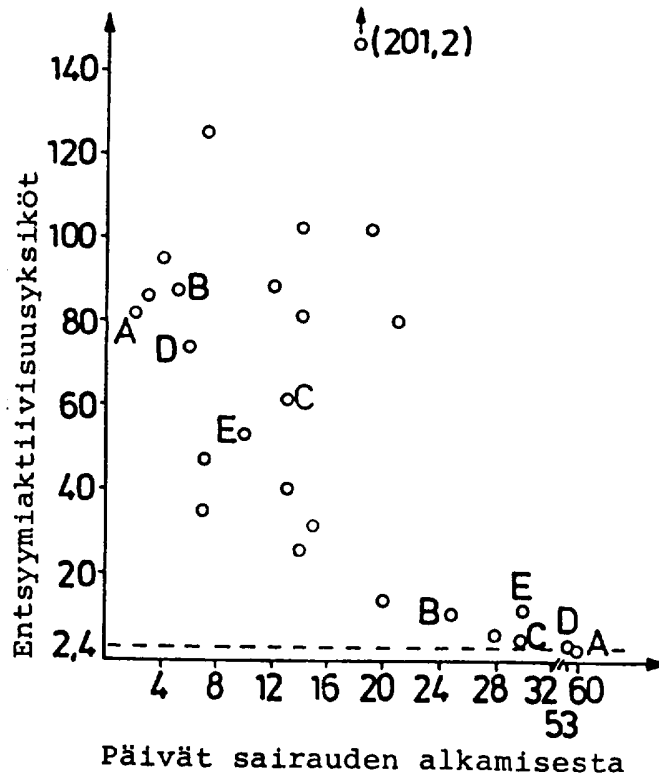
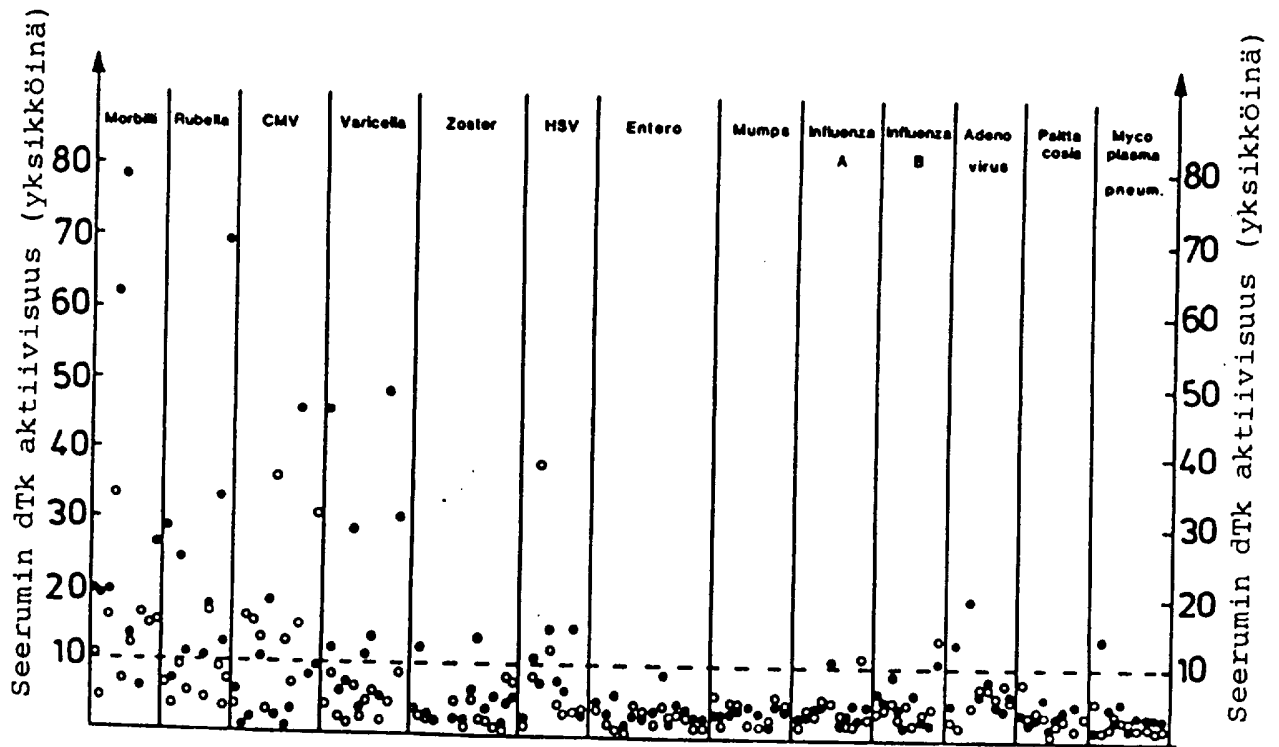
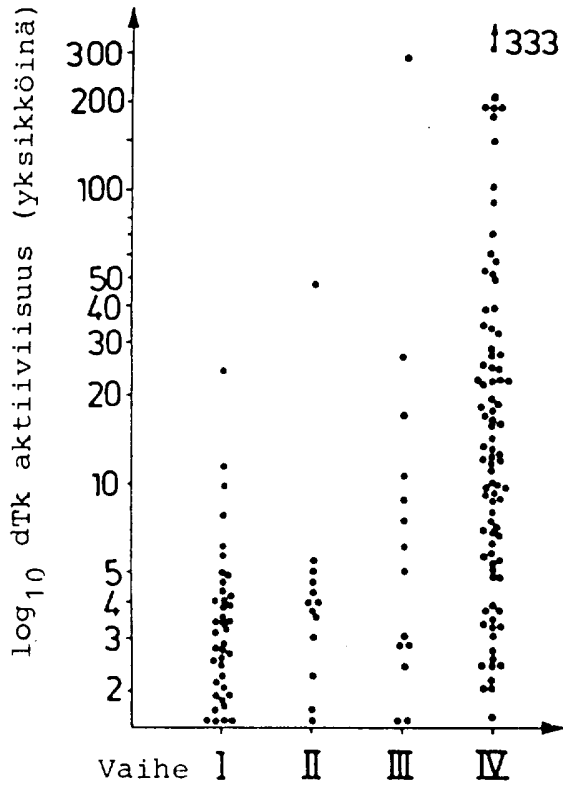


Fig. B



5/6

Fig. 9a



77895

Fig. 9b

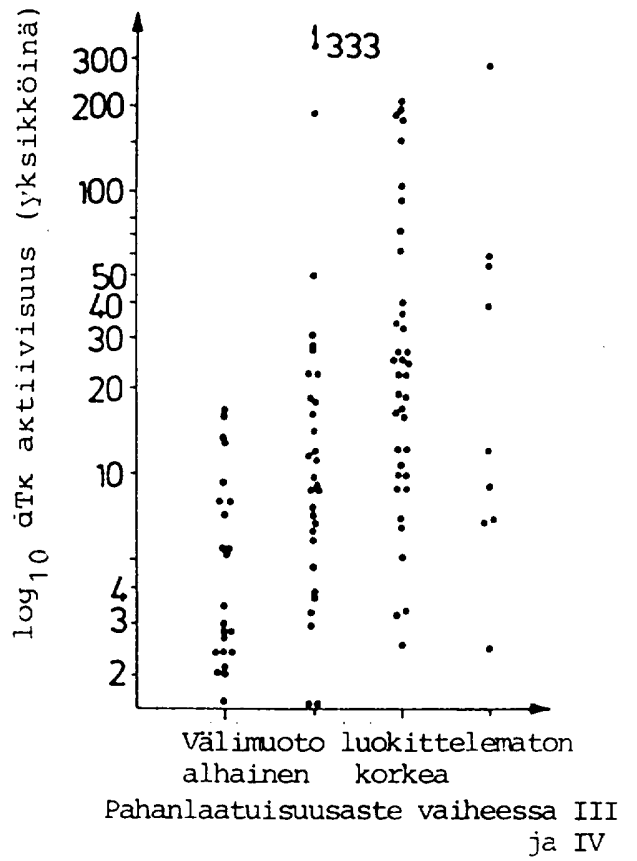


Fig. 10a

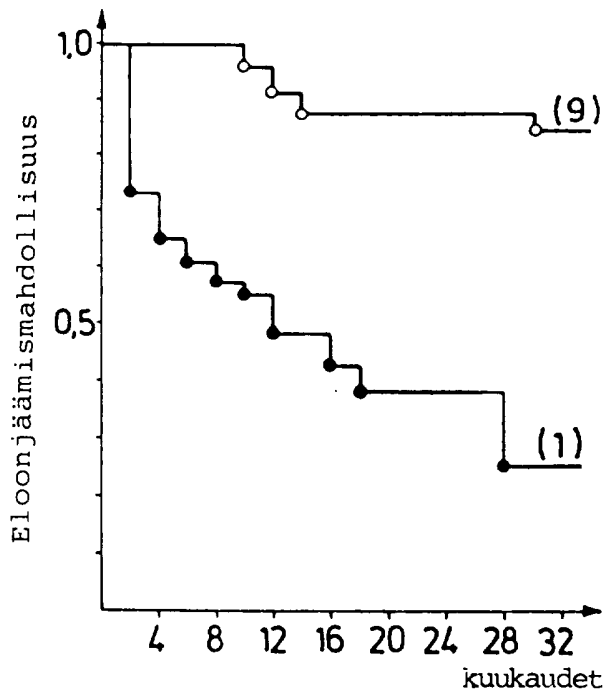


Fig. 10b

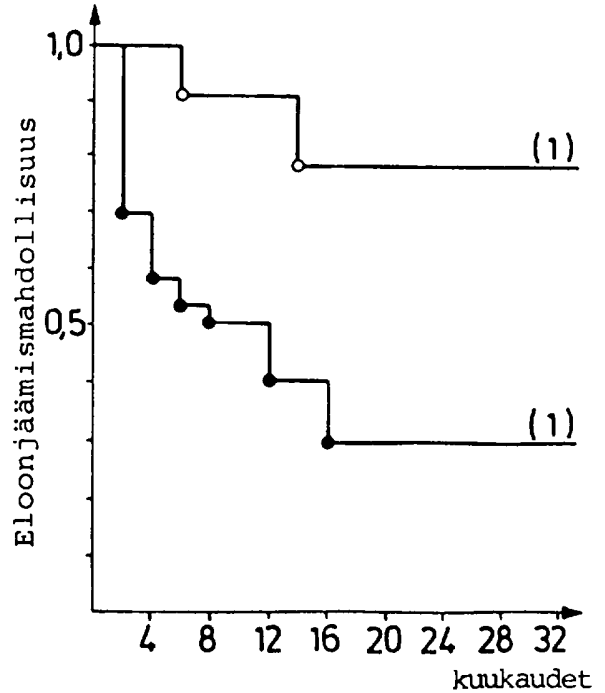


Fig. 11

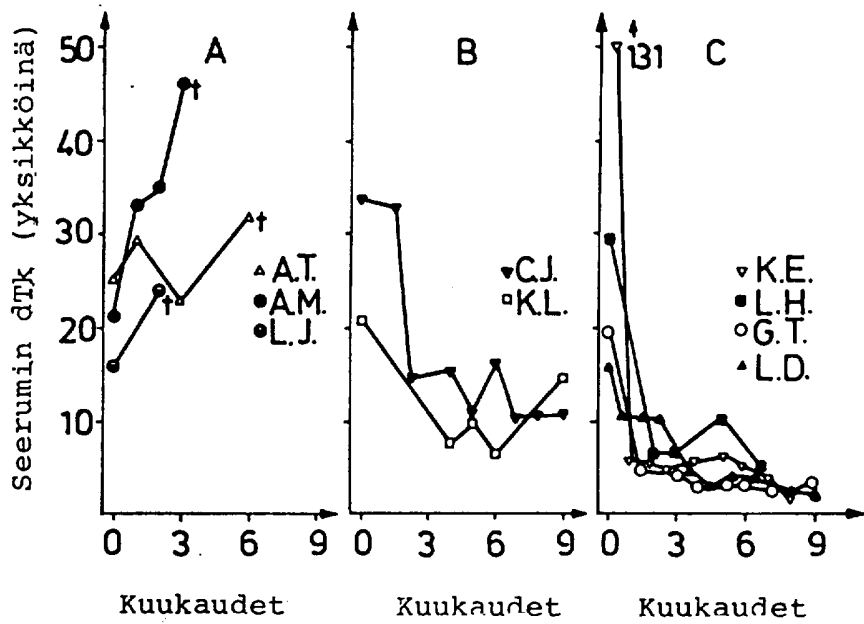


Fig. 12

