

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 831169 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **831169**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.04.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.04.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **08.10.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

07.04.1982 US 366,436 11.03.1983 US 472,362

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, 1200 Moursund Avenue, Houston, Texas, United States,
AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Terman, David Stephen, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Balint, Joseph P., TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Langone, John J., 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

Tuotteita ja menetelmiä syövän hoitoon.

Produkter och metoder för behandling av cancer.

Tuotteita ja menetelmiä syövän hoitoon

Tämä keksintö on osittainen jatko patenttihakemuskelle nro 366 436, jätetty 7.4.1982.

5 Keksinnön kohteena on immunoterapeuttisia ja kemoterapeuttisia tuotteita ja menetelmiä isäntien hoitamiseksi, joissa on syöpä.

 Pakkovirtaus-sähköforeesi on menetelmä, jolla runsaasti gammaglobuliinia sisältävä jae erotetaan sähköforeettisesti heparinoidusta täysverestä, jota pidetään kehon ulkopuolisessa kierrossa (1-5). Yleinen menetelmä on samanlainen kuin menetelmä, jota käytetään keinomunuaisilla ja erityisesti veren sähködialyysissä (6). Pakkovirtaus-sähköforeesi (FFE) kuviteltiin aluksi suurmittakaavaiseksi sähköforeettiseksi menetelmäksi biologisten ainesten nopeaa fraktiointia varten, joka tekee mahdolliseksi isoelektristen proteiiniaineosien puhdistamisen (5). Pakkovirtaus-sähköforeesin toimintaperiaatteet ovat seuraavat: neutraalissa pH:ssa kaikki plasmaproteiinit, lukuun ottamatta gammaglobuliinia, kulkeutuvat sähköiseen kenttään. Tätä periaatetta käytetään kaikkien plasmaproteiinien talteenottamiseksi ja gammaglobuliinin erottamiseksi. Se on osoittanut monipuolisemmaksi välineeksi, joka sopii joukon erilaisia sähkökineettisiä membraani-ilmiöitä, kuten sähkösuodattamisen ja sen soveltamisen veden puhdistukseen (7), bakteriofagien sähköadsorption, veren sähködialyysin ja proteiiniliuosten sähköosmoottisen väkevöinnin ja/tai suolanpoiston (9) tutkimiseen. FFE voidaan suunnitella suoraa toimintaa varten ja sitä on käytetty immunoglobuliinien poistamiseen koirista estämään tai viivyttämään vieraan munuaissiirteiden hylkimistä (10). Tämän keinon käyttämisestä syöpää sairastavien isäntien hoidossa ei keksijöiden tietämän mukaan ole aikaisemmin tapahtunut.

 FFE:n kulun aikana kerätään poistovirtaus (EIE), joka sisältää runsaasti gammaglobuliinia, mutta sisältää myös muita plasmaproteiineja (10). Ennen tätä keksintöä tämä poistovirtaus on hylätty ilman enempää käsittelyä. Tämä

keksintö omistautuu tämän poistovirtauksen keräämiseen FFE-laitteella, sen myöhempään käsittelyyn ja uudelleenantamiseen syöpää sairastavalle isännälle.

Proteiini A-IgG-kompleksit

5 Proteiini A on staphylococcus aureus Cowans I:n soluseinän aineosa, joka reagoi useista nisäkäslejaista saatujen immunoglobuliinien Fc-osasten kanssa muodostamaan immuunikomplekseja, jotka immuunikompleksit kiinnittävät komplementin ja kuluttavat komplementtikomponentteja (11-16). Aikaisemmissa tutkimuksissa koirilla, joilla on spontaaninen nisä-
10 rauhassyöpä, ihmisen rintasyövän erinomainen malli, kierrätettiin plasmaa proteiinia A sisältävän staphylococcus (SpA):n yli, joka oli tehty liikkumattomaksi mikrohuokoisessa membraanisuo-
15 datussysteemissä ja pantu alttiiksi plasmalle, jota tuli jatkuvasti virtaavasta plasmasoluerottimesta (17). Kohtayhden plasmamäärän kierrättämisen jälkeen proteiini A:ta sisältävän staphylococcuksen yli, havaittiin kasvainkuolema-
20 mita seurasi tavoitteena olleita kasvaintakautumia. Näitä vaikutuksia ei havaittu, kun plasmaa kierrätettiin yli staphylococcuksen, josta proteiini A puuttui (17). Kasvaintakautumien löydökset tässä kokeellisessa koirasysteemissä vahvistettiin eräässä itsenäisessä tutkimuksessa (18). Plasman perfuusio puhdistettiin sitten ja samanlaiset kasvainkuole-
25 mavasteet havaittiin plasman läpivalutuksen jälkeen puhdistetun proteiinin A yli, joka oli tehty liikkumattomaksi kollodium/hiili-matriisissa (proteiini A kollodiumhiili, PACC) (19).

Tätä hoitomuotoa käytettiin viidelle peräkkäiselle ihmispotilaalle, joilla oli rintarauhassyöpä ja akuutteja
30 kasvainmyrkyllisiä reaktioita havaittiin pian perfuusoiden jälkeen PACC:n ylitse. Toistettujen käsittelyjen jälkeen, tavoitteena olleita kasvaimia takauttavia vaikutuksia havaittiin neljässä näistä potilaista (20).

Aikaisemmat tutkimukset koirilla ja ihmisellä spontaanisella rintarauhassyövällä antoivat (muiden seikkojen
35 ohessa) seuraavat tulokset, kun kohdetta käsiteltiin plasmalla, jota oli valutettu liikkumattomaksi tehdyn SpA:n

tai PACC:n läpi (17, 19, 20): akuutin kivun nopea alkaminen ja n-kyvät morfologian muutokset rintaseinämakasvaimissa pienten määrien plasmaa kehon ulkopuolisen perfuusion jälkeen PACC:n ylitse, johdattivat mieleen, että nämä vaikutukset olivat tekijöiden aiheuttamia, joita kehittyi plasmassa PACC:n ylitse viemisen jälkeen (17, 19, 20). Menettelyä yksinkertaistettiin teknisesti poistamalla suora kehon ulkopuolinen kierrätysysteemi ja sen sijaan pieniä tasaosia autologista tai homologista plasmaa, joka oli aikaisemmin koottu laskimonavauksella, vietiin PACC:n ylitse irrallisesti, mitä seurasi suora infuusio potilaisiin (20). Potilaissa, joita oli käsitelty kokonaan plasman irrallisperfuusiolla, esiintyi akuuttia kipua samanlaisin morfologisin vastein ja kasvaimia takauttavin vaikutuksin kuin ne, jotka havaittiin suoralla kehon ulkopuoleisella systeemillä (20). Lisäksi kasvainmyrkyllisiin vasteisiin sekä koirilla että ihmisellä liittyi serologisia ja immunohistokemiallisia muutoksia, nimittäin lisääntynyt kiintofaasi Clq-sitominen ja nousseet C5a-tasot sekä alentuminen C3:ssa, johon yhdistyi IgG:n ja C3:n laskeumia kasvainsolumembraaneille (17, 20, 21).

SpA:lla on kyky sitoutua IgG:n Fc-alueelle, mistä ei ole tuloksena ainoastaan komplementin aktivoituminen sekä muita vaikutuksia in vitro, vaan voi myös aiheutua vaikutuksia in vivo, jotka muistuttavat immuunireaktioita, jotka on saatu aikaan antigeeni-vasta-aine-komplekseilla. Joihinkin niistä näyttää liittyvän kompleksin aktivoituminen SaA-IgG-kompleksien vaikutuksesta liuoksessa. Esimerkiksi SpA annettuna ihonsisäisesti normaaleille ihmiskohteille niinkin pieninä annoksina kuin 10 μ g, aiheutti näppy- ja punoitusreaktioita, jotka havaittiin 30 minuutin kuluttua ja myöhemmän reaktion, jonka maksimivoimakkuus oli 24-48 tunnin kuluttua. Samalla tavalla aiheutti niinkin vähän kuin 10 μ g SpA, annettuna ihonsisäisesti marsuille, merkittävän arthruksen kaltaisen reaktion ja 300-400 μ g antoi verenvuotoreaktion, jonka maksimivoimakkuus oli 12-24 tunnin kuluttua (22). Marsut, joille oli annettu 500 - 1 000 μ g sydämensisäisesti, saivat kuolettavan herkistymäjärkytyksen, joka voitiin estää

antamalla etukäteen antihistamiineja. Heczko, et al. (23) havaitsivat myös, että marsut, jotka oli herkistetty niinkin vähällä kuin 50 μ g:lla SpA täydellisessä Freund'in apuaineessa antoivat viivästyneen reaktion, joka oli voimakkaimmillaan 24 tunnin kuluttua, kun taas sama annos annettuna täydellisessä apuaineessa tai suolaliuoksessa antoi arthusreaktion, joka oli voimakkaimmillaan kuuden tunnin kuluttua. Vastakohtana ihmiselle ja marsulle, muut lajit, joilla on IgG, joka ei saosta SpA:ta, eivät antaneet yliherkistymisreaktioita, kun niille annettiin SpA:ta pelkästään. Siten kaniinit, joille oli annettu yksinkertainen ruiske 6 mg:aan asti SpA ja hiiret, joille oli annettu 10-500 μ g, eivät osoittaneet pian alkavia eikä viivästyneitä reaktioita (24, 25). Kaniineissa aiheutettiin kuitenkin suora arthusreaktio 5-10 tunnissa antamalla 100-180 mg ihmisen IgG:tä laskimonsisäisesti, mitä seurasi 10-15 minuutissa 0,025 - 21,5 mg SpA:ta ihonsisäisesti ja verenvuotokuolema oli ilmeinen 18-24 tunnin kuluttua ihonsisäisistä ihmisen IgG:n ja SpA:n välisistä saostumista esimuodostetuista ruiskeista. Kaninien verenkierto puhdistui nopeasti kaniinin IgG:n ja 125_I SpA:n välisistä liukoisista komplekseista maksan ja pernan vaikutuksesta ja suolaliuoksella perfusoitu kaniinin maksa keräsi in vito 49 %:iin asti merkatuista komplekseista yhden läpäisyn aikana (25).

On tunnettua, että SpA lisättynä ihmisen, marsun, kaniinin tai sian seerumiin aiheuttaa heikon ja merkittävän komplementtiaktiivisuuden loppuun kulumisen lajista riippuen (26-29). SpA:n ja ihmisen normaalin tai luuyidnkasvain IgG:n tai Fc-osasten tai normaalin marsun SpA:lla kasatun IgG:n seoksilla oli samanlainen vaikutus (30, 31). Kompleksit SpA:n ja marsun kummankin alaryhmän IgG₁ ja IgG₂ välillä kiinnittivät komplementin, kun taas antigeeni-vasta-ainekompleksit, jotka sisälsivät IgG₃, eivät sitä tehneet (30, 31). Kun SpA:ta lisättiin ihmisen täysseerumeihin, komplementin 9 komponentin, lukuun ottamatta C7, jota ei määritetty, tiitterit pienenivät 30 % (C8) - 85 % (C3) ja optimaalinen estäminen tapahtui IgG-ylimäärässä. Ennalta muodostetut

kompleksit SpA:n ja komplementin kiinnittävän myeloma-IgG₁:n Fc-osasen välillä, jotka oli valmistettu olosuhteissa maksimi-aktiviteettiä varten, vähensivät kokonaiskomplementtitiit-
 5 4-99 %:lla ja yksittäisten komponenttien tiittereitä
 kuumana yhteenkasattuun IgG:hen että IgG-myeloma-1-proteiiniin, mutta sillä ei ollut vaikutusta C1:n sitoutumiseen IgG:hen (14). Komplementtiaktiivisuuden loppuun kuluminen riippui SpA:n määrästä suhteessa IgG:hen. Siten, kun SpA-
 10 seerumin annos kasvoi, syntyi komplementtiaktivoitumisen maksimitaso, joka aleni suurilla SpA-pitoisuuksilla (14, 26, 28). Tämän ilmiän tulkittiin merkitsevän, että SpA:n suuret pitoisuudet estivät C1:n sitoutumisen. Langone'n, et al. (32, 33, 34), kokeet selvittivät SpA:n vaikutuksen
 15 vasta-aine-aktiivisuuteen. IgG:n ja SpA:n väliset kompleksit, jotka on muodostettu suhteellisen suurilla tai pienillä SpA-annoksilla, käyttäytyvät, kuten autenttinen IgG. SpA-IgG-kompleksit, jotka on valmistettu kokemusperäisellä kaavalla $[(\text{IgG})_2 \text{ SpA}]_n$, käyttäytyvät kuten IgM hemolyytisessä kyvyssään ja tavassa, jolla ne ovat vuorovaikutuksessa täyskomplementin tai puhdistetun C1:n kanssa (34). Fluorenssin tukahduttamis- ja valonsirontamenetelmin osoitettiin
 20 kaniinin Fc:lla olevan kaksi sitomiskohtaa yksiarvoiselle osaselle B ja että muodostui komplekseja 2-4 molekyylin kanssa Fc-osasia SpA-sillan kautta (35). Lisäksi kompleksin muodostus IgG:n ja SpA:n välillä parantaa vasta-aine-affiniteetteja merkittävästi, mikä todennäköisesti johtuu monipisteiinnittymisestä (13).

Ihmisen liuskatumaiset valkoverisolut ottavat nopeasti ravintoa ja huonontavat liukenemattomia komplekseja, jotka on valmistettu ihmisen IgG:stä ja SpA:sta (36, 37); valkoiset verisolut vapauttavat histamiinia SpA:n läsnäollessa (38). Syöjäsolutoiminnan aste riippuu SpA:n annoksesta ja oli optimaalinen muodostuneista presipitaateista riippuen
 35 ja myeloperoksidaasin samanarvoinen vapautuminen oli vastaavuussuhteessa kompleksien syöjäsolutoiminnan kanssa. ^{125}I -merkittyä IgG:tä käytettiin osoittamaan vastaanotettu

määrä, joka riippui neutrofiilien pitoisuudesta, kompleksien luonteesta, inkubointiajasta ja seerumitekijöiden läsnäolosta (36).

Tämä keksintö osoittaa, että proteiini A-IgG-komplekseja muodostuu plasmaperfuusion jälkeen PACC:n ylitse. Samanlaiset kompleksit, jotka on valmistettu inkuboimalla proteiinia A IgG:n tai seerumin kanssa eri moolisuhteissa ja sitten annettu laskimonsisäisesti isännille, joilla on kasvaimia, on aiheuttanut kasvainmyrkyllisiä reaktioita ja kasvaintakautumisia. Tämä edustaa uutta tuotetta käytettäväksi syövän hoidossa.

C. Happameksi ja emäksiseksi tekeminen

Monia vuosia on ollut tunnettua, että antigeeni-vasta-aine-kompleksien, olivatpa ne luonnosta peräisin tai keinotekoisesti valmistettuja, altistamisesta pH-äärialueille, joko happamalla tai emäksisellä puolella, on seurauksena niiden pääasiallisesti täydellinen dissosioituminen vastaaviksi aineosikseen. Keinotekoisesti valmistettujen naudan seerumialbumiini-anti-naudan seerumialbumiini-kompleksien altistamisesta happamalle pH:lle on seurauksena dissosioituminen niiden vastaaviksi aineosiksi, kuten ensimmäisenä osoittivat Campbell, et al. (30). Tätä ajatusta on käytetty immunologian alalla antigeenien ja vasta-aineiden eristämiseen, jotka ovat läsnä immuunikompleksin muodossa. Menetelmän vasta-aineiden dissosioimiseksi antigeeni-vasta-aine-komplekseista tekemällä happameksi ja eristämällä vasta-aine antigeeninpoistamisen jälkeen ultrasuodatuksella alhaisessa pH:ssa, ovat selostaneet Sjögren, et al. (40) hiirikasvainsysteemissä. Äskettäin löydettiin piilevästi sytotoksisia, leukemiaan liittyviin antigeeneihin kohdistuvia vasta-aineita seerumissa akuutin ydinsyntyisen leukemian akuutin vaiheen aikana. Ultrasuodatuksen jälkeenalhaisessa pH:ssa oli havaittavissa merkittävästi komplementistä riippuvaa solumyrkyllisyyttä useimmissa testatuissa seerumeissa (41).

Lisäksi Dorsett, et al. (42) eristivät kasvain-spesifisiä vasta-aineita munasarjasyöpien munasarjanesteen purkautumista suolasaostuksen avulla ja inkuboimalla sitten pH 2,8:ssa,

mitä seurasi näytteiden neutralointi lisäämällä hitaasti natriumhydroksidia. Vapautuneet vasta-aineet testattiin epäsuoralla immunofluoresenssillä ja ne osoittivat olennaista nousua tiitterissä. Ajatuksen liuosten tekemiseksi emäksiksi immuunikompleksien dissosioimiseksi esittivät ensimmäisinä Kabar ja Mayer (43) ja sitä on käytetty tähän tarkoitukseen monia vuosia.

Pakkovirtaus-sähköforeesin poistovirtauksen tai plasmaa sisältävän kasvaimen happameksi tai emäksiseksi tekemistä ja sen käyttöä syövän hoidossa, kuten tässä selostetaan, ei keksijän tietämyksen mukaan ole aikaisemmin tehty eikä esitetty.

D. Kasvainimmunoglobuliini

Immunoglobuliinin käytön kliinisessä lääketieteessä aloittivat Behring ja Kitasato (44) antitoksiinien käytöllä ja se eteni eläin-antitoksiinien kliiniseen käyttöön ihmisen sairauksien ehkäisyssä. Ihmisen immunoglobuliinivalmisteiden käyttö passiivista immunointia varten alkoi McKhann'in et al. tutkimuksilla (45, 46), jotka käyttivät ammoniumsulfaattia globuliinijakeiden eristämiseen istukkauutteista. Vuonna 1936 näitä jakeita, jotka osoittautuivat olevan tehokkaita tuhkarokon estämisessä tai modifioimisessa, alettiin nimittää immunoglobuliiniksi (ihmisen) (47). Suurin etu tällä alueella saavutettiin kylmän etanolin hyväksikäytöllä immunoglobuliinin fraktionointia varten ihmisen plasmasta ja sen osoittamisesta, että jae II, ts. immuuniseerumiglobuliini oli tehokas tuhkarokon ehkäisyyn (48, 49) ja hepatitiksen (50, 51) torjuntaan samoin kuin immuunipuutoksen hoitoon (47). Immunoglobuliinin käytön kehittyminen USA:ssa on suureksi osaksi käsittänyt spesifisten immunoglobuliinien käyttöönoton. Sellaisilla tuotteilla kuin tetanusimmunoglobuliini, anti-D-globuliini ja immuuniglobuliini raivotaudissa, on suhteellisen varma asema kliinisessä lääketieteessä. Uusin näistä tuotteista on hepatitis B immuuniglobuliini ja vielä muita, kuten varicella-zoster-immuuniglobuliini, on tutkimuksen alaisina. Valmisteita on nyt gammaglobuliinin laskimonsisäistä käyttöä varten ja niitä ovat pelkistetyt ja

alkyloidut, suolafraktionoidut, beta-propiolaktonilla käsiteltyt ja pH 4-käsiteltyt valmisteet (52-57). Nämä valmisteet ovat olleet tehokkaita ja kaikilla on ollut suuri valikoima sivuvaikutuksia. Sivuvaikutukset näyttävät olennaisesti vähentyneen pH 4-valmisteella ja on olemassa osoitus siitä, että sivuvaikutuksia voitaisiin välttää hitaalla infuusiolla. Gammaglobuliinin ihanneominaisuuksia ovat murtumisen puuttuminen sekä yhteenkasautumisen että IgA:n puuttuminen ja valmisteen pysyvyys. Sen tulisi olla pysyvä käytettäväksi joko lihaksensisäisesti tai laskimonsisäisesti eikä siihen saisi liittyä maksatulehduksen vaaraa.

Kasvainspesifisten vasta-aineiden käyttö spesifistä aktiivista immunoterapiaa varten on kääntynyt seuraaviin suuntiin. Kokeita vierasgeenisillä seerumeilla on suoritettu ja ne vaativat vieraan proteiinin antamista pidemmän ajan, mistä on seurauksena allergisten reaktioiden vaara. Kaikesta huolimatta Lindström sai jokaisessa kokeessa jonkin verran kliinistä vastetta kaniineissa valmistettujen seerumien antamisen jälkeen immunoinnin jälkeen myeloidi-leukemiasoluilla (58). DeCarvalho valmisti hyperimmuuni-gammaglobuliinia hevosissa antigeenejä vastaan, jotka oli erotettu normaaleista antigeeneistä kasvainkudoksessa saostamalla jälkimmäinen vasta-aineilla normaalikudoksia vastaan. 13:lla 15:sta leukemiapotilaasta esiintyi väliaikaisia neljästä viikosta 29 kuukauteen kestäviä lievennyksiä immuuniseerumiglobuliinin jälkeen (59). Sekla et al. eivät pystyneet aikaansaamaan väliaikaista lievitystä viidellä potilaalla heterologisilla immuuniglobuliineilla, jotka oli valmistettu hie-
man eri tavalla (60). Tsirimbis, et al. käsitelivät viittä potilasta, joilla oli krooninen imusoluleukemia, hevosen anti-lymfosyyttiseerumilla. Kolmella viidestä potilaasta ääreissoluluvut putosivat n. 40 %:iin lähtöarvostaan (61). DeCarvalho näki objektiivista näyttöä vasteesta potilaissa, joilla oli kiinteä kasvain, globuliineilla, jotka oli valmistettu, kuten leukemioita varten (59). Marsh, et al. antoivat kaniinin vasta-kasvainseerumia potilaille, joilla oli erilaisia kiinteitä kasvaimia (62). He eivät havainneet

mitään kliinistä vaikutusta, vaikka ruumiin avauksissa vasta-aine oli selektiivisesti paikallistunut sarkoomasolujen alueille. Eräässä tuoreessa kokeessa, jossa käytettiin melanoma-immunoiduista simpansseista valmistettua seerumia, 5 tutkijat havaitsivat sisälmystaudin akuuttia kuolleisuutta kahdessa kolmesta potilaasta, vaikka takautumat olivat epätäydellisiä ja kohtalokkaan verihiutaleniukkuuden komplisoimia yhdellä potilaalla (63).

Myös allogeenisia seerumeita on jo tutkittu niiden 10 terapeuttisen vaikutuksen suhteen leukemiaan. Useat tutkijat ovat yrittäneet käsitellä leukemioita ja imukudoskasvaimia seerumeilla, jotka sisältävät vasta-aineita ihmisen imusoluja vastaan. Eräs Laslow'in et al. tutkimuksessa (64) anti-lymfosyytti-plasmaa valmistettiin immunoimalla normaaleja 15 kohteita normaaleja imusoluja vastaan. IgG erotettiin sitten tästä plasmasta ja annettiin kolmelle potilaalle, joilla oli krooninen imusoluleukemia. Jokaisella potilaalla oli ohimenevää imusoluniukkutta ja pienentymistä imusolmukkeen koossa infuusion jälkeen. Djarassi käsitteli neljää potilaasta, joilla oli akuutti imusoluleukemia, seerumilla potilaasta, jolla oli tahalassanaemia major (synnynnäinen hemolyyttinen anemia) ja jotka oli herkistetty monien yksilöiden sekä jyvässoluja että imusoluja vastaan. Kaikilla neljällä 20 potilaalla tapahtui putous ääreisvalkosolujen luvussa (65). Herberman antoi seerumia sytotoksisten vasta-aineiden kanssa useasti raskaana olleesta naisesta seitsemälle potilaalle, joilla oli imusolu-uudiskasvusairauksia. Hänen potilaan- 25 sa reagoivat putouksin imusolu- ja verihiutaleluluissa keskimäärin 48,8 - 25,5 %:lla esikäsittelyarvoista, mikä kesti yhden päivän. Kahdella näistä viidestä potilaasta oli kutistumista ääreisimukudoksessa, neljällä potilaalla oli pieniä sivuvaikutuksia, kuten kuumetta ja väristyksiä ja kahdella 30 oli hengityshäiriöitä (66). Allogeenisia seerumeita, joiden luovuttajat oli tarkoituksellisesti immunoitu kasvainsoluja vastaan, on myös tutkittu. Brittingham ja Chaplin immunoivat 35 normaalin luovuttajan imusoluilla potilaasta, jolla oli krooninen ydinsoluleukemia. Normaali yksilö immunoitiin sitten

uudelleen kolme vuotta myöhemmin täysverellä toisesta poti-
 laasta, jolla oli krooninen ydinsoluleukemia. Anti-leuko-
 syytti-vasta-aine, joka oli aktiivinen luovuttajasoluja
 vastaan, ilmestyi normaalissa yksilössä. Gammaglobuliinia
 5 saatiin tästä luovuttajasta ja tämän luovuttajan plasmaa an-
 nettiin leukemiapotilaille, joiden soluja oli käytetty uu-
 delleen immunointiin. Ei havaittu mitään selvää edullista
 vaikutusta potilaan sairauteen (67). Skirkovich et al. im-
 munoivat potilaita leukemiasoluilla muista potilaista. 8-15
 10 päivää immunoinnin jälkeen plasmaa vaihdettiin 2-3 kertaa
 potilaiden luovuttajaparien välillä. Kuusi paria lapsia kä-
 siteltiin ja havaittiin kolme täydellistä ja viisi osittais-
 ta hematologista väliaikaista lieventymistä. Seitsemän näis-
 tä reagoineesta potilaasta oli saanut myös steroidi- ja sy-
 15 tostaattista hoitoa, mutta yksi täydellinen väliaikainen
 lieveneminen saavutettiin pelkästään immunoterapialla (68).
 Remissioplasmaa on annettu myös passiiviseen terapiaan.
 Skirkovich et al. keräsivät autologista plasmaa ja imuso-
 luja varhaisessa lievennysvaiheessa ja antoivat näitä poti-
 20 laille lievityksen myöhemmissä vaiheissa. Heistä tuntui,
 että lievityksen kesto aika pitenee tällä toimenpiteellä (69).
 Ngu sai käyttäen lievityksen myöhäisen vaiheen seerumeita
 potilaista, joilla oli Burkitt'in imukudoskasvain, aikaan
 lievityksiä potilaissa, joilla oli aktiivisia sairauksia
 25 (70). Seerumi potilaista, joilla on pahanlaatuisen melanoo-
 man takautuma, on satunnaisesti aiheuttanut lievitystä muil-
 le potilaille annettuna.

Tutkijat ovat yrittäneet käyttää hyväksi vasta-aineen
 spesifisyyttä muiden sytotoksisten aineiden toimittamiseksi
 30 suoraan kasvainsoluun eläinmalleissa. Chlorambucil ja dauno-
 mysiini ovat sitoutuneet anti-kasvain-vasta-aineisiin (72, 73)
 ja vasta-aineita on myös merkitty radioaktiivisilla isotoo-
 peilla, kuten ^{131}I :lla (74). Niitä on myös konjugoitu tok-
 siineihin, kuten kurkkumädässä (75) ja entsyymeihin, joilla
 35 on sytotoksista potentiaalia (76). Mahdollisen tehostavan
 vaikutuksen vasta-aineen ja kemoterapian välillä ovat kuvan-
 neet Segerling et al. ja se osoittaa, että marsun maksakas-

vainsolut, jotka normaalisti ovat kestäviä vasta-aineen ja komplementin tappamista vastaan, herkistyvät käsittelyn jälkeen kemoterapeuttisilla aineilla (77).

Samalla kun on ilmeistä, että alalla on aikaisemmin
 5 tehty paljon työtä, joka koskee immunoglobuliinivalmisteiden antamista eläimille ja ihmisille, joilla on kasvaimia, ovat tulokset näistä kokeiluista olleet sekalaisia. Aluksi olisi huomattava, että nämä käsittelyt eivät ole olleet yhtäpitävästi tehokkaita kasvaimen hoitoon. On käytetty monentyyppisiä käsittelyjä potilaan oman seerumin käytöstä muiden potilaiden seerumien käyttöön, joilla on samanlaisia tauteja ja
 10 mennen niinkin pitkälle kuin seerumien käyttöön erilajisista eläimistä. Äskettäin on tehty yrityksiä käsitellä potilaita käyttäen monoklonaalisia vasta-aineita, jotka on kehitetty hiirissä potilaan omaamaa spesifistä kasvainta varten. Nämä erilaiset yritykset ovat todiste menestyksen puutteesta alan aikaisemmissa menetelmissä, kuten on esitetty edellä mainituissa julkaisuissa. Vastakohtana alalla aikaisemmin saaduille sekalaisille tuloksille pystyy tämän keksinnön
 20 kasvaimeen liittyvä immuuniglobuliinivalmiste aikaansaamaan yhtäpitävän kasvainmyrkyllisen vaikutuksen, kun sitä injektoidaan isännille, joilla on kasvain sekä ihmisille että eläimille. Lisäksi tämän aineen käyttöön liittyy huomattavasti vähemmän komplikaatioita kuin alalla aikaisemmin, sillä mitä
 25 tahansa immunoglobuliinia, joka on saatu mistä tahansa lajin jäsenestä, voidaan käyttää, joka aines voidaan helposti saada (esimerkiksi) plasmaferoimalla isäntiä, joissa on immuunikomplekseja, jotka sisältävät halutun vasta-aineen tai samalla vasta-aine tästä isännästä saadun plasman Cohn-fraktionoinnista. Tässä esitetyt menetelmät tekevät mahdolliseksi yleisesti tehokkaan kasvainvastaisen reagenssin paljon
 30 runsaamman lähteen valmistamisen kuin olisi ollut mahdollista valmistaa alan aikaisemmillä menetelmillä.

Tässä kuvataan uutta kasvainimmuuniglobuliinia, joka
 35 on saatu isäntien, joilla on kasvain, seerumista sekä myös menetelmä sen tuottamiseksi. Tällä aineella on kasvainmyrkyllisiä vaikutuksia, kun sitä annetaan isännille, joilla on syöpä.

E. Komplementin aktivointi

Ihmisen komplementtisysteemi koostuu sekalaisesta koelmasta plasmaproteiineja. Yhteensä yli 20 komponenttia ottaa osaa hyvässä järjestyksessä olevaan reaktiosarjaan, jossa lopulta on seurauksena komplementin aktivoituminen. Koottu todistusaineista tukee väitettä, että komplementtisysteemi toimii normaalin isännän puolustusmekanismien perusosana ja seurauksena tästä komplementin aktivoitumiseen liittyy yleisesti joukko erilaisia patologisia tiloja (78, 79, 80).
 10 On olemassa kaksi päätapaa, joita nimitetään klassiseksi ja vaihtoehtoiseksi tieksi, joilla komplementti aktivoidaan. Nämä kaksi tietä voidaan yleisesti erottaa toisistaan prosessin mukaan, jolla aloittaminen tapahtuu. Huolimatta komplementin aktivointitavasta, antaa keskeisen C3-komponentin
 15 muuttuminen C3a- ja C3b-osasiksi merkin aktivoimisen tunnus-tapahtumasta. C3-konvertaasi muodostuu tuloksena klassisen tai vaihtoehtoisen tien aktivoinnista. C3:n konversio saa aikaan entsyymikompleksin (C5 konvertaasin) muodostumisen, joka vuorostaan sitten pilkkoo C5:n antamaan osaset C5a ja
 20 C5b. C5a vapautuu sen jälkeen liuokseen, kun taas molekyylin C5b-osalla on olennainen tehtävä lyyttisen membraani-hyökkäyskompleksin muodostumisen aloittamisessa.

C3a ja C5a ovat molekyyliä, joita nimitetään anafylatoksiineiksi ja ne ovat äärimmäisen voimakkaita bioaktiivisia aineita, joilla on avaintehtävä välittäjinä akuutissa tulehdusvasteessa (81, 82). Sekä C3a että C5a jakavat tiettyjä kouristuksia aiheuttavia ominaisuuksia C3a:n kanssa, joka on tehokas nanomoolisella väkevyysalueella ja C5a on tehokas subnanomoolisella väkevyysalueella (83). Kummankin tekijän on osoitettu lisäävän verisuoniläpäisevyyttä (84, 85) samoin kuin aiheuttavat histamiinin vapautumista syöttösoluista (86). C5a on kemotaktinen tekijä ja tämä glykopolypeptidi näyttää olevan neutrofiilillä aiheutetun tulehduksen päävälittäjä (87).

35 Useita mekanismeja pidetään tehokkaina rajoittamaan anafylatoksiinien biologista aktiivisuutta. Seerumi-eksopeptidaasi poistaa tehokkaasti olennaisen C-pääte-arginyyli-

tähteen anafylatoksiinimolekyyleistä ja tekee sekä C3a:n että C5a:n itse asiassa kykenemättömäksi kouristusta aiheuttavaan toimintaan muutamassa sekunnissa sen jälkeen, kun ne ovat vapautuneet verenkiertoon (88). Tuote C5a des Arg
5 säilyttää sittenkin kyvyn edistää kemiallista vetovoimaa (89).

C3a on yksiketjuinen polypeptidi, jossa on 77 aminohappotähdettä ja jonka molekyylipaino on 9000. Ihmisen C5a anafylatoksiini on yksiketjuinen glykopeptidi, jossa on 74
10 aminohappotähdettä ja joka sisältää yhden oligosakkaridisyksikön liittyneenä asparagiinitähteeseen asemassa 64. Polypeptidin ja oligosakkaridiosan yhteinen molekyylipaino on 11 000 (90, 91).

Aikaisemmissa tutkimuksissa ihmisillä havaittiin, että C5a:n (ja samansukuisten) seerumitasot nousivat pian
15 plasmaperfuusion jälkeen proteiini A-kollodium-hiilen ylitse (21). C5a:n ilmestymiseen liittyi ääreisverisuonien laajentuminen ja välinesteen ilmestyminen (20, 21). Yhdessä tapauksessa saatiin näyttöä keuhkoverentungoksesta ajankohtana, jonka C5a keksittiin (21). Lisäksi havaittiin, että akuut-
20 teihin kasvainmyrkyllisiin reaktioihin näillä potilailla liittyi nesteen täyttämien rakkuloiden ilmestyminen ihokasvainkohtiin, jotka rakkulat sisälsivät liuskatumaisia imusoluja (20). Koska C5a:n tiedetään aikaansaavan lisäyksen
25 verisuonien läpäisevyyteen ja verisuonien laajentumista ja on kemotaktinen neutrofiileille se saattaisi myötävaikuttaa havaittuihin fysiologisiin vaikutuksiin proteiini A-perfuusion jälkeen ja kenties parantaa kiertävien kasvainmyrkyllisten tekijöiden sisäänkäsyä kasvainkohtiin.

30 Kassel et al. ovat osoittaneet, että puhtaan C5:n antamien erityisesti leukemiaa sairastaville hiirille sai aikaan merkittäviä leukemian takautumisia (92). AKR-hiiriä, joilla oli spontaaninen leukemia, infusoitiin normaalilla seerumilla valikoimasta eri lajeja. Leukemiasolujen tuhoutu-
35 misen aiheutti seerumi hiirikannoista, joilla oli komplementtikomponenttien täysi kirjo, mutta ei seerumi hiirikannoista, joilla oli geneettisesti määritetty C5-puutos.

Marsuista, hevosista ja ihmisistä saatu seerumi aiheutti myös leukemiasolujen tuhoutumisen. Ehdotetut mekanismit, joilla C5 sai aikaan leukemiasolun tuhoutumisen AKR-hiirisä, ovat seuraavat: (a) C5:lla voi olla suora vaikutus leukemiasoluihin antamalla puuttuvan komplemenettisidoksen, joka tekee mahdolliseksi isännälle tuottaa sytotoksisia vastaaineita aiheuttamaan solun hajoaminen, (b) C5 reagoi muussa paikassa kuin leukemiasolun pinnoilla, esim. antigeeni-vastaa-

5
10
15

ten aikaan lymfokiinien vapautumisen, jotka itse välittävät leukemiasolun tuhoutumista, (c) C5:n antileukeeminen vaikutus riippuu aikaisemmin olemassa olevasta immuunivasteesta, joka tuo mieleen jonkin toisen mekanismin leukemiasolujen spesifisesti tappamiseksi.

Tämä keksintö antaa kasvaimiin liittyviä immunoglobuliinivalmisteita, jotka ovat käyttökelpoisia joko sellaisinaan tai yhdessä muiden modaaliteettien kanssa syövän hoitoa varten. Tämän keksinnön yhdelle kohdalle on olennaista, että immunoglobuliineja kohteen plasmassa käsitellään tai

20

käsitellään muiden saman lajin eläimistä (ihmiset mukaan lukien) saatua plasmaa, niin että

a) dissosioidaan kiertävät immunoglobuliinit kiertävistä liukoisista kasvainantigeeneistä, joiden kanssa ne ovat muodostaneet komplekseja; ja

b) kasataan yhteen nämä vapautetut immunoglobuliinit tuottamaan ainesta, jolla on lisääntynyt kasvainmyrkyllinen aktiivisuus, kun ne injektoidaan isäntään, jolla on kasvain. On huomattava, että tämä dissosioimisvaihe voidaan toteuttaa jollakin lukuisista tunnetuista dissosioivista menetelmistä, jotka käsittävät olennaisen muutoksen pH:ssa siitä, joka normaalisti seerumissa kohdataan, suuren muutoksen ioniväkyvydessä (kuten suolalisyksellä), kuumentamisen jne., edellyttäen, että käytetyn dissosioimismenetelmän täytyy olla riittävä erottamaan kiertävät immuunikompleksit halutuksi

25
30
35

immunoglobuliiniksi ja liukoiseksi kasvainspesifiseksi antigeeniksi muuttamatta olennaisesti halutun immunoglobuliinin luonnetta.

Eräs edullinen menetelmä, jota on käytetty tämän dissosioimisen toteuttamiseen, on saadun immuunikompleksin käsittely hapolla tai emäksellä dissosioivissa olosuhteissa riittävä aika kompleksien tehokkaasti dissosioimiseksi. Kuten alalla on tunnettua, pH väliltä n. 3,2 - 1,5 yleensä on riittävä aikaansaamaan tämä dissosioituminen. Aikavälit, joiden voitaisiin odottaa olevan riittäviä tätä dissosioimista varten, ovat yleensä n. kahdesta minuutista niinkin pitkiksi kuin kahdeksaan tuntiin tai pidempiin, jos niin halutaan. Tässä on havaittu, että käsittely hapolla pH:n alen-
tamiseksi n. 2,5:een n. viiden minuutin ajan, mitä seuraa nopea neutralointi n. pH 7,4:ään on riittävä antamaan haluttu aines. Jos käytetään vaihtoehtoista dissosioimismenetelmää, saattaa olla tarpeen myöhemmin käsitellä ainesta saamaan aikaan immunoglobuliinin haluttu yhteenkasautuminen; jos kuitenkin käytetään happokäsittelyä, tapahtuu yhteenkasautuminen pääasiallisesti samanaikaisesti käsittelyn aikana.

Tämän keksinnön yhtenä lisäkohtana esitetään erilaisia komplekseja immunoglobuliinien ja proteiinin A välillä. Nämä kompleksit voivat olla komplekseja proteiinin A ja immunoglobuliinin välillä joko normaali-isännistä tai isännistä, joilla on kasvain. Näitä komplekseja valmistetaan yksinkertaisimmin sekoittamalla proteiinia A seerumin kanssa, joka on valittu ihmis- tai eläinistä, joka on normaali tai jolla on kasvain, mutta nämä voidaan valmistaa myös viemällä seerumi pylvään läpi, jonka kiintofaasiin on kiinnitetty proteiinia A tai Staphylococcus'ta, jolla on proteiinia A. Lisäksi näitä komplekseja voidaan valmistaa yhdistämällä proteiini A puhdistettujen IgG-valmisteiden kanssa, jotka on saatu isäntien, jotka ovat normaaleja tai joilla on kasvain, seerumista. Näitä puhdistettuja immunoglobuliinivalmisteita saadaan (esimerkiksi) Cohn-fraktionoinnilla, sähköforeesilla tai muilla menetelmillä, joista tässä esityksessä on puhe tai jotka ovat alaan perehtyneen tuntemia.

Näitä proteiini A-immunoglobuliinikomplekseja voidaan valmistaa laajalta alueelta proteiinia A/immunoglobuliini-tehokkaita suhteita, jolloin ainoana arvosteluperusteena on,

että kompleksi on tehokas kasvainten hoidossa. Nämä suhteet voivat olla proteiini A/globuliinisuhteesta 1:1 000 suhteeseen proteiini A/globuliini = 1:2 asti. Suhteiden n. väliltä 1-100 on havaittu olevan erityisen tehokkaita. Näitä komplekseja saadaan tavanomaisesti saostamalla, kuten alalla on tunnettua. Eräs käyttökelpoinen saostusmenetelmä on käyttää sellaisia aineksia, jotka ovat alaan perehtyneiden tuntemia. Nämä immunoglobuliinit voisivat tietenkin olla monokloonisia vasta-aineita, jotka on kehitetty hiirissä tai muissa eläimissä, täsmälleen sille kasvaimelle, joka isännällä on tai saman lajin kasvaimelle saman eläinlajin muissa yksilöissä.

Tämän keksinnön muita kohteita ovat seuraavat tuotteet, jotka ovat käyttökelpoisia hoidettaessa isäntiä, joilla on syöpä:

Tuote 1: Kasvaimeen liittyvä immunoglobuliinivalmiste, jolla on kasvainmyrkyllisyyttä tehostava vaikutus ja joka on peräisin isännän, joka on normaali tai jolla on kasvain, plasmasta, joka valmiste koostuu vallitsevasti IgG:stä ja IgM:stä ja jolla kasvaimeen liittyvien vasta-aineiden tiitterit ovat vähintään kaksi kertaa samasta isännästä saadun EIE:n tiitteri ja Clq-sitoutuminen jakeisiin, jotka sedimentoituvat 7S:n takana sakkaroosi-tiheysgradientti-analyysissä. Käsitteellä "kasvaimeen liittyvä" tarkoitetaan immunoglobuliineja, jotka reagoivat antigeenin kanssa, joka on suhteissa tai liittynyt kasvaimeen, mutta jota löytyy myös muissa normaaleissa kehon kudoksissa. Tällä hetkellä on tunnettua, että nämä kasvaimeen liittyvät immunoglobuliinit ovat käyttökelpoisia kasvainten löytämiseen tai hoitoon, silloinkin vaikka ne eivät ole täysin spesifisiä pelkästään tälle kasvaimelle. Tämä kasvaimeen liittyvä immunoglobuliinivalmiste voidaan tavanomaisesti valmistaa rikastusta immunoglobuliini-poistovirtauksesta (EIE), joka on saatu ko. isännän plasman pakkovirtaus-sähköforeesista altistamalla plasma joko olennaiselle pH:n nostamiselle tai olennaiselle pH:n alentamiselle verrattuna normaalin plasman pH:hon riittävän dissosioimisjakson ajaksi, kuten tässä patentti-

hakemuksessa muualla on yksityiskohtaisesti selostettu. Näin valmistetulla aineksella, kun sitä verrataan käsittelemättömään EIE:hen, on alentuneet IgG:n, IgM:n ja immuunikompleksien tasot, mutta kasvaneet kasvaimiin liittyvien vasta-aineiden tiitterit ja lisääntyneet Clq-sitoutuminen raskaasti sedimentoituvissa jakeissa.

Tuote 2: Kasvaimeen liittyvä immunoglobuliinivalmiste, jolla on kasvainmyrkyllisyyttä tehostava vaikutus ja joka on peräisin isännän, joka on normaali tai jolla on kasvain, plasmasta, joka valmiste koostuu IgG:stä ja pienistä määristä IgA:ta ja joka on pääasiallisesti vapaa IgM:stä ja komplementista ja jonka kasvaimeen liittyvän vasta-aineen tiitteri on vähintään 1,5 kertaa ko. isännän Cohn-gammaglobuliinijakeen tiitteri ja joka osoittaa lisääntyntä Clq:ta IgG:tä jakeissa, jotka sedimentoituvat 7S:n takana sakkarooosi-tiheysgradientti-analyysissä ja jolla on minimaalinen anti-komplementaarinen aktiivisuus. Kun tätä valmistetta annetaan isännille, joilla on kasvaimia ja erityisesti kasvaimia, jotka ovat samaa histologista tyyppiä kuin kasvain isännässä, josta vasta-aine on p-räisin, valmiste aiheuttaa kasvainmyrkyllisen reaktion. On ymmärrettävä, että käsite "kasvainmyrkyllinen reaktio", kuten sitä tässä käytetään, tarkoittaa, että puheena oleva aines edistää tai auttaa kasvainsolujen tappamisessa. Eräs menetelmä tämän tuotteen 2 valmistamiseksi on saada gammaglobuliinijae ihmisen tai eläimen plasmasta Cohn-fraktionoinnilla tai jollakin sen tunnetuista muunnoksista. Kun tämä aines on saatu, sitä käsitellään kuten edellä kuvattiin, jollakin dissosioimismenetelmällä, kuten happameksi tekemisellä, mitä seuraa nopea neutralointi. Verrattuna käsittelemättömään gammaglobuliini-Cohn-jakeeseen, on tässä selostetulla kasvaimeen liittyvällä immunoglobuliinivalmisteella alemmat IgG- ja IgA-tasot, lisääntynyt Clq-Sitoutuminen raskaasti sedimentoituviin jakeisiin, kohonneet kasvaimeen liittyvän vasta-aineen tasot ja pienempi anti-komplementaarinen aktiivisuus.

Tuote 3: Proteiini A-IgG-valmiste, jolla on seuraavat ominaisuudet:

- (a) Se koostuu vallitsevasti IgG:n raskaista ja keveistä ketjuista ja proteiini A:sta polyakryyliamidigeelissä sähköforeesilla;
- (b) se tunnistetaan jakeissa, jotka sedimentoituvat 7S:n takana sakkaroosi-tiheysgradientilla kasvavalla Clq-sitoutumisaktiivisuudella;
- (c) se dissosioituu pienempimolekyyllipainoisiksi Clq-sitoviksi osiksi happamissa olosuhteissa;
- (d) se on sakkautettavissa 5-%:isella polyetyleeniglykolilla;
- (e) sillä on anti-komplementaarinen aktiivisuus;
- (f) se estää Fc:stä riippuvan imusoluruusukkeen muodostumisen;
- (g) se saa neutrofiilit vapauttamaan myeloperoksidiaasia, katepsiineja ja superoksidianioneja;
- (h) se aiheuttaa koiran erytrosyyttien agglutinaation;
- (i) se aiheuttaa ei-spesifisen komplementin loppuunkulumisen;
- (j) sitä kehitetään normaalissa ja kasvainta sisältävässä seerumissa perfuusion jälkeen proteiini A-kollodiumhiili-pylväiden läpi komplementista riippumattomalla mekanismilla eikä sitä ole läsnä esikäsittelyseerumissa.

Jos spesifistä vasta-ainetta sisältävää seerumia valutetaan proteiini A-kollodiumhiilen läpi, säilyttävät proteiini A-IgG-kompleksit perfuusion jäkeisessä seerumissa edellä esitetyt ominaisuudet (a) - (j), mutta saavat ainutlaatuiset seuraavassa esitetyt ominaisuudet:

Näillä valmisteilla on havaittu olevan kasvaimeen liittyvä vasta-aine-aktiivisuus PEG:lla sakkautuvassa jakeessa. Kun proteiini-IgG-valmistetta infusoidaan isäntään, jolla on kasvain, kasvainmyrkyllisesti tehokkaassa pitoisuudessa, havaitaan kasvainmyrkyllisiä reaktioita ja kasvaimen takautumista. Spesifisiä vasta-aineita PEG:llä sakkautuvassa jakeessa on löydetty koirien, jotka on immunoitu ihmisen rintasyöpä (MCF-7):llä ja ihmisen erytrosyyteillä, seerumeissa.

Tätä jälkimmäistä koetta käytetään mallijärjestelmänä vasta-ainereaktioiden tutkimiseksi, silloinkin vaikka käytetty antigeeni ei ole kasvain-antigeeni.

On havaittu, että proteiini A-IgC konjugaattien valmistuksessa käytetty proteiini A sisältää stafylokokki-enterotoksiineja. Suoritettaessa kliinisisissä kokeissa käytetylle proteiini A-erälle natriumdokekyylisulfaatti-polakryyliamidigeelielektroforeesianalyysi (SDS-PAGE) havaittiin proteiini A-vyöhykkeen lisäksi kaksi muuta erillistä vyöhykettä, jotka vastasivat molekyylipainoja 22 000 ja 28 000. Toinen näistä vyöhykkeistä käyttäytyi elektroforeettisesti samalla tavalla kuin stafylokokkienterotoksiini A. SDS-radio-PAGE vahvisti kahden piikin läsnäolon kohdissa, jotka vastasivat molekyylipainoja noin 22 000 ja 28 000.

Tämän jälkeen alettiin systemaattisesti hakea enterotoksiineja Pharmacia:n proteiini A-valmisteista, ja kehitettiin kompetetiiviseen inhibitioon perustuvia radioimmuno-testejä enterotoksiinien A, B, C, E ja F (toksinen shokkitekijä) määrittämiseen. Lisäksi mitogeenisten määritysten avulla käyttäen kohteina ihmisen perifeerisen veren lymfosittejä testattiin kokonaisproteiini A:n sekä useiden proteiini A:n preparaattien kromatografisesti erotettujen fraktioiden aktiivisuus. Viidessä testatussa proteiini A-näytteessä havaittiin huomattavia määriä kaikkia mainittuja ja viittä enterotoksiinia, joiden määrä oli korkeintaan 2 % kokonaisproteiinimäärästä. Nämä preparaatit indusoi-
vat C^{14} :n ja tritoidun tymidiinin kiinnittymistä ihmisen perifeerisen veren lymfosyyteissä. Tämän aktiivisuuden havaittiin esiintyvän kokonaisproteiini A:n preparaattien HPLC-fraktioissa, jotka vastasivat molekyylipainoja 10 000 - 40 000, mutta ei puhtaan proteiini A:n piikissä. Neljässä näissä valmisteissa mitogeeninen aktiivisuus esiintyi pääasiassa molekyylipainoalueella 20 000 - 30 000 (enterotoksiinien molekyylipainospektri).

- Tuote 4: Kasvaimeen liittyvä immunoglobuliinivalmiste, jolla on kasvainmyrkköyllinen aktiivisuus ja joka on peräisin isännän, jolla on kasvain, plasmasta ja joka koostuu vallitsevasti IgG:stä ja IgM:stä ja jonka kasvaimeen liittyvien vasta-aineiden tiitterit ovat vähintään kaksinkertaiset isännästä saadun seerumin tiittereihin nähden, lisääntynyt Clq-sitoutuminen jakeissa, jotka sedimentoituvat 7S:n takana sakkarooši-tiheysgradientti-analyysissä, lisäys ontelotilavuudessa ja vähennys sen sisältämissä fraktioproteiineissa Sephadex G-200:lla verrattuna ko. seerumiin. Tämä valmistetaan isäntien, joilla on kasvain, seerumeista altistamalla nämä joko olennaisille pH:n lisäyksille tai alennuksille verrattuna normaaliin plasmaan tehokkaan dissosioitumisjakson ajaksi.
- 15 Verrattuna käsittelemättömään seerumiin kasvain-immuuniplasmalla on kasvaimiin liittyvien vasta-aineiden kasvaneet tiitterit, lisääntynyt Clq-sitoutuminen raskaasti sedimentoituviin jakeisiin ja lisääntyneet proteiinitasot kromatografointi C-200-ontelotilavuudessa ja alentuneet
- 20 sisällytettyjen jakeiden tasot.

Tuote 5: Tsymosan-aktivoitu plasma

- (a) Valmistettu inkuboimalla tsymosania normaalin tai kasvainta sisältävän seerumin kanssa, joka ei sisällä tsymosania, joka kehittää ääreis-vasodilataation in vivo vaikutuksia ja kouristusta aiheuttavia vaikutuksia yhtäpitävästi
- 25 komplemenettisivutuotteiden aktiivisuuden kanssa.

- Keksinnön muita aspekteja ja kohteita ovat menetelmät näiden edellä esitettyjen syövän hoitoon käyttökelpoisten uusien tuotteiden kehittämistä ja eristämistä varten.
- 30 Näitä ovat tuotteelle 1 isäntien, joilla on kasvain, rikastetun immunoglobuliinijakeen (EIE) kokoaminen pakkovirtaus-sähköforeesista, joka jae sitten tehdään happameksi tai emäksiseksi, tuotteelle 2 kasvain-imuunigammaglobuliinivalmiste, joka on valmistettu tekemällä happameksi Cohn-

Keksinnön muita ja lisäaspekteja, tavoitteita, piirteitä ja etuja annetaan läpi tämän selityksen ja patenttivaatimusten.

Kuvio 1 on virtauskaavio, joka kuvaa pakkovirtaus-sähköforeesia, joka on käyttökelpoinen valmistettaessa rikastettu immunoglobuliinipoistovirtaus (EIE).

Kuvio 2 on suurennettu osakuva pakkovirtaus-sähköforeesikennosta.

Kuvio 3 on graafinen esitys, joka kuvaa Clq:n sitoutumista sakkaroosi-tiheysgradientti-jakeisiin kasvainten sisältävien seerumien happokäsittelyn jälkeen.

Kuvio 4 on valokuva Coomassie Blue:lla värjätystä eristetyn suurmolekyylipainoisen perfuusion jälkeisen koira-IgG:n Page-profiilista.

Kuvio 5 on valokuva Coomassie Blue:lla värjätystä perfuusion jälkeisestä seerumista saadun proteiini A-eristeen Page-profiilista.

Tämä keksintö käsittää uusia tuotteita, niiden valmistamisen ja menetelmiä syövän, kuten imukudoskasvainten ja kiinteiden kasvainten hoitoon, joilla menetelmillä saadaan aikaan merkitsevää kasvainten vähentymistä.

Edullinen suoritusmuoto: Tuote 1

Pakkovirtaus-sähköforeesi (FFE) ja rikastettu immunoglobuliinipoistovirtaus (EIE)

Tuote 1 voidaan valmistaa pakkovirtaus-sähköforeesilla, mitä seuraa happameksi tekeminen ja emäksiseksi tekeminen tai muu dissosioiva menetelmä. Viitaten kuvioon 1, sisältää pakkovirtaus-sähköforeesi-kennopakka 8 muoviset päätylevyt 10, jotka pitävät koossa sarjan väliskeitä 12 (kuvio 2) ja siinä on laitteet veren ja puskurin kierrättämistä varten sekä myös kytkimet 14 tasavirran syöttämistä varten (ei näy kuviossa). Yhdensuuntaiset membraanit 16, joita väliskeit 12 pitävät paikoillaan, muodostavat sarjan kapeita kanavia, joiden poikki sähkökenttä aikaansaadaan. Osastoja on neljää eri tyyppiä: kaksi onteloa 18 päätylevyissä 10 sisältävät platinaelektrodit (eivät näy kuviossa) ja pitävät ulkopuolisen puskurikierron käynnissä: lisäkanava pitää sisäisen

puskurin kierron käynnissä; lisäkanava sisältää virtaavan veren, plasman tai seerumit ja on erotettu globuliinin ulostulosta membraanien tai suodattimien 16 avulla. Käytetyt membraanit 16 ovat Visking regeneroituja selluloosamembraaneja, jotka ovat ominaisuuksiltaan analogisia Cuprophan-membraanien kanssa, joita käytetään keinomunuaistyössä, mutta ovat mekaanisesti kestävämpiä. Fraktionointiin käytettiin pienhuokoisia suodattimia, joiden huokoisuus oli 3,0 ja 0,45 mikronia. Kaikki negatiivisesti varatut veren aineosat kulkeutuvat sähköforeettisesti mihin tahansa suuntaan vastavirtaan nestevirtaukselle. Näiden kahden vektorin tasapainomäärää fraktionoinnin laadun. Poistetun jakeen puhtaus riippuu suuresti globuliinijakeen suodatusnopeudesta ja syötettyä jännitteestä. Tavallisesti halutaan gammaglobuliinin nopein mahdollinen poistuminen ja tästä on seurauksena saastuminen muilla plasmaproteiineilla. Ellei jännitettä syötetä ollenkaan, ei hienohuokoisen suodattimen läpi tapahdu plasmaproteiinien suotautumista. Kaikissa kokeissa käytettiin kennokokoonpanoa, jossa oli neljä verivälikettä, jolloin virtaus oli yhdensuuntainen. Jokaisen välikkeen tehokas pinta-ala on 500 cm^2 . Sisäisen puskurin välikkeet ovat ruiskupuristettuja ja niissä on esiintyöntyvät rivoitetut rakenteet, jotka puristavat plasman syöttövälikkeet keskimääräiseen n. 0,030 tuuman plasmakalvon paksuuteen rajoittaen siten laitteen kokonaisplasmatilavuuden n. 200-250 ml:ksi. Vexar-suojaus estää membraanien sortumisen globuliinin ulostulo-osastossa. Paineen plasmakomponenteissa on oltava suurempi kuin minkään muun kanavan paine. 6-8 voltin/cm jännitegradientti antaa virran tiheydeksi $0,02 - 0,4 \text{ A/cm}^2$. Plasmavirtaus pidetään 15-20 ml:ssa/välike, samalla kun sisäinen verivirta on n. viisi kertaa suurempi. Gammaglobuliinin poistonopeus vaihtelee 1,5 ja 2,5 ml:n välillä välikettä kohti.

Kuvio 1 on pakkovirtaus-sähköforeesikennon virtauskaavio, joka valaisee laitteen toimintaa. Plasmaerotin 20, joka on jotakin tavanomaista tai edullista tyyppiä, on johdolla 22 yhdistetty ilmaloukkusuodattimen 24 kautta

kennopakkaan 8. Ulkopuolista puskuria pumpataan pumpulla 26 ulkopuolisesta puskurisäiliöstä 28 kennoon 8 ja jälleen takaisin, kuten yhdysviivojen nuolilla on osoitettu. Sisäpuolista puskuria pumpataan pumpulla 30 sisäpuolisen puskurin
 5 säiliöstä 32 kennoon 8 ja takaisin, kuten yhdysviivojen nuolilla on osoitettu. Ulkopuolinen puskurin ylijuuksujohto 34 on järjestetty palauttamaan ylijuuksut sisäinen puskuri sisäisen puskurin säiliöön 32.

Kennosta 8 kootaan rikastunut EIE johtoon 36 ja pump-
 10 pataan säiliöön 39 pumpulla 40. Plasma palautetaan kennosta 8 johdossa 42 ja pumpulla 44 ja esikuumennetaan plasman esikuumentimessa 46.

Tämän laitteen käyttö koiralla, jolla on itsesyntyinen syöpä, tapahtuu seuraavasti: valtimo ja laskimo kanyloidaan katetreilla tai neuloilla ja täysverta pumpataan jatkuvan virtauksen alaiseen plasma/solu-erottimeen. Tässä
 15 täysveri jaetaan muodostuneiksi elementeiksi ja plasmaksi plasma/solu-erottimella 20. Plasma pumpataan sitten FFE-kennoon 8 nopeudella 5-15 ml/minuutti. FFE-kennossa 8 plasma
 20 altistetaan sähkövirralle, kuten edellä selostettiin ja EIE kerätään säiliöön 38. FFE-kennosta 8 poistuva plasma yhdistetään sitten jälleen muodostettujen elementtien kanssa (ei näy kuviossa) ja viedään takaisin isäntään. Eräässä rutiinikäsittelyssä n. litran laskettu verimäärä viedään tämän lait-
 25 teen läpi virtausnopeudella 10-15 ml/min ja EIE:tä kerätään n. 40 ml/lb koiran painoa.

FFE:stä kerätty EIE saatetaan sitten seuraavaan biokemialliseen prosessiin: EIE:n pH titrataan 3,0:aan 10 N HCl:llä, annetaan seistä viisi minuuttia ja neutraloidaan
 30 sitten nopeasti 7,4:ään lisäämällä pisaroittain 10 N NaOH. Kaikki kehittyvä sakka poistetaan nopeasti linkoamalla 1500 X g:ssä 30 minuuttia 4°C:ssa. EIE viedään sitten 0,45 ja 5 mikronin laskostetun membraanisuolettimen läpi ja palautetaan sitten laskimonsisäisesti isäntään virtausnopeudella
 35 2 ml/minuutti.

Hapolla käsittelyn ja neutraloinnin jälkeen EIE osoittaa merkittävää lisäystä kasvaimeen liittyvissä vasta-

aineissa mitattuna epäsuoralla immunogluoresenssillä käyttäen koiran omaa kasvainta substraattina. Tulokset tästä käsittelystä on esitetty taulukossa IA. EIE:n biokemiallinen luonnehdinta happameksi tekemisen jälkeen osoittaa IgG:n, IgM:n ja immuunikompleksien tasojen alentumista mitattuna laser-sameuden mittauksella (93) verrattuna näytteisiin, joita ei ole tehty happameksi (taulukko IB). Lisäksi, kun käsittelemättömiä ja happameksi tehtyjä näytteitä saatetaan sakkaroosi-tiheysgradientti-fraktiointiin ja eri jakeet analysoidaan Clq-sitomisen suhteen, ilmestyy kohonneita Clq-sitoutumistasoja happameksi tehtyihin näytteisiin verrattuna käsittelemättömään EIE:hen jakeissa, jotka sedimentoituvat 7S-merkitsijän takana.

Taulukko IA

15 Kasvaimeen liittyvät vasta-aineet EIE:ssä, joka on saatu pakkovirtaus-sähköforeesista*

		Koiran imukudoskasvain-EIE		
Koira nro	Sairaus	Käsittelemätön EIE	Hapolla käsitelty EIE	
20	1	imukudoskasvain	20 000	100 000
	2	imukudoskasvain	10 000	130 000
	3	imukudoskasvain	20 000	120 000

* Luvut edustavat loppupisteen laimennuksia, jotka antoivat positiivisen fluoresenssin koiran omaa kasvainsubstraattia vastaan. Reaktiot käsittelemättömässä ja käsiteltyssä seerumissa koiran hemangiosarkoomaa vastaan substraattina olivat väliltä 1:10 - 1:50. Edellä mainitut reaktiot laimennettiin 1:50:een inkubointia edeltävällä konjugoimattomalla vuohi-anti-koira-IgG:llä ennen fluoreseiinillä merkityn vuohi-anti-koira-IgG:n lisäämistä.

Taulukko IB

FFE:stä saadun poistovirtauksen happameksi tekemisen vaikutukset

Koiran immuunireaktantit

EIE nro	IgG (mg/dl)		IgM (mg/dl)		Immuunikompleksit (ug Eq/ml)	
	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen
1	64,0	30,2	73,6	71,9	10,8	1,8

(Immuunireaktantit mitattu laser-sameuden mittauksella)

FFE:n ja EIE:n (hapotetun) käyttö itsesyntyisen koiran imukudoskasvaimen hoidossa (menetelmä 1, taulukko XIII)

Suurmorfologiset muutokset ja myrkyllisyys käsitte-
lyjen jälkeen

5 Kaikissa testatuissa koirissa, neljässä tunnissa sen jälkeen kun yksinkertainen plasmamäärä oli viety pakkovirtaus-sähköforeesilaitteen läpi ja koottu n. 400 ml poistovirtausta, kasvainmassat lämpenivät ja turposivat. 12 tuntia myöhemmin infusoitiin hapotettua EIE:tä (10 ml/kg) plus
10 proteiini (A):ta (8 µg/lb). Neljässä tunnissa imusolmukkeet tulivat vieläkin ylilämpöisemmiksi ja turvonneiksi. 48 tuntia myöhemmin eläimille annettiin L-asparaginaasia ja syklofosfamidia. Seuraavina päivinä havaitut kasvaintakautumat saavuttivat tasoja, jotka olivat 66-95 % alle tasojen ennen
15 perfuusiota ja ne kestivät 15 päivästä viiteen kuukauteen keskiarvon ollessa 45 päivää. Koirissa, joita oli käsitelty FFE:llä ja joille oli annettu hapotettua EIE:tä plus proteiini A:ta, oli 20-35 %:n takautumat, jotka kestivät keskimäärin 6-8 päivää. Eläinten, jotka saivat pelkästään L-aspara-
20 ginaasia ja syklofosfamidia, takautumiset olivat 18-25 % ja ne kestivät vain 8-10 päivää. Koirilla, jotka saivat pelkästään proteiinia A, ei esiintynyt merkittävää takautumista. Siten kasvainta tappava vaste oli olennaisesti suurempi niille eläimille, jotka saivat koko hoidon, verrattuna pel-
25 kästään immunoterapeuttiseen tai kemoterapeuttiseen ohjelmaan. Tulokset on esitetty taulukossa II.

 Kaikissa koirissa havaittiin 103-107°C:n lämpötilan nousuja pian sähköforeesikäsitteilyn jälkeen, jotka nousut yleensä palautuivat kuudessa tunnissa perfuusion jälkeen.
30 Kuumeisten jaksojen aikana otetun veren viljelyt neljästä koirasta eivät osoittaneet bakteerikasvua.

Mikroskooppiset muutokset eri väliajoin FFE:n, EIE:n (hapotetun) ja kemoterapian jälkeen

 Koepaloja otettiin kaikista eläimistä eri väliajoin
35 käsitteilyn jälkeen. Koepaloissa, jotka olivat otettu koirista käsitteilyn jälkeen FFE:llä ajankohtana, jolloin imusolmukkeet olivat turvonneet, esiintyi näyttöä tumien tiivis-

tymisestä, soluliman jyväistymisestä ja solujen välisten tilojen laajentumisesta. Tulehdukselliset solut eivät olleet silmiinpistäviä näissä näytteissä tänä ajankohtana. Koekappaleet, jotka oli saatu hapotetun EIE:n ja proteiini A:n antamisen jälkeen, osoittivat korostuneempia muutoksia kasvaimissa, mistä esimerkkeinä soluliman pullistuminen, solulimasisällön liikaläpikuultavuus, kromatiinin ja tumajyvästen paakkuuntuminen solujen välisten tilojen samalla samentuessa, löydökset, jotka viittaavat lähes tappaviin ja kuolettaviin muutoksiin kasvainsoluissa. Tulehduksellista solun tiivistymistä esiintyi vähäisesti. Koepaloissa, jotka oli otettu n. seitsemän päivää käsittelyn alkamisen jälkeen, havaittiin näyttöä laajasta kuolleisuudesta pahanlaatuisissa imusolmukkeissa, todistuksin kasvainsolujen varjoista ja pesäketiivistymisestä neutrofiilien vaikutuksesta.

Kasvaimiin liittyvät vasta-aineet, C'3 ja immunoglobuliinitasot käsittelyn jälkeen

Ennen käsittelyä kasvaimiin liittyviä vasta-aineita ei joko voitu havaita tai ne olivat havaittavissa ainoastaan isäntien, joilla oli syöpä, seerumeissa. 12 tuntia käsittelystä pakkovirtaus-sähköforeesilla kasvaimiin liittyvät vasta-aineet olivat lisääntyneet mitattuna immunofluoresenssilla. Tätä ei ilmaistu edelleen lukuina, koska eläimille annettiin passiivisesti EIE:tä, joka sisälsi kasvaimiin liittyviä vasta-aineita. Seerumin C3- ja IgG-tasot laskivat 12 tuntia pakkovirtaussähköforeesikäsittelyn jälkeen kaikissa testatuissa koirissa, mutta palautuivat takaisin esikäsittelyarvojen yläpuolelle seuraavan 48 tunnin aikana. Immunoglobuliini-M-tasot eivät muuttuneet merkittävästi.

Hematologiset ja serologiset muutokset

Valkoverisolujen arviointi, verihiutaleluvut ja verisolujen tilavuusarvot eivät osoittaneet merkittäviä muutoksia näissä parametreissa ennen ja jälkeen 4-päiväisen hoito-ohjelman. Lisäksi seerumin natriumissa, kaliumissa, kloridissa, kalsiumissa, fosforissa, SGPT:ssa, SGOT:ssa, BUN:ssa tai kreatiniinissa ei esiintynyt merkittäviä muutoksia käsittelyn jälkeen.

Taulukko II
Vasteet immunokemoterapialle

Koiran nro	Kasvain (Histologia)	Rotu	Pakkovirtaus-sähköforeesi EIE (hapotettu), proteiini A syklo- fosfamidi-L-asparaginaasi				Syklofosfamidi-L-asparaginaasi			
			Kaksiulottei- nen tuote PreTX	Kasvain- vähenty- mä (%) PostTX	Lieventy- misen kes- toaika (pv)	Kasvain- vähenty- mä (%) PostTX	Kaksiulottei- nen tuote PreTX	Kasvain- vähenty- mä (%) PostTX	Lieventy- misen kes- toaika (pv)	Lieventy- misen kes- toaika (pv)
1	Histosyyt- tinen imuku- doskasvain	Tanskan- doggi	170,2	23,5	86,2	16	149,8	112,6	24,8	8
2	Lymfösytti- nen imuku- doskasvain	Saksanpai- menkoira	86,2	19,8	77,0	41	150,2	83,1	44,7	17
3	Histosyyt- tinen	Doberman	165,7	53,8	67,5	21	94,1	72,6	22,8	9
4	Histosyyt- tinen imuku- doskasvain	Saksanpai- menkoira	52,0	4,3	91,7	121+				
5	Histosyyt- tinen imuku- doskasvain	Afgaani- uros	110,8	9,7	91,2	30				
6	Histosyyt- tinen imuku- doskasvain	Saksan- paimen- koira	107,7	28,1	73,9	20				

Edullinen suoritusmuoto: Tuote 2

Kasvain-immunoglobuliini-valmiste

Tuote 2 (Kasvain-immunoglobuliini-valmiste) on sopiva laskimonsisäistä käyttöä varten ja voidaan valmistaa isäntien, joilla on kasvain, seerumeista modifioimalla menetelmiä, jotka aikaisemmin ovat kuvanneet Cohn, et al. (94) sekä Kistler ja Nitschann (95). Menetelmä on esitetty kaavamaisessa muodossa taulukossa III.

Plasman fraktiointimenetelmä esitetään seuraavasti:

10 Plasmalähde

Plasma oli peräisin ihmispotilaiden ääreistäysverestä. Saatiin n. 500 ml happameen sitraattidekstroosiin kerättyä plasmaa ja se selkeytettiin linkoamalla nopeudella 2 600 g 20 minuuttia 0°C:ssa.

15 Sakan 1 valmistus:

Selkeytetyn plasman pH määritetään ja asetetaan 7,2:een, jos on tarpeen, lisäämällä 0,8 M natriumasetaatti pH 4,0 puskuria pitäen lämpötila 0°C:ssa.

20 46 ml kylmää 95-%:ista etanolia lisätään hitaasti selkeytettyyn plasmaan etanolin loppupitoisuuden 8 % saavuttamiseksi. Suspensiota jäähdytetään lisäämisen aikana 0°C:n lämpötilan saavuttamiseksi. Näkyvä sakka, joka koostuu suurimmaksi osaksi fibrinogeenistä, poistetaan linkoamalla 2 600 g:ssä 20 minuuttia 0-4°C:ssa. Poistettua tahnaa nimetään sakaksi 1.

25

Taulukko III

Menetelmä anti-kasvain-IgG:n valmistamiseksi

Plasma

5	Asetetaan 0°C:ssa pH 7,2:een 0,8 M NaC ₂ H ₃ O ₂ :lla. Lisätään CH ₃ CH ₂ OH 8 %:ksi käyttäen 95-%:ista CH ₃ CH ₂ OH	
	Lingotaan 2600 g:ssä 25 min 0°C:ssa	
	Päällä oleva neste 1	Sakka 1 (Fibrinogeeni)
10	Asetetaan -5°C:ssa pH 5,8:aan 0,8 M NaC ₂ H ₃ O ₂ :lla. Lisätään CH ₃ CH ₂ OH 19 %:ksi käyttäen 95-%:ista	
	Lingotaan 6000 g:ssä 25 min 0°C:ssa	
15	Päällä oleva neste 2	Sakka 2
20	Suspendoidaan 10 ml:aan jäävettä/g sakkaa. Asetetaan pH 4,8:aan puskurilla A. Lisätään puskuria B ioniväkevyyden aset- tamiseksi seuraavassa suhteessa. 4,85 ml B:tä/g sakkaa miinus pH:n asetta- miseksi lisätty määrä puskuria A. Asetetaan pH 5,1:een puskurilla C. Lisätään puskuria D ioniväkevyyden aset- tamiseksi seuraavassa suhteessa. 4,9 ml D:tä/g sakkaa miinus pH:n asetuk- seen käytetty määrä puskuria C. Laimennetaan 19,5 ml:ksi/g sakkaa (ko- konaistilavuus) jäävedellä. Lisätään CH ₃ CH ₂ OH 12 %:ksi käyttäen 95-%:ista CH ₃ CH ₂ OH. Kokonaisioniväkevyys -0,01, pidetään 0°C:ssa 30 min.	
25		
30		
	Lingotaan 14 000 g:ssä 25 min 0°C:ssa	
	Päällä oleva neste 3	Sakka 3
35	Nostetaan ioniväkevyys 0,04:ään NaCl:llä. Asetetaan pH 7,2:een 1 N NaOH:lla -7°C:ssa Lisätään CH ₃ CH ₂ OH 25 %:ksi käyttäen 95-%:ista CH ₃ CH ₂ OH. Sekoitetaan 30 min -7°C:ssa.	
40	Lingotaan 15 000 g:ssä 30 min -7°C:ssa	
	Päällä oleva neste 4	Sakka 4-γ-globuliini
45	Suspendoidaan uudelleen PBS:ään. Tehdään 0,3 M:ksi glysiinissä. Asete- taan pH 2,5:een 0,1 N HCl:lla. Inkuboidaan huoneen lämpötilassa 5 min. Neutraloidaan pH 7,3:een 0,1 N NaOH:lla. Suodatetaan - tiputetaan laskimonsisäi- sesti 5 ml/min (suodatus 20 mikronin "High Capacity Transfusion Filter" -suodattimella)	

Sakan 2 valmistus

2 ml:n tasaosa sakan 1 päällä olevaa nestettä titra-
taan pH 5,8:aan 0,8 M natriumasetaatilla, pH 4,0, natriumase-
taatti-puskurimäärän määrittämiseksi, joka tarvitaan anta-
5 maan pH 5,8 päällä olevan nesteen suspensioon. Kokonaissus-
pensio asetetaan sitten pH 5,8:aan samalla puskurilla.

N. 72 ml kylmää 95-%:ista etanolia lisätään suspen-
sioon, jonka pH on 5,8, antamaan etanolin loppupitoisuudeksi
19 %. Suspensio jäädytetään lisäämisen aikana -5°C :seen.
10 Suspensiota sekoitetaan heikosti 30 minuuttia, mitä seuraa
etanolilisäyksen loppuunsaorittaminen ja liuoksen pH pide-
tään 5,8:ssa. Suspensiota lingotaan 6000 X g:ssä 25 minuut-
tia 0°C :ssa.

Pasta korjataan sentrifugimaljoista ja punnitaan. Tä-
15 mä pasta nimetään sakaksi 2.

Sakan päällä olevan nesteen 3 valmistus

Sakkapasta 2 suspendoidaan uudelleen 10 ml:aan jäävet-
tä grammaa kohti sakkaa. N. 25 %:n vedestä tulisi olla hie-
nojen jääkiteiden muodossa. Tämän suspension annetaan tulla
20 aivan tasaiseksi. Suspension pH asetetaan 4,8:aan lisäämällä
pH 4,0-puskuria, joka koostuu 1 tilavuusosasta 0,05 M Na_2HPO_4
ja 6 tilavuusosasta 0,05 M etikkahappoa (puskuri A). Ioni-
väkevyyttä nostetaan sitten lisäämällä pH 4,8-puskuria, joka
koostuu yhdestä tilavuusosasta 0,05 M etikkahappoa (puskuri
25 B). Tämän puskurin tarvittava määrä on 4,85 ml grammaa kohti
sakkaa 2 miinus pH 4,0 puskuri A:n, joka lisättiin aikaisem-
min pH-asetusta varten, tilavuus.

Fraktionointia varten suspension pH nostetaan sitten
pH 5,1:een lisäämällä pH 6,2-puskuria, joka koostuu 1 tila-
30 vuusosasta 0,05 M Na_2HPO_4 ja 0,833 tilavuusosasta 0,05 M
etikkahappoa (puskuri C). Ioniväkevyyys asetetaan sitten uu-
delleen lisäämällä pH 5,1-puskuria, joka koostuu 1 tilavuus-
osasta 0,05 M Na_2HPO_4 ja 1,25 tilavuusosasta 0,05 M etikka-
happoa (puskuri D). Puskurin D tarvittava määrä on 4,9 ml
35 grammaa kohti sakkaa 2 miinus pH-asetukseen käytetyn pusku-
rin C tilavuus. Lopuksi suspensio laimennetaan 19,5 ml:n
kokonaistilavuuteen grammaa kohti sakkaa 2 jäävedellä.

Sitten suspensioon lisätään kylmää 95-%:ista etanolia 12 %:n kokonaisetanolipitoisuuden saavuttamiseksi. Suspensiota pidetään 0°C:ssa 30 minuuttia, mitä seuraa linkoaminen 14 000 X g:ssä 25 minuuttia 0°C:ssa. Sakka hylätään ja päällä oleva neste säästetään ja nimitetään päällä olevaksi nesteeksi 3.

Gammaglobuliinisakan valmistus

Päällä olevan nesteen 3 ioniväkevyys nostetaan sitten 0,04:ään väkevällä NaCl:llä käyttäen suolan suhteellisen joh-
10 tokyvyn mittaria.

2 ml:n tasaosa sakan päällä olevaa nestettä 3 titra-
taan pH 7,2:een 1N NaOH:lla 1N NaOH-määrän määrittämiseksi,
joka tarvitaan koko suspension pH:n asettamiseen. 1N NaOH
lisätään sitten suspensioon sopivassa määrässä pH:n asetta-
15 miseksi 7,2:een.

Sitten lisätään 92-%:ista etanolia 25 %:n kokonais-
etanolipitoisuuden saavuttamiseksi. Suspensio jäähdytetään
-7°C:seen tämän lisäyksen aikana. Suspensiota sekoitetaan
varoen 30 minuuttia -7°C:ssa, mitä seuraa linkoaminen
20 15 000 X g:ssä 30 minuuttia -7°C:ssa. Tässä saatu sakka on
haluttu gammaglobuliinijae.

Kasvainimmunoglobuliinin valmistus

Gammaglobuliinia sisältävä tahna suspendoidaan uudel-
leen fosfaatilla puskuroituun suolaliuokseen (PBS) ja tehdään
25 0,3 M:ksi glysiinipuskurissa. pH alennetaan sitten 2,5:een
0,1N HCl:llä. Suspensiota inkuboidaan sitten viisi minuuttia
27°C:ssa, mitä seuraa neutralointi pH 7,3:een 0,1N NaOH:lla.
Valmiste viedään sitten 2 mikronin suodattimen läpi ja anne-
taan laskimonsisäisesti nopeudella 5 ml/min.

30 Kasvainimmunoglobuliinin fysikaaliskemialliset ominai-
suudet

Kasvainimmunoglobuliini (hapotettu Cohn-jae), analy-
soituna lasersameuden määrittäyksellä (93), koostuu IgG:stä ja
pienestä määrästä IgA, mutta ei sisällä IgM tai C3. Verrat-
35 tuna Cohn-jakeeseen, jota ei ole hapotettu, on IgG:tä ja
IgA:ta vähemmän (taulukko IV).

Taulukko IV

Hapottamisen vaikutus Cohn-jakeen koostumukseen*

Seerumilähde	IgG (mg/dl)		IgA (mg/dl)		IgM (mg/dl)		C3 (mg/dl)	
	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen
rintasyöpä	1 032	960	25,1	19	0	0	0	0
normaali	5 904	3 192	41,0	32,8	0	0	0	0

Tutkimukset suoritettu lasersameuden määrittelyksellä, kuten edellä kuvattiin (96).

Kasvaimeen liittyvät vasta-aineet analysoitiin kummassakin kahdesta panoksesta kasvainimmunoglobuliinia, jotka oli saatu kahdesta ihmisestä, joilla oli rintarauhassyöpä. Käyttäen epäsuoraa immunofluoresenssiä kahta rintasyöpä-substraattia vastaan, ylittivät loppupiste-fluoresenssin tiitterit 1:70 000 kummassakin testatussa näytteessä. Samojen panosten hapottamattomien näytteiden loppupiste-tiitterit olivat alle 1:50 000.

Kasvain-immunoglobuliini testattiin kasvainspesifisen sitoutumisen suhteen MCF-7 rintarauhassyöpäsoluihin radioimmunoanalyysillä jakeissa, jotka oli saatu sakkaroositiheysgradientista ja verrattiin jakeisiin hapottamattomasta Cohn-jakeesta. Kasvainimmunoglobuliini osoitti kasvaimeen liittyvän sitomisaktiivisuuden lisäystä jakeissa 7S-merkit-sijän toisella puolella. Samalla tavalla Clq-sitoutuminen lisääntyi jakeissa, jotka olivat suurempia kuin 7S, verrattuna hapottamattomiin jakeisiin (kuvio 3). Siten sekä kasvaimeen liittyvä sitoutuminen että Clq-sitoutuminen vaihtuu raskaisiin (>7S) sedimentoituviin jakeisiin hapottamisen jälkeen kasvainimmunoglobuliinissa. Kasvainimmunoglobuliini anti-komplementaarinen vaikutus testattuna Romer'in et al. menetelmällä (96) oli pienempi kuin hapottamattomalle jakeelle alueella, joka oli verrattavissa muiden laskimonsisäisten gammaglobuliinivalmisteiden alueeseen (taulukko V).

25 Taulukko V

Hapotetun Cohn-jakeen antikomplementaarinen aktiivisuus

Proteiinipitoisuus (mg)	Hemolyysi (%)			
	Rintasyöpä		Normaali	
	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen
1,0	3	75	2	10
0,5	10	85	4	35
0,25	12	88	14	53

Tutkimukset suoritettu Romer'in menetelmällä (96).
 35 Positiivinen verrokki ilman seerumeita aiheutti 100 %:n hemolyysin. Yhteenkasautunut IgG aiheutti anti-komplementaarisen aktiivisuuden, joka oli pienempi kuin 1.

Autologista kasvainta sisältävistä seerumeista valmistetun kasvainimmunoglobuliinin toimintakyky osoitettiin 400-500 mg:n infuusion jälkeen yhdessä tsymosanilla aktivoidun normaali-koiraseerumin (menetelmä 3, taulukko XIV) kanssa isäntiin, joilla oli kasvain. Pian infuusion jälkeen kah-
 5 teen koiraan, joista toisella oli itsesyntyinen nisärauhassyöpä ja toisella melanooma, havaittiin kasvainkohtien akuuttia kuolleisuutta, jota luonnehti verentungos ja kasvaimen haavautuneiden alueiden suurkuolleisuus. Mikroskooppisesti
 10 kasvainkohdissa näkyi kasvainsolujen hajakuolleisuutta sekä pesäkealueiden neutrofiiliä tiivistymistä.

Eduellinen suoritusmuoto: Tuote 3

Proteiini A-IgG-valmiste

Proteiini A-IgG-komplekseja (tuote 3) voidaan valmistaa perfusoimalla 5-50 ml plasmaa isännistä, joilla on syöpä tai normaaliplasmaa proteiini A:n ylitse *Staphylococcus aureus* Cowans I:stä (joka sisältää 1,0 mg liikkumattomaksi tehtyä proteiinia A) tehtynä liikkumattomaksi kolloidiumhiilessä tai voidaan eristää poistovirtausseerumeista lisäämäl-
 15 lä 5 % polyetyleeniglykolia tai muilla alaan perehtyneiden tuntemilla menetelmillä suurmolekyyllipainoisen proteiinin saostamiseksi. Saatu sakka suspendoidaan uudelleen normaaliin suolaliuokseen ja dialysoidaan fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta vastaan, minkä jälkeen se annetaan laskimonsi-
 20 säisesti isännille, joilla on kasvain. Menetelmä on esitetty taulukossa VI.

Taulukko VI

Polyetyleeniglykoli-saostusmenetelmä proteiini A-IgG-kompleksien eristämiseksi

- 30 1. 3 ml seerumia tai plasmaa, joka poistuu proteiini A-kolloidiumhiilipylväistä, sekoitetaan 1 ml:n kanssa 20-%:ista PEG (PEG 6000, Fisher Scientific Co., Fairlawn, NJ) ja inkuvoidaan 25°C:ssa 1 tunti.
2. PEG-sakka saadaan linkoamalla 3 000 X g:ssä 4°C:ssa, se
 35 pestään kahdesti 5-%:isessa PEG, liuotetaan PBS:ään ja dialysoidaan laajasti PBS:ää vastaan 4°C:ssa.

Proteiini A-IgG-komplekseja voidaan valmistaa käyttämättä proteiini A-kollodiumhiilipylväitä inkuboimalla proteiini A:ta (10 - 1 000 μ g) normaalin seerumin tai plasman (1-3 ml) tai IgG:n (1-10 mg) kanssa 30 minuuttia 27°C:ssa .
 5 lisäten ylimääräinen annos (5-10 ml) normaalia suolaliuosta ja infusoimalla sitten tämä seos laskimonsisäisesti isäntiin, joilla on kasvain. Seuraavassa taulukossa VII esitetään vielä eräs menetelmä proteiini A-IgG-kompleksien valmistamiseksi.

Taulukko VII

10 Proteiini A-IgG-kompleksien valmistus

1. Proteiini A:ta (10 - 1 000 μ g) inkuboidaan 1-10 mg:n kanssa IgG:tä PBS:ssä 30 minuuttia.
2. PEG:tä lisätään 27°C:ssa 5 %:n loppupitoisuuteen ja seosta lingotaan 5 000 X g:ssä 30 minuuttia 4°C:ssa.
- 15 3. Sakka suspendoidaan uudelleen 20 ml:aan suolaliuosta ja dialysoidaan PBS:ää vastaan kaksi tuntia PEG:n poistamiseksi.
4. Liuos saatetaan 5-10 ml:n lopputilavuuteen ja injektoidaan laskimonsisäisesti.

20 Proteiini A-IgG-kompleksin, jotka poistuvat proteiini A-kollodiumhiili (PACC)-pylväistä tai liikkumattomaksi tehdyn Staphylococcus aureus Cowans 1 (SpA):n pylväistä (SAC), fysikaaliskemialliset ominaispiirteet

Seerumeita koirista, joilla oli itsesyntyinen nisäsyöpä, perfusoiitiin SpA:n ylitse, joka oli tehty liikkumattomaksi mikrohuokoisella membraanisuodatimella (0,2 mikronia) tai proteiini A-kollodiumhiilen ylitse. Havaittiin seuraavaa.

Tulokset

30 Clq-sitoutumisen muutokset seerumeissa perfuusion jälkeen SAC:n tai PACC:n läpi

Seerumeita viidestä normaalisti koirasta ja kuudesta koirasta, joilla oli nisärauhassyöpä, perfusoiitiin SAC:n läpi ja näytteitä ennen ja jälkeen perfusoinnin analysoitiin
 35 Clq-sitoutumisaktiivisuustasojen suhteen radioimmunoanalyysillä, kuten on selostettu. Clq-sitoutumisessa oli tapahtunut yhtäpitävää lisäystä yli arvojen ennen käsittelyä

(taulukko VIII). Pieneneminen Clq-sitoutumisessa aluksi saattaa edustaa laimentumisvaikutusta ja/tai Clq:ta sitovien immuunikompleksien ja IgG:n poistumista proteiini A-kolloidiumhiilipylvään (PACC) vaikutuksesta. Yleensä Clq-sitoutumisen tasot kasvainta sisältävään seerumiin ennen perfuusiota olivat korkeammat kuin normaalissa seerumissa ennen perfuusiota ja nettolisäykset kasvainta sisältävissä seerumeissa olivat suurempia (keskimääräinen lisäys: 382 ± 378 S.D. μg ACG ekvivalenttia/ml) kuin normaalille seerumille (keskimääräinen lisäys: 114 ± 186 S.D. μg ACG-ekvivalenttia).

Vastakohtana havaituille lisäyksille Clq-sitoutumisaktiivisuudessa seerumiin, joka oli perfusoitu SAC:n läpi, koiraiIgG-pitoisuudet olivat tasaisesti alentuneet alle tasojen ennen perfuusiota samoin kuin IgM:n tasot perfuusion jälkeen

(taulukko VIII).

Taulukko VIII

Muutokset Clq-sitomisessa seerumin perfuusion jälkeen liikkumattomaksi tehdyn SpA:n läpi

Näyte nro	Ennen	Testattujen jakei- den nro	Jälkeen	Nettolisäys* (μ g ACG-ekvivalentteja)
Normaali koiran seerumi				
1	40	8		480
2	16	4		22
3	16	4		62
4	19	4		-5
5	14	4		6
Kasvainseerumi				Keskim. 114 $\pm$ 186
1	60	8		
2	87	6		831
3	37	8		987
4	41	4		4
5	48	4		132
6	70	4		103
				243
				Keskim. 382 $\pm$ 378

*Arvot ennen perfuusiota kerrottiin kerättyjen jakeiden lukumäärällä poistovirtauksessa ja vähennettiin kumulatiivisista ACG-ekvivalenteista näissä jakeissa. 100 ml normaalia tai kasvainta sisältävää seerumia perfusoiitiin SAC:n läpi ja koottiin 1 ml:n jakeita ja ne testattiin Clq-sitomisaktiivisuuden suhteen

- Sen määrittämiseksi, olisiko proteiini A SAC:lla tärkeä lisääntyneen Clq-sitoutumisen kehittymisessä, perfusoi-
tiin seerumeita normaalista koirista ja koirista, joilla oli
nisärauhassyöpä, SAC:n läpi tai Staphylococcus aureus -kannan
5 Wood 46 (SAW), josta proteiini A puuttui, läpi kuten kohdas-
sa "Menetelmät" on esitetty ja poistovirtausnäytteet testat-
tiin Clq-sitoutumisen suhteen. Näytteet, jotka poistuivat
SAC-pylväistä, osoittivat lisäystä Clq-sitoutumistasoissa
yli arvojen ennen perfuusiota, kun taas poistovirtausnäyt-
10 teet SAW-pylväistä osoittivat minimaalisia muutoksia tasois-
ta ennen käsittelyä. Samoin kuin edellisissä tutkimuksissa
aleneminen alussa Clq-sitoutumisessa heijasteli osittain
laimennuksellisia vaikutuksia ja immuunikompleksin poistu-
mista SAC:n tai SAW:n vaikutuksesta.
- 15 Seerumeita normaaleista koirista ja koirista, joilla
oli nisärauhassyöpä, perfusoi-
tiin PACC:n läpi, kuten Mene-
telmissä kuvattiin. Seitsemässä seitsemästä kasvainta sisäl-
tävästä seerumista ja viidessä seitsemästä normaaliseerumis-
ta tapahtui Clq-sitoutumisen lisääntymistä poistovirtaussee-
20 rumeissa (taulukko IX). Vastakohtana perfuusiolle SAC:n läpi
IgG-, IgM- ja IgA-tasoissa seerumeissa, jotka oli perfusoi-
tu PACC:n läpi, ei tapahtunut merkittäviä muutoksia (tauluk-
ko IX).

Taulukko IX

Kiintofaasi-Clq-sitoutuminen* ennen ja jälkeen seerumien perfuusiota PACC:n läpi

Nro Normaaliseerumit				Nro Kasvainta sisältävät seerumit			
5	1	ennen	50,9 (59-51,8)	1	ennen	60,5 (57,2-62,8)	
		jälkeen	65,3 (62,6-68,8)		jälkeen	73,0 (66,9-81,1)	
	2	ennen	43,6 (35,4-47,4)	2	ennen	49,7 (45,1-52,2)	
		jälkeen	63,2 (59,0-67,4)		jälkeen	69,6 (58,4-80,0)	
10	3	ennen	58,9 (57,3-60,6)	3	ennen	50,0 (49,5-51,0)	
		jälkeen	63,3 (60,0-66,7)		jälkeen	57,0 (54,8-59,2)	
	4	ennen	50,2 (43,6-53,0)	4	ennen	42,2 (36,8-46,5)	
		jälkeen	52,1 (47,9-55,2)		jälkeen	56,7 (53,9-59,5)	
	5	ennen	41,7 (39,7-43,7)	5	ennen	28,6 (26,8-30,5)	
		jälkeen	55,8 (55,0-56,7)		jälkeen	34,8 (32,6-37,1)	
15	6	ennen	26,9 (25,4-28,5)	6	ennen	32 (32,0-32,1)	
		jälkeen	33,8 (33,7-33,9)		jälkeen	36,8 (34,5-39,1)	
	7	ennen	29,6 (27,9-31,3)	7	ennen	31,4 (31,1-31,8)	
		jälkeen	30,8 (30,1-30,6)		jälkeen	53,9 (52,7-55,1)	

*10 ml normaalia tai kasvainta sisältäviä seerumeita vietiin

20 PACC:n läpi ja seerumit ennen ja jälkeen käsittelyn analysoitiin kiintofaasi-Clq-sitoutumisen suhteen. Clq-sitoutuminen ilmaistaan nanogrammin sidottua anti-koira-IgG. Luvut edustavat keskimääräistä tilavuutta kaksois- tai kolmoisnäytteistä. Sulkeissa olevat luvut osoittavat äärimmäiset arvot kaksois- tai kolmoisnäytteistä.

Kompleksien, jotka ovat kehittyneet seerumeissa perfuusion jälkeen PACC:n läpi, osittainen luonnehdinta

30 Koska proteiini A:n on osoitettu sitovan koira-IgM:ää ja IgA:ta, testattiin näiden komponenttien sekä myös IgG:n ja C3:n suhteen komplekseissa seerumien perfuusion jälkeen. Tätä tarkoitusta varten seerumeita ennen ja jälkeen perfuusion inkuboitiin Clq:lla päällystettyjen putkien kanssa kompleksien sitomiseksi. Verrokkina inkuboitiin seerumia, joka oli perfusoitu koira-albumiinin läpi eikä proteiini A:n

35 läpi, joka oli tehty liikkumattomaksi kollodiumhiilessä, samalla tavalla Clq:lla päällystettyjen putkien kanssa. Putket pestiin ja ylimääräiset 125_I F(ab')_2 -osasia, jotka

olivat spesifisiä koiran IgG:lle, IgM:lle, IgA:lle, lisät-
 tiin ja sitoutunut radioaktiivisuus mitattiin. Anti-IgG:n
 ja anti-IgM:n perfuusion jälkeiset sitoutumistasot nousivat
 n. 20 % arvojen ylitse ennen perfuusiota, mutta anti-IgA-
 5 tai anti-C3-sitoutumisessa ei ollut merkittäviä muutoksia.
 Tulokset olivat samanlaisia kasvainta sisältäville ja nor-
 maaleille seerumeille ja samanlaiset lisäykset anti-IgG-si-
 tomisaktiivisuudessa havaittiin perfuusion jälkeisissä see-
 rumeissa ylimääräisestä kasvaimen omaavasta ja normaalista
 10 koirasta. Sen sijaan IgG-sitomisaktiivisuus pieneni 15 %:lla
 seerumissa, joka oli perfusoitu koira-albumiinin läpi, sa-
 malla kun muiden komponenttien sitoutuminen oli pääasialli-
 sestä muuttumaton.

Normaalia ja kasvainta sisältävää ihmisen seerumia
 15 vietiin samalla tavalla PACC:n läpi, inkuboitiin Clq:lla
 päällystetyissä putkissa ja testattiin 125_I F(ab')₂-osas-
 ten sitomisen suhteen, jotka ovat spesifisiä ihmisen IgG:lle,
 IgM:lle, IgA:lle ja C3:lle. Tulokset osoittavat lisäyksiä
 anti-IgG-, IgM- ja C3-sitomisessa, mutta ei IgA-sitomisessa.

20 Seerumeissa perfuusion jälkeen PACC:n läpi kehitty-
 neen Clq:ta sitovan IgG:n sedimentoitumisominaisuuksien tut-
 kimiseksi poistovirtausnäytteitä ennen ja jälkeen perfuusion
 normaaleista ja kasvainta sisältävistä seerumeista lingot-
 tiin ultrasentrifugilla sakkaroosi-tiheysgradien-
 teissa ja
 25 jakeet analysoitiin Clq:ta sitovan IgG:n suhteen. Molemmat
 seerumit osoittivat nousseita Clq:ta sitovan IgG:n tasoja
 jakeissa, jotka olivat suurempia kuin 7S, verrattuna vastaa-
 viin jakeisiin seerumeista ennen perfuusiota. Samanlaisia
 lisäyksiä Clq-sitoutumisessa näihin gradienttijakeisiin ha-
 30 vaittiin, kun F(ab')₂-osasia, jotka olivat spesifisiä koira-
 IgG-gammaketjuille, käytettiin sidotun IgG:n havaitsemiseen.

Suurmolekyylipainoiset IgG-kompleksit perfuusion jäl-
 keisissä koiraseerumeissa eristettiin sitten fraktionoimal-
 la kromatografisesti G-200-pylväällä ja viemällä onteloti-
 35 lavuuden suhteen huippujakeet immunoabsorbentin läpi, joka
 sisältää gammaketjulle spesifistä kaniini-anti-koira-IgG:tä.
 Pidättynyt proteiini eluoitiin, neutraloitiin, väkevöitiin

ja pelkistettiin ennen analyysiä PAGE:lla. PAGE-profiilit, jotka oli värjätty Coomassia Blue'lla paljastivat selvästi 50 000 ja 25 000 molekyylipainoisten polypeptidien mukana-

5 kulkemisen koira-IgG:n gamma- ja kevytketjujen kanssa. Havaittiin myös kevyesti värjäytynyt polypeptidi, jonka molekyylipaino oli 75 000 ja joka kulki yhdessä koira-IgM:n mu immunoglobuliiniketjun kanssa ja se edustaa todennäköisesti eristetyssä kompleksissa läsnäolevaa koira-IgM:ää. 10 μ g eristettyjä suurmolekyylipainoisia IgG-komplekseja, jotka

10 oli tutkittu kaksoisdiffuusio-tutkimuksissa, osoittivat yksinkertaisen presipitiininauhan vuohi-anti-koira-täysseerumin kanssa, joka muodosti yhtäpitävän viivan gammaketjulle spesifisen kaniini-anti-koira-IgG:n kanssa. Nämä tutkimukset osoittivat, että suurmolekyylipainoinen laji, joka si-

15 sältää koira-IgG:tä ja IgM:ää, muodostui seerumien perfuusion aikana PACC:n läpi.

Proteiini A:n vapauttaminen PACC:sta seerumilla ja seerumikomponenteilla

Vaikka suurmolekyylipainoista Clq:ta sitovaa IgG:tä

20 muodostui seerumin perfuusion aikana PACC:n läpi, ei eluaattien PAGE-analyyyseillä pystytty paljastamaan nauhaa, joka voitaisiin täysin selvästi luonnehtia proteiini A:ksi, koska autenttinen proteiini A kulkeutuu asemaan, joka miltei sattuu yhteen koira-gamma-ketjujen kanssa. Sen tähden proteiini

25 A:n vapautumista seerumiin perfuusion aikana tutkittiin käyttäen pieniä määriä merkittyä ^{125}I -proteiini A:ta PACC:ssa merkkiaineena. Tulokset osoittavat, että ^{125}I -proteiini A:ta vapautui PACC:sta seerumien perfuusiolla samoin kuin albuminin tai IgG:n, kolmesta eri lajista, liuoksista perfu-

30 soimalla. Lisäksi eluointi ei ollut spesifinen proteiinille A, koska samat liuokset vapauttivat myös ^{125}I -koira-albumiinia, joka oli tehty liikkumattomaksi kolloidiumhiilessä samalla tavalla kuin proteiini A. PACC:sta vapautuneen radioaktiivisuuden määrän perusteella arvioitiin, että 0,0025 -

35 0,005 mg (0,25 - 0,5 %) proteiinia A desorboitui 1 mg:sta liikkumattomaksi tehtyä proteiinia A 10 ml:n seerumia perfuusion jälkeen.

Proteiini A tunnistettiin edelleen seerumissa, joka oli perfusoitu PACC:n läpi seuraavasti: seerumien, jotka oli perfusoitu PACC:n tai SAC:n läpi, perfuusion jälkeiset PEG-sakat fraktionoitiin G-100:lla pH 3,0:ssa. Mukaanotetut jakeet (mp. 100 000) neutraloitiin, väkevöitiin ja analysoitiin PAGE:lla. Näiden näytteiden Coomassie Blue:lla värjätyt PAGE-profiilit paljastivat 2-4 erillistä polypeptidinauhaa, joista yksi kulki yhdessä puhdistetun proteiini A:n kanssa.

Jatkotutkimuksissa koiraseerumia, joka sisälsi koirai-
 10 IgG:tä, perfusoiitiin PACC:n läpi, joka sisälsi ^{125}I -merkit-
 tyä proteiinia A merkkiaineena. Perfuusion jälkeistä seeru-
 mia käsiteltiin 5-%:isella PEG:llä kaikkien ^{125}I -proteiini
 A-IgG-kompleksien saostamiseksi ja analysoitiin sitten
 PAGE:lla. Havaittiin radioaktiivinen huippu, joka vastasi
 15 proteiini A-merkitsijää. Joitakin pienempimolekyyllipainoi-
 sia radioaktiivisia proteiini A-lajeja havaittiin myös ja
 ne saattoivat edustaa ^{125}I -proteiini A-osasia.

Lisätutkimuksissa normaalia PACC:n läpi perfusoitua
 koiraseerumia käsiteltiin 5-%:isella PEG:llä proteiini A-IgG-
 20 kompleksien saostamiseksi. Liukoiseksi tehty sakka fraktio-
 noitiin Sephadex G-100:lla dissosioivissa olosuhteissa ja
 mukaanotettu jae saostettiin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:lla. Uudelleenliuo-
 tettu sakka vietiin Sepharose 4B:n läpi, johon oli kytketty
 ihmisen IgG:tä. Sitoutunut aines eluoitiin ja väkevöitiin.
 25 Proteiini A:n läsnäolo eluaatissa osoitettiin epäsuorasti
 kaksoisdifфуusiotutkimuksin, jotka antoivat presipitiini-
 nauhan normaalilla ihmisen seerumilla, mutta ei normaalilla
 kananpojan seerumilla, joka ei sitoudu proteiini A.

Proteiini A:n tunnistaminen suurmolekyyllipainoisissa 30 komplekseissa

Proteiini A:n tunnistamiseksi perfuusion jälkeisten
 poistovirtausseerumien suurmolekyyllipainoisissa sakkaroosi-
 tiheysjakeissa suoritettiin seuraava tutkimus. Normaalia
 koiraseerumia vietiin PACC:n läpi ja perfuusion jälkeisiä
 35 seerumeita, jotka sisälsivät eluoitua ^{125}I -proteiinia A,
 fraktionoitiin sakkaroosi-tiheysgradientilla. ^{125}I -proteiini
 A läydettiin laajalla fraktioiden alueella 7S:stä

19S:ään verrattuna vapaaseen ^{125}I -proteiiniin A, joka antoi huipun 7S-merkitsijän alapuolella. Tämä johdattaa mieleen, että proteiinia A eluoituu PACC:sta suurmolekyyllipainoisessa muodossa, joka poikkeaa vapaasta proteiinista A.

5 Perfuusion jälkeisiä seerumeja, jotka sisälsivät ^{125}I -proteiini A:ta ultrasentrifugoitiin, kuten on selostettu ja sen sedimentoitumisominaisuuksia verrattiin puhdistetun vapaan proteiini A:n vastaaviin ominaisuuksiin. Radioaktiivisesti merkitty proteiini A perfuusion jälkeisissä
10 näytteissä jaettiin gradientin suurmolekyyllipainoisiksi jakeiksi ja verrattiin vapaaseen proteiiniin A. Perfuusion jälkeisten seerumien rinnakkaiset sakkaroosi-tiheysgradientti-jakeet osoittivat lisääntyntä Clq:ta sitovaa IgG:tä verrattuna seerumeihin ennen käsittelyä. Tämä toi mieleen, että
15 proteiinia A, joka eluoitui PACC:sta perfuusion jälkeisiin seerumeihin, oli komplekseissa immunoglobuliinien kanssa ja on voinut myötävaikuttaa lisääntyneeseen Clq-sitoutumiseen, joka havaittiin perfuusion jälkeisissä sakkaroosi-tiheysgradientti-jakeissa.

20 Sen määrittämiseksi, voisiko PACC:sta seerumin perfuusion jälkeen eluoitunut ^{131}I -proteiini A sitoutua Clq:lla päällystettyihin putkiin, suoritettiin seuraava koe: 10 ml normaalia tai kasvainta sisältävää seerumia vietiin PACC:n läpi, joka sisälsi ^{131}I -proteiinia A:ta. Poistovirtausnäyt-
25 teet, jotka sisälsivät eluoitua ^{131}I -proteiini A:ta, väkevöitiin 10 ml:n tilavuuteen ja sitten inkuboitiin 0,5 ml Clq:lla päällystettyjen putkien kanssa. Vapaata ^{131}I -proteiini A:ta käytettiin verrokkina. Tulokset osoittavat n. 7-ker-
30 taisen lisäyksen ^{131}I :n sitoutumisessa PACC:n poistovirtauksessa verrattuna vapaan ^{131}I -proteiini A:n sitoutumiseen. Siten osa proteiini A:sta, joka eluoitui PACC:sta seerumi-
perfuusion jälkeen, oli saanut Clq-sitomisominaisuuksia, jotka tuovat mieleen, että se vapautui immunoglobuliineihin sidotussa muodossa.

35 Lisäkokeissa normaalia tai kasvainta sisältävää koiran ja ihmisen seerumia perfusoiitiin PACC:n läpi. Näytteitä ennen käsittelyä ja poistovirtausnäytteitä (0,5) inkuboitiin

Clq:lla päällystettyjen putkien kanssa. Putket pestiin ja affinoimalla puhdistettua ^{125}I kananpojan antiproteiini A:ta lisättiin, kuten on selostettu. Tulokset osoittivat merkittävästi lisääntyntä anti-proteiini A:n sitoutumista (a) kahdessa näytteessä kolmesta ja vastaavasti kolmessa näytteessä viidestä normaalista koira- ja ihmisenäytteestä käsittelyn jälkeen, (b) neljässä näytteessä neljästä ja vastaavasti neljässä kuudesta koiran, jolla on kasvain ja ihmisen näytteestä perfuusion jälkeen.

10 Jatkotutkimuksissa 50 ml normaalia koiraseerumia perfusoitiin pylvaiden läpi, jotka sisälsivät ^{125}I -proteiini A:ta tai ^{125}I -koira-albumiinia yhdessä merkitsemättömän proteiini A:n kanssa, joka oli tehty liikkumattomaksi kolloidiumhiileen. Poistovirtausjakeet, jotka sisälsivät huippuradioaktiivisuuden, yhdistettiin. 10 ml:n tasaosiin näitä huippuja lisättiin yhtä suuri tilavuusmäärä 50-%:ista $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5-%:ista PEG tai 10-%:ista trikloorietikkahappoa. Tulokset osoittivat, että 70-80 % ^{125}I -proteiini A:sta oli saostettavissa NH_4SO_4 :llä ja PEG:llä verrattuna ainoastaan 5-10 %:iin vapaata proteiini A:ta. Sen sijaan vähemmän kuin 10 % vapautuneesta albumiinista oli saostettavissa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:llä tai PEG:llä. Nämä havainnot tuovat mieleen, että proteiini A:ta mutta ei albumiinia poistuu perfuusion jälkeisessä poistovirtauksessa kompleksoituna immunoglobuliinien kanssa.

Clq:ta sitovien kompleksien, jotka sisältävät IgG:tä ja proteiini A:ta, molekyylikaava

Sen määrittämiseksi, sitoutuiko koira-IgG koiraseerumista yhteen Clq-sitovissa komplekseissa perfuusion jälkeisessä seerumissa, suoritettiin seuraava koe: 10 ml normaalia koiraseerumia, joka sisälsi ^{131}I -koira-IgG:tä, perfusoitiin PACC:n läpi, joka sisälsi ^{125}I -proteiini A:ta. Poistovirtaus väkevöitiin ja inkuboitiin sitten Clq:lla päällystettyjen putkien kanssa. Merkityn proteiini A:n ja IgG:n spesifisten aktiivisuuksien perusteella laskettiin, että Clq:ta sitovien kompleksien kokemusperäinen kaava oli lähellä kaavaa IgG_2PA . Näiden kompleksien likimääräisen

molekyyllipainon määritettiin olevan 680 000 kromatografisesti Sepharose 6B:lla. Näiden arvojen ja kokemusperäisen kaavan perusteella molekyylikaava vastaa kaavaa $(\text{IgG})_2\text{PA}/_2$.

Ihmisen seerumin ollessa kysymyksessä, suurmolekyyllipainoisen huipun lisäksi, joka vastaa koiraseerumissa löydettyjä komplekseja, ilmestyi toinen huippu lähellä IgG:n molekyyllipainoa. Tämä huippu samoin kuin suurmolekyyllipainoinen jae osoittivat Clq-sitomisaktiivisuutta vertailutasojen yläpuolella. Koska tällä menetelmällä on vaikeaa määrittää kompleksien molekyyllipaino tällä alueella, ei molekyylikaavaa näille pienille komplekseille voida määrätä.

Proteiini A-IgG-konjugaattien valmistus in vitro

Proteiini A-IgG-konjugaatteja valmistettiin eri proteiini A/IgG-moolisuhteilla ja ne analysoitiin sameuden määrittämisellä 60 minuutin inkuboinnin jälkeen 27°C:ssa. Suurin valon hajonta havaittiin proteiini A/IgG-moolisuhteilla 1-2. Alempia arvoja esiintyi moolisuhteilla 1-10 ja suuremmilla. Proteiini A-IgG-kompleksien, jotka oli valmistettu vaihtelevilla moolisuhteilla, komplementin kiinnitysominaisuudet tutkittiin anti-komplementaarisessa määrittämisessä (96). Anti-komplementaarinen maksimi aktiivisuus havaittiin proteiini A/IgG-moolisuhteilla väliltä 1:100 - 1:1 000. Eri moolisuhteissa valmistettujen proteiini A-IgG-komplekseja testattiin kykynsä suhteen aikaansaada happamen proteaasin, myeloperoksidaasin ja beta-glukuronidaasin vapautuminen koiraneutrofiileistä (98). Proteiini A-IgG-optimisuhde näiden entsyymien vapauttamista varten oli 1:100 samalla kun katepsiinin kehittymistasot alenivat suhteilla 1:10 tai pienemmillä suhteilla.

30 PEG:llä saostuvassa IgG:ssä PACC-perfuusion aikana kehittyneet spesifiset vasta-aineet

Valmistettiin koira-anti-seerumia, joka oli spesifinen ihmisen erytrosyyteille ja koira-anti-seerumi, joka oli spesifinen ihmisen MCF-7 rintarauhaspöpsöluille. Kumpakin näistä seerumeista ja normaalia koiraseerumia käsiteltiin 5-%:isella PEG:llä immunoglobuliini-aggregaattien ja endogeenisten immuunikompleksien poistamiseksi ja perfusoi-

tiin sitten PACC:n läpi. Perfuusion järkeistä seerumia käsiteltiin 5-%:isella PEG:lla ja saostunut proteiini analysoitiin vasta-aine-aktiivisuuden suhteen MCF-7-soluja, hiirifibrosarkoomasoluja (L-soluja) ja koiran itsesyntyisen rauhassyövän soluja vastaan. Taulukot X ja XI osoittavat, että PACC-perfuusion jälkeen spesifisiä vasta-aineita oli talteenotettavissa immuunien seerumien PEG:lla saostuvassa jakeessa, jotka ylittivät tasot normaalin seerumin PEG:lla saostettavassa perfuusion jälkeisessä jakeessa.

10 Taulukko X

Koira-anti-MCF-7-seerumin spesifisyys ja vasta-aineaktiivisuus perfuusion jälkeen PACC:n läpi

Näyte	Ng MCF-7:ään sitoutunutta	Ng hiiri-L-soluihin sitoutunutta	Ng koira-rauhassyöpään sitoutunutta
PBS*	3,58±0,350	2,51±0,206	1,92±0,133
Normaali koiraseerumi	20,58±3,363	23,66±2,754	9,40±0,217
Koira-anti-MCF-7	36,86±0,066**	27,15±0,713	9,54±1,157

20 * Fosfaatilla puskuroitu suolaliuos

**Merkittävästi korkeampi ($P>0,05$) kuin normaali koiraseerumi.

Taulukko XI

25 Koira-anti-RBC-seerumin spesifisyys ja vasta-aineaktiivisuus

Näyte	Ng ihmisen RBC:hen sitoutunutta	Ng hiiri-L-soluihin sitoutunutta	Ng koira-rauhassyöpään sitoutunutta
PBS	0,84±0,037	0,063±0,066	1,05±0,181
Normaali koiraseerumi	7,31±0,159	19,64±2,108	7,80±0,526
Koira-anti-ihmisen RBC-seerumi	108,34±0,188*	18,06±1,947	6,70±0,058

35 *Merkittävästi korkeampi ($P>0,05$) kuin normaali koiran seerumi.

Vasta-ainetta sisältävien aggregaattien sedimentoitumisominaisuuksien tutkimiseksi perfuusion jälkeinen seerumi

saatettiin sakkaroosi-tiheysgradientti-ultrasentrifugointiin ja analysoitiin vasta-aine-aktiivisuuden suhteen radioimmunoanalyysillä. Perfuusion jälkeiset vastaseerumit osoittivat spesifistä sitoutumista jakeissa 7S-19S, joka sitoutuminen
 5 ylitti normaalin seerumin sitoutumisen näissä jakeissa.

Perfuusion jälkeistä koiravastaseerumia, joka oli spesifinen ihmisen erytrosyyteille, saostettiin 5-%:isella PEG ja testattiin ihmisen erytrosyyttien spesifisen agglutinaation suhteen ja verrattiin PEG-sakkoihin perfuusion jäl-
 10 keisestä normaalista koiraseerumista. Taulukko XII osoittaa, että koira-anti-ihmisen erytrosyyttiseerumit aiheuttivat merkittäviä agglutinaatioreaktioita vastakohtana agglutinaatiolle samanlaisilla määrillä sakkoja normaalista koiraseerumista.

15 Taulukko XII

Perfuusion jälkeisten PEG-sakkojen agglutinaatio-reaktioita

		Agglutinaatioarvostelu*			
		Proteiinimäärä (ug)			
20	Näyte	50	25	10	5
	Normaali-PEG-sakkaa	0	0	0	0
	immuuni-PEG-sakkaa	++++	++++	+	0

*Agglutinaatioreaktiot arvosteltiin 0:sta ++++:aan

25 Perfuusion jälkeisten PEG-sakkojen vasta-aineesta riippuva solusytotoksisuus (ADCC)

Perfuusion jälkeisiä PEG-sakkoja koira-anti-ihmisen RBC- ja normaalista koiraseerumista käytettiin ihmisen erytrosyyttikohteiden päällystämiseen ja analysoitiin ADCC:n suhteen käyttäen koiraerytrosyyttejä effektorisoluina. PEG-sak-
 30 koilla immuunista seerumista oli yli 300 % suurempi sytotoksisuus kuin normaalilla seerumilla efektori/kohdesuhteella 1:1.

Komplementin osuus Clq:ta sitovan IgG:n kehittymisessä perfuusion aikana PACC:n läpi

35 Sen määrittämiseksi, oliko koirakomplementti olemainen Clq:ta sitovan IgG:n kehittymiselle seerumin perfuusion aikana liikkumattomaksi tehdyn proteiini A:n läpi,

käsiteltiin normaalia koiraseerumia, kuumennettuna tai kuumentamattomana 56°C:ssa 60 minuuttia, 5-%:isella PEG:llä immunoglobuliini-aggregaattien poistamiseksi ja perfusoiitiin sitten PACC:n läpi. Kuumennetulla ja kuumentamattomalla seerumilla oli verrattavissa olevat lisäykset Clq-sitoutumisessa perfuusion jälkeisissä poistovirtausseerumeissa. Lisäksi, kun normaalia tai koiraseerumia, josta synnynnäisesti puuttui C3, käsiteltiin samalla tavalla 5-%:isella PEG:llä ja perfusoiitiin sitten PACC:n läpi, kehittyi samanlaisia määriä Clq-sitoutumista. Siten Clq:ta sitovia IgG-oligomeerejä kehittyi seerumeissa perfuusion jälkeen PACC:n läpi komplementista riippumattomilla mekanismeilla.

PACC-perfuusion aikana kehittyneen suurmolekyylipainoisen PEG:llä saostuvan IgG:n biologiset aktiivisuudet

Normaalia ja kasvainta sisältävää seerumia käsiteltiin 5-%:isella PEG:llä immunoglobuliini-aggregaattien ja endogeenisten immuunikompleksien poistamiseksi ja perfusoiitiin sitten PACC:n läpi. Perfuusion jälkeistä poistovirtausnäytettä käsiteltiin sitten toisen kerran 5-%:isella PEG:llä kehittyneen suurmolekyylipainoisen IgG:n saostamiseksi. Tätä arvioitiin sitten erilaisten toimivien biologisten aktiivisuuksien suhteen.

Sen määrittämiseksi, voisivatko kehittyneet IgG-oligomeerit, jotka sisälsivät proteiini A-IgG-konjugaatteja ja perfuusion jälkeisiä seerumeja, estää Fc:stä riippuvan imusoluruusukkeen muodostumisen, inkuboitiin PEG:llä saostettuja ja IgG-oligomeerejä perfuusion jälkeisissä seerumeissa koiran imusolujen kanssa, jotka sitten analysoitiin kykynsä suhteen muodostaa suurukkeita herkistettyjen ihmisen erytrosyyttien kanssa (99). PEG:llä saostuvat IgG-oligomeerit perfuusion jälkeisissä seerumeissa normaaleista koirista ja koirista, joilla oli kasvain, osoittivat verrattavissa olevaa ruusukkeen muodostumisen estoa väliltä 28-31 % verrattuna 47 %:n estoon yhteenkasatulla koira-IgG:llä.

Sen määrittämiseksi, voisivatko IgG-oligomeerit, jotka sisältävät proteiini A-IgG-konjugaatteja ja perfuusion jälkeistä seerumia, aktivoida ja kuluttaa komplementtia,

inkuboitiin PEG:llä saostettuja IgG-oligomeerejä perfuusion jälkeisissä seerumeissa marsu-komplementti-lähteen kanssa ja analysoitiin sitten kyvyn suhteen välittää hajotus komple-

mentista riippuvassa hemolyyttisessä analyysissä (96). PEG:llä

5 saostuvat IgG-oligomeerit perfuusion jälkeisessä seerumissa normaaleista koirista ja koirista, joilla oli kasvain, olivat verrattavissa kyvyssään aktivoida ja kuluttaa komplement-

tia.

Sen määrittämiseksi, voisivatko IgG-oligomeerit,

10 jotka sisältävät proteiini A-IgG-konjugaatteja, perfuusion jälkeisistä seerumeista, stimuloida superoksidi-anionin vapautumista ihmisen liuskatumaisilla soluilla (PMN), inkuboitiin perfuusion jälkeisiä seerumeja PMN:n kanssa ja väliaineet analysoitiin superoksidin kehittymisen suhteen kemilumi-

15 minoinnilla (100, 101). PEG:llä saostuvat IgG-oligomeerit perfuusion jälkeisissä seerumeissa normaalista koirista ja koirista, joilla oli kasvain, olivat verrattavissa kyvyssään stimuloida superoksidi-anionin kehittymistä koira-PMN:illä.

20 Perfuusion jälkeisistä seerumeista saatujen PEG-sakkojen sytotoksinen toiminta arvioitiin. PEG:llä saostuvat oligomeerit, jotka sisälsivät proteiini A-IgG-konjugaatteja sekä kasvainta sisältävistä että normaaleista seerumeista aiheuttivat sytotoksisuutta, joka oli ei-spesifistä, koska

25 samanasteista hajoamista havaittiin, kun käytettiin muita kohdesoluja, kuten nisärauhassyöpäsoluja, hiiri-L-solua ja ihmisen erytrosyyttejä. Sytotoksisuus näytti kuitenkin olevan riippuvainen komplementista, koska seerumit, joista puuttui C3, kehittivät merkittävästi vähemmän sytotoksisuutta

30 kuin vastaavat normaalit seerumit, kun niitä testattiin nisäsyöpäsoluja, hiiri-L-soluja ja ihmisen erytrosyyttejä vastaan.

Synteettisten proteiini A-IgG-kompleksien biologiset aktiivisuudet

35 A. Kemiluminointi

Kemiluminointitutkimukset käyttäen synteettisiä proteiini A-IgG-komplekseja ovat edistyneet. Synteettisiä

komplekseja valmistettiin aluksi lisäämällä proteiini A:ta seerumiin tai puhtaaseen koira- tai ihmisen IgG:hen, mikä aiheuttaa kemiluminointiaktiivisuutta. Näillä komplekseilla oli samanlainen aktiivisuus, olivatpa ne valmistetut seerumissa tai lisäämällä proteiini A:ta puhtaaseen ihmisen IgG:hen. Sakkojen päällä olevat nesteet liukenemattomista komplekseista, jotka oli valmistettu joko seerumista tai IgG:stä olivat pääasiallisesti inaktiivisia. Verrokkit, jotka sisälsivät puhdasta proteiinia A, IgG:tä ja seerumia pelkästään, olivat inaktiivisia kemiluminoinnissa. Tuoreen komplementtilähteen lisääminen komplekseihin, jotka oli tehty joko seerumista tai tuoreesta IgG:sta, eivät näyttäneet merkittävästi parantavan kemiluminointiaktiivisuutta. Sen sijaan kompleksit, jotka oli tehty seerumista EDTA:n läsnäollessa, eivät olleet yhtä aktiivisia aggregometriassa kuin kompleksit, jotka oli tehty seerumista EDTA:n poissaollessa. Sakkojen päällä olevat nesteet komplekseista, jotka oli tehty joko seerumista tai IgG:stä, olivat inaktiivisia. Päällä olevan nesteen ja kompleksien fraktionoimaton seos tai seos, joka oli muodostettu uudelleen eristetyistä sakoista ja päällä olevista nesteistä, olivat aktiivisempia kuin sakat pelkästään. Tämä osoittaa, että sakan päällä olevassa nesteessä on läsnä tekijöitä, jotka eivät itse ole aktiivisia, mutta jotka pystyvät parantamaan liukenemattomien kompleksien aktiivisuutta.

B. Aggregometria

Synteettisillä komplekseilla on havaittu seuraavaa: proteiini A-IgG-kompleksien, jotka on valmistettu joko IgG:n tai seerumin kanssa, EDTA:n kanssa tai ilman, inkuboinnista on seurauksena jyvässolujen merkittävä yhteenkasautuminen. Kuitenkin kompleksit, jotka on tehty EDTA:n poissaollessa, ovat paljon tehokkaampia kuin ne, jotka on tehty EDTA:n läsnäollessa. Sakkojen päällä olevat nesteet näistä komplekseista ovat inaktiivisia, mutta kun ne lisättiin takaisin sakoihin, näytti seurauksena olevan merkittävä aktiivisuuden lisääntyminen, joka on samanarvoinen fraktionoimattoman seoksen aktiivisuuden kanssa. Tämä havainto johdattaa mieleen,

että sakan päällä oleva neste tekee liukenemattomien kompleksien aktiivisuuden mahdolliseksi. Tässä suhteessa on radioimmunoanalyysillä löydetty korkeita C3a- ja C5a-tasoja sakkojen päällä olevista nesteistä näistä komplekseista.

- 5 Eräs tärkeä seikka aktiivisuuksien erilaistumisessa on seuraava: liukoiset kompleksit, jotka on tehty lisäämällä suhteellisen suuria määriä proteiini A:ta seerumiin, tuottavat komplekseja, jotka eivät ole aktiivisia aggregometriassa, mutta joilla C3a- ja C5a-tasot ovat verrattavissa liukenemattomien sakkojen päällä oleviin nesteisiin.

C. Komplementtitutkimukset

- Synteettiset kompleksit, jotka sisältävät proteiini A-IgG:tä ja jotka on tehty joko seerumista tai puhtaasta IgG:stä, aktivoivat koko komplementtiaktiivisuuden sekä koiran että ihmisen seerumissa. Komplementin tyhjentyminen nousee 40-70 %:iin koiralla. Liukenemattomat kompleksit, jotka on valmistettu joko ihmisen tai koiran seerumista tai koiran seerumista, josta C3 puuttuu tai ihmisen tai koiran IgG:stä, kuluttaa yli 90 % koko komplementtiaktiivisuudesta, kuten taulukossa XVII on esitetty. Sekä liukenemattomat että liukoiset kompleksit, jotka on tehty suurilla proteiini A-määrillä seerumiin lisättynä, kehittävät 20-30 μ g:aan asti C3a:sta ml kohti seerumia. Tämä edustaa kokonais C3:n seerumissa likimäärin 40 %:n konversiota C3a:ksi. Samat päällä olevat nesteet sisältävät 800 ng:aan asti C5a/ml seerumia. Kompleksit, jotka on pesty ja lisätty tuoreeseen seerumiin, jatkavat C3a- ja C5a-aktiivisuuden kehittämistä. Kun nämä kompleksit oli valmistettu, ne näyttävät pystyvän ei ainoastaan kehittämään C3a:ta aluksi seerumista, jossa ne valmistettiin, vaan päästyään tuoreeseen seerumiin, ne pystyvät kehittämään lisää C3a:ta ja myös C5a:ta, kuten taulukossa XVIII on esitetty. Esimerkiksi sakat joko seerumista tai puhtaasta IgG:stä lisättyinä tuoreeseen seerumiin kehittävät 2 500 ng:aan asti C5a:ta/ml. Kokeellisissa tutkimuksissa C5a:n tiedetään aiheuttavan verenpaineen alentumista, verisuonien laajentumista ja lisääntyntä kapillaariläpäisyyttä. Samanlaiset vasteet todettiin in vivo akuuteissa

kliinisissä tiloissa perfuusiokäsittelyjen jälkeen. Alustavat tutkimukset osoittivat C5a:n kohonneita tasoja potilaiden seeruminäytteissä, jotka oli otettu ajankohtana perfuusion jälkeen, jolloin paineet olivat alenevia. Eräässä lisätutkimuksessa, jossa mitään muutosta C5a-tasoissa ei havaittu, ei tapahtunut merkittävää muutosta sydän-verisuoni-parametreissa. Nämä havainnot toivat mieleen, että PA-IgG-konjugaateista kehittyneet anafylatoksiinit saattaisivat osittain selittää havaitut sydän-verisuoni-vaikutukset.

10 Proteiini A-IgG-konjugaattien in vivo -vaikutukset

Kolmelle koiralle, joilla oli itsesyntyisiä kasvaimia, annettiin proteiini A-IgG-komplekseja (menetelmä 9, taulukko XVIII), jotka oli valmistettu inkuboimalla 1 mg proteiini A:ta 3 ml:n kanssa autologista seerumia 30 minuuttia 27°C:ssa. Normaalia suolaliuosta lisättiin sitten antamaan seoksen lopulliseksi tilavuudeksi 5 ml ja se tiputettiin laskimonsisäisesti nopeudella 1 ml/minuutti. Infuusiota annettiin 3-5 kertaa viikossa yhteensä 7-15 käsittelynä. Pian infuusioiden jälkeen näkyvissä kasvaimissa esiintyi verentungosta ja ne turposivat. Toistuvien infuusioiden jälkeen havaittiin objektiivisia takautumia, kuten seuraavassa on esitetty (taulukko XIII).

Taulukko XIII

				Kaksiulotteinen tuote (cm ²)		
25	Rotu	Ikä	Kasvain	Ennen TX	Jälkeen TX	Muutos-%
	villakoiria	11	nisärauhassyöpä	17,7	10,0	44
	Boston-					
	terrieri	12	nisärauhassyöpä	16,2	12,7	22
	Beagle	7	imukudoskasvain	89,3	63,7	28

30 Proteiini A-IgG-komplekseja, jotka sisälsivät 100 µg proteiini A:ta plus 25 ml autologista koiraseerumia, annettiin yhdessä kaniini-anti-kasvain-anti-seerumin (20 ml) ja tsymosanilla aktivoidun normaalin koiraseerumin kanssa (menetelmä 4, taulukko XIV) kahtena peräkkäisenä päivänä. Eläinten annettiin levätä kolmantena päivänä ja 4. päivänä annetaan syklofosfamidia ja/tai adriamysiiniä. Tästä oli seurauksena akuutteja kasvainmyrkyllisiä vaikutuksia kahdessa

koirassa, joilla oli nisärauhassyöpä. Kun antamista jatkettiin, vähentyivät kasvaimet 50 %:lla kahdella koiralla (taulukko XIV).

Taulukko XIV

5			Kaksiulotteinen tuote (cm ²)		
	Rotu	Ikä Kasvain	Ennen TX	Jälkeen TX	Muutos-%
	Cocker-				
	spanieli	5 nisärauhassyöpä	18,2	8,9	56,6
	Schnauzer	8 nisärauhassyöpä	15,3	6,1	60,9
10	<u>Normaaleista koiraseerumeista valmistettujen proteiini A-IgG-konjugaattien in vivo -vaikutukset</u>				
	Kun PACC-poistovirtauksen fysikaaliskemiallisista tutkimuksista oli päästy varmuuteen siitä, että proteiini A-IgG-konjugaatteja poistui, yritettiin testata näiden kon-				
15	jugaattien tehokkuus koirissa, joilla oli erilaisia itsesyntyisiä koirakasvaimia. Viidelle koiralle, joilla oli erilaisia itsesyntyisiä kasvaimia, annettiin proteiini A-IgG-komplekseja. Käytetty PA-IgG-annos kehitettiin tutkimuksista PA-IgG-määristä, jotka saisivat aikaan näkyviä morfologisia				
20	muutoksia kasvaimessa ja PA/IgG-suhde kehitettiin in vitro -tutkimuksista, joissa PA:IgG-suhteesta 1:100 oli seurauksena myeloperoksidaasin ja ktepsiinien optimi vapautuminen koiraneutrofiileistä. Näitä valmistettiin inkuboimalla proteiini A:ta (5 µg/lb) normaalin koiraseerumin (0,1 ml/lb)				
25	kanssa 60 minuuttia 37°C:ssa. Sitten lisättiin normaalia suolaliuosta seoksen kokonaistilavuuden saamiseksi 10-15 ml:ksi ja se tiputettiin laskimonsisäisesti nopeudella 1 ml/minuutti. Infuusioita annettiin 2-4 kertaa viikossa, yhteensä 7-16 käsittelyä. Pian infuusioiden jälkeen kasvaimissa esiintyi				
30	verentungosta ja turvotusta. Toistuvien infuusioiden jälkeen havaittiin objektiivisia kasvaintakautumia, kuten on esitetty taulukossa XV. Joissakin tapauksissa subterapeutin annos kemoterapiaa lisättiin infuusihoitoon sen jälkeen kun kasvaimessa esiintyi PA-IgG-infuusioiden aiheuttamia tuleh-				
35	duksellisia muutoksia. Myös näissä olosuhteissa havaittiin kasvaintakautumia, kuten taulukossa XVI on esitetty.				

Niinmuodoin tämän keksinnön yhtenä kohtana on menetelmä isännän, jolla on syöpä, hoitamiseksi antamalla kasvainmyrkyllinen annos valmistetta, joka sitoutuu Fc:tä sisältävien valkosolujen Fc-reseptoriin aiheuttaen siten ainakin yhden sytotoksisen aineen vapautumisen valkoisista verisoluista.

Taulukko XV

Proteiini A-IgG-konjugaattitutkimukset

10	Koiran nro	Kasvain	Käsittelyjen lukum.	Kaksiulotteinen tuote cm^2		
				Ennen	Jälkeen	Muutos-%
	1	Verisuonisarkooma	13	96	46	51,0
	2	Nisärauhassyöpä	7	16,2	11,8	57,2
	3	Imukudoskasvain	10	160,0	60,0	62,0
15	4	Nisärauhassyöpä	16	45,3	30,3	33,1
	5	Imukudoskasvain	11	93,6	63,7	31,9

Taulukko XVI

Tutkimukset proteiini A-IgG-konjugaateista plus pien-annos-kemoterapiasta

20	Koiran nro	Kasvain	Käsittelyjen lukum.	Kaksiulotteinen tuote cm^2		
				Ennen	Jälkeen	Muutos-%
	1	Verisuonisarkooma*	12	86,0	4,0	96,0
	2	Suomumainen solusyöpä*	15	60,0	10,0	86,0
25	3	Syöttösolukasvain**	8	97,0	47,0	51,0

* Annettu adriamysiiniä 25 mg/m^2 yhtä annosta kohti 12 käsitteilyn jälkeen.

**Annettu BcNu $1,7 \text{ mg/m}^2$ yhtä annosta kohti viiden käsitteilyn jälkeen.

Myrkyllisyystutkimuksia proteiini A-IgG-konjugaateilla normaaleissa koirissa

Koiralle kehitettiin malli konjugaattien, jotka olivat peräisin vapaan proteiini A:n inkuboinnista koiraplasman kanssa, myrkyllisten vaikutusten tutkimiseksi ja näiden havaintojen saattamiseksi vastaavuussuhteisiin niiden kanssa, jotka oli havaittu ja aikaisemmin selostettu tässä esite-

tyissä ihmistutkimuksissa. Näissä tutkimuksissa yritettiin luonnehtia tämän reaktion patofysiologiaa, tutkia serologisia välittäjiä, tutkia farmakologisen salpauksen vaikutuksia sekä muita menetelmiä vasteen vaimentamiseksi ja lopuksi tehdä vertailuja ihmisen reaktion kanssa.

Tutkittiin neljä ryhmää. Ryhmälle 1 annettiin proteiini A-IgG-konjugaatteja kolmen minuutin jakson ajan. Ryhmälle 2 annettiin proteiini A-IgG-konjugaatteja 30 minuutin jakson ajan. Ryhmä 3 käsitti koiria, joilta jyvässolut oli kulu-
 10 lutettu loppuun ja joille annettiin sama hoito-ohjelma kuin ryhmälle 2. Ryhmälle 4 annettiin histamiini-salpauslääkitys ennen saman hoidon saamista kuin ryhmä 2.

Seuraavat parametrit tutkittiin:

- (a) vasen kammio-DP/DT
- 15 (b) sydänsegmentin pituussupistuvuus
- (c) keskimääräinen valtimoverenpaine
- (d) vasemman kammion systolisen verenpaineen huippu
- (e) kiertävä sydänvaltimovirtaus
- (f) munuaisvaltimovirtaus
- 20 (g) reisivaltimovirtaus
- (h) keuhkovaltimovirtaus

Tulokset ovat osoittaneet, että proteiini A-IgG-konjugaattien nopealla infuusiolla kaikki edellä mainituista parametreista poikkeavat nopeasti perusarvoistaan palautuen
 25 hitaasti perusviivalle. Proteiini A-IgG-kompleksien hitaamalla infuusiolla tapahtui kaikissa parametreissa jälleen alentumista huippujen esiintyessä 15 minuutin kuluttua ja alenemat kestivät 45-60 minuuttia ja palautuivat perusviivalle. Tärkein ilmenemismuoto näytti olevan alentuminen va-
 30 semmassa kammio-DP/DT-suhteessa ja segmenttipituudessa sekundaaristen vaikutusten kohdistuessa keskimääräiseen valtimoverenpaineeseen. Jyvässolupuutteesta koirilla, jotka saivat saman hoidon kuin ryhmä 2, oli seurauksena tarkkailtujen sydän-verisuonivaikutusten vähentyminen. Histamiini-
 35 salpauksen käytöllä oli vähän vaikutusta sydän-verisuonivas-
 teiden vaimentamisessa.

Eri kudosten patologinen tutkimus infuusion jälkeen osoitti, että silmään pistävimmät muutokset näyttävät olevan keuhkossa, jossa on keuhkorakkulaturvotus ja solupurkautuma keuhkorakkulatilaan.

- 5 Näissä tutkimuksissa koiralla oli erilainen sydän-verisuoni-myrkyllisyysmalli kuin ihmisellä havaittiin. Verivirtauksen huonontuminen pääsuonissa näyttää johtuvan pienentymisestä sydämen supistuvuudessa, kun taas tutkimukset
- 10 ihmisellä akuuttien tilojen aikana näyttivät lisäystä sydämen ulosvirtauksessa yhdessä pienentymisen kanssa systeemisessä verisuonivastuksessa syyksi verenpaineen alentumiseen. Kummassakin on todisteita muutoksista verisuonien läpäisevyydessä.

Taulukko XVII

Proteiini A:n vaikutus hemolyyttiseen täyskomplementti-
aktiivisuuteen^a

Hoito	C'H ₅₀ -yksiköitä (alentumis-%)			
	Ihmissen seerumi		Koiran seerumi	
	H.S. 240	A.W. 222	P.M. 240	128
Puskuri				
Proteiini A (ug/ml) ^b				
3c	104 (57)	151 (32)	191 (20)	<10 (>92)
78d	80 (67)	133 (40)	135 (44)	<10 (>92)
2500c	126 (48)	138 (38)	130 (46)	<10 (>92)
Liukenemattomia komplekseja seuraavista:				
Autologinen seerumi	144 (40)	88 (60)	109 (55)	<10 (>92)
Heterologinen seerumi	<10 (>96)	<10 (>96)	<10 (>96)	<10 (>92)
Homologinen IgG	150 (38)	<10 (>95)	<10 (>96)	<10 (>92)
Heterologinen IgG	<10 (>96)	<10 (>95)	<10 (>96)	<10 (>92)
Homologinen seerumi, josta C3 puuttuu	96 (60)	52 (77)	92 (62)	<10 (>92)
Liukoisia komplekseja homologisesta seerumista, josta C3 puuttuu (2 500 ug/ml proteiini A;ta)	164 (32)	158 (29)	167 (30)	<10 (>92)

^aMääritetty lampaan erytrosyyttejä vastaan, jotka on herkistetty kaniini-IgM-hemolysiollla.

^bLopullinen pitoisuus inkubointiseoksessa.

^cLiukoisia komplekseja.

^dLiukenemattomia komplekseja (ekvivalenttipiste presipitiinikäyrällä).

Taulukko XVIII

C3a- ja C5a-anafylatoksiinitasot seerumissa^a

Kohde

Seerumia käsitelty	H.S.		A.W.		P.M.	
	C3a (μ g/ml)	C5a (μ g/ml)	C3a (μ g/ml)	C5a (μ g/ml)	C3a (μ g/ml)	C5a (μ g/ml)
--- Proteiini A:lla (μ g/ml) ^c	0,620	0,048	0,222	<0,030 ^b	0,700	<0,030 ^b
3d	38,4	1,14	30,4	1,08	40,8	2,80
78e	37,6	0,75	31,2	0,67	54,0	0,84
2500d	31,6	0,64	44,0	0,78	65,5	0,64
Liukenemattomilla seerumi-proteiini A-komplekseilla	37,5	1,61	43,0	2,40	48,3	2,24
Liukenemattomilla IgG-proteiini A-komplekseilla	42,0	2,53	25,3	1,84	65,0	3,94
Kolloidiumhiilellä	-	<0,030 ^b	0,510	<0,030 ^b	0,810	0,038

58

^aKaksoismääritysten, jotka poikkesivat alle 8 %, keskiarvo

^bRadioimmunoanalyysin alle 10 %:n estyminen

^cLopullinen pitoisuus inkuboinnissa

^dLiukoisia komplekseja

^eLiukenemattomia komplekseja (ekvivalenttipiste preseptiiniäyrällä)

Taulukko XVII antaa lukuarvoja proteiini A:n vaikutuksesta hemolyyttiseen täyskomplementtiaktiivisuuteen ja taulukko XVIII antaa lukuarvoja C3a:n ja C5a:n kehittymiselle synteettisistä komplekseista.

5 Edullinen suoritusmuoto: Tuote 4

(Hapotettuja kasvainta sisältäviä seerumeita)

Autologisia seerumeita tai plasmaa isännistä, joilla on kasvain, 4 ml/lb, hapotetaan pH 2,5:een lisäämällä piasaroittain 10N HCl ja pidetään viisi minuuttia 27°C:ssa.

- 10 Seerumi neutraloidaan sitten nopeasti pH 7,4:ään lisäämällä 10N NaOH ja lingotaan 1 500 X g:ssä 30 minuuttia 4°C:ssa. Sakan päällä oleva seerumi poistetaan sitten ja annetaan laskimonsisäisesti nopeudella 1 ml/minuutti.

- 15 Muutokset ihmisen plasman pääaineosissa hapottamisen ja nopean neutraloinnin jälkeen edellä esitetyllä menetelmällä on esitetty seuraavassa taulukossa XVIII A. Taulukosta nähdään, että kokonaisproteiini- ja globuliinijakeessa sekä myös fibrinogeenissä tapahtuu laskua, kun taas muut parametrit pysyvät pääasiallisesti muuttumattomina. Taulukossa
- 20 XVIII B esitetään vähentymät ihmisen immunoglobuliineissa G, M ja A plasman käsittelemisen jälkeen hapolla.

Taulukko XVIIIA

Muutokset ihmisen plasma-aineosissa hapottamisen jälkeen*

	Parametri	Yksiköt	Ennen	Jälkeen
5	Veren ureatyyppi	mg/dl	17,0	14
	Kreatiniini	mg/dl	1,4	1,3
	Glukoosi	mg/dl	380	331
	Triglyseridit	mg/dl	130	137
	Virtsahappo	mg/dl	94	90
10	Kalsium	mg/dl	5,7	5,2
	Fosfori	mg/dl	7,6	6,1
	Kokonaisproteiini	g/dl	10,0	8,5
	Albumiini	g/dl	5,3	4,5
	Kokonaisbilirubiini	mg/dl	3,8	3,8
15	Alkalinen fosfataasi	milli IU/ml	37	15
	SGOT	milli IU/ml	8,0	15
	LDH	milli IU/ml	132	0
	K	Meq/L	3,3	2,9
	CO ₂	Meq/L	16,5	8,5
20	Protrombiiniaika	s	11,1	ääretön
	Fibrinogeeni	Mg/dl	265	ei havaittavissa
	Trombiiniaika	s	14	50
	Tromboplastiini-osa-aika	s	34	150
25	*Ihmisen plasmaa käsiteltiin lisäämällä 10N HCl pH:n asettamiseksi 2,5:een. Annettiin olla viisi minuuttia ja neutraloitiin nopeasti lisäämällä 10N NaOH.			

Taulukko XVIIIB

Muutokset ihmisen immunoglobuliineissa hapottamisen

30	jälkeen			
	Näyte	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)
	Käsittelemätön	1 200	100	110
	Hapotettu	860	100	90

Autologinen hapotettu seerumi isännistä, joilla on kasvain, osoittaa merkittävää lisäystä kasvaimeen liittyvissä vasta-aineissa mitattuna epäsuoralla immunofluore-

senssillä käyttäen jokaisen koiran omaa kasvainta substraattina (taulukko XIX).

Taulukko XIX

Kasvaimeen liittyvät vasta-aineet seerumeissa isännistä, joilla on kasvain*

Koiran nro	Tauti	Käsittelimät- Hapolla käsiteltömät seerumit	
		mit	lyt seerumit
1	Imukudoskasvain	10 000	20 000
10 2	Imukudoskasvain	10 000	30 000
3	Imukudoskasvain	10 000	40 000
4	Imukudoskasvain	10 000	20 000
5	Verisuonisarkooma	100	50 000

*Luvut edustavat loppupistelaimeinnuksia, jotka antoivat positiiviset fluoresenssiseerumit koiran omaa kasvainsubstraattia vastaan.

Muutoksia kasvaimeen liittyvissä vasta-aineissa koirien, joilla oli nisäsyöpä, seerumeissa hapottamisen jälkeen testattiin radioimmunoanalyysissä, jossa koira-nisärauhassyövän kudosisäilytyslinjaa käytettiin kohteena ja ^{125}I -proteiini A:ta indikaattorina soluun sidotun koira-IgG:n havaitsemiseksi. 10:ssä testatussa seerumissa hapottamista pH 2,5:een seurasi nopea neutralointi, mistä oli seurauksena 120 ± 63 %:n (S.D.) lisäyksiä kasvaimeen liittyvissä sitoutumistasoissa yli käsittelemättömän seerumin arvojen.

Ihmisen, jolla oli rintarauhassyöpä, täysseerumin analyysi Sephadex G-200-kromatografialla ennen ja jälkeen hapottamisen osoitti seuraavaa: (a) hapotettu seerumi osoitti suurta lisäystä ontelotilavuusproteiinissa ja suhteellisen proteiinin tyhjentyksen sisällytyksessä jakeessa verrattuna käsittelemättömään seerumiin, (b) kasvaimeen liittyvä sitoutuminen mitattuna radioimmunoanalyysillä osoitti 948 %:n lisäystä sisällytyksessä jakeessa ja 134 %:n lisäystä ontelotilavuusjakeessa verrattuna käsittelemättömään seerumiin.

Hapotetun täysseerumin analyysi sakkaroosi-tiheysgradientti-ultrasentrifugoinnin jälkeen osoitti, että

Clq-sitoutumistasot olivat kohonneet 400 %:iin asti 7S:ää suuremmissa jakeissa verrattuna käsittelemättömään seerumiin. Siten näyttää siltä, että kasvainta sisältävän seerumin hapottamisesta on seurauksena lisäys kasvaimeen liittyvissä vasta-aineissa ja suurmolekyyllipainoisten proteiinien kehittyminen.

Hapotettu seerumi itsesyntyisten kasvaimien käsittelyssä

Autologista hapotettua seerumia koirista, joilla on kasvain, annetaan tsymosanilla aktivoidun normaalin koira-seerumin kanssa 1. päivänä ja uudelleen 24 tuntia myöhemmin (2. päivänä). Eläimen annetaan levätä 3. päivänä. 4. päivänä annetaan syklofosfamidia laskimonsisäisesti (menetelmä 2, taulukko XVIII). Tulokset tästä hoidosta viidellä koiralla on esitetty taulukossa XX.

Taulukko XX

Vaste käsittelyille

Koiran nro	Rotu	Sairaus	Hapotus, komplementin akti- vointi, syklofosfamidi		
			Kaksiulotteintn tuote		
			Ennen kä-	Käsittelyn	Vähenneminen
			sittelyä	jälkeen	(%)
1	Puli	Verisuonisarkooma	140	70	50
2	Labrador	Verisuonisarkooma	58	32	39
3	Terrieri	Tummasolukasvain	50	30	40
4	Springrelspa- nieli	Imukudoskasvain	140	50	70
5	Villakoiran	Nisärauhassyöpä	25	125	50
6	Verikoiran	Imukudoskasvain	160	120	25

Eräs tehokas muunnos, joka saa aikaan hyvin huomattavia kasvainmyrkyllisiä vaikutuksia, on seuraava: L-asparagiinaasia ja syklofosfamidia annetaan isännälle 1. päivänä ja kun kasvaimen maksimitakautuma saavutetaan, annetaan tsymosanilla aktivoitua normaalia koiraseerumia (100 ml) ja autologista esikäsittelyplasmaa (4 ml/lb), joka on hapotettu tai tehty alkaliseksi ja seuraavana päivänä annetaan L-asparagiinaasia ja syklofosfamidia (menetelmä 5, taulukko XXII). Tulokset on annettu seuraavassa taulukossa XXI.

10 Taulukko XXI

				Kaksiulotteinen tuote (cm ²)		
	Koira	Rotu	Sairaus	Ennen	TX:n	Vähenty-
	nro			TX:ää	jälkeen	mä %
15	1	Spanieli	Imukudoskasvain	140	35	75
	2	Beagle	Imukudoskasvain	120	30	75
	3	Villakoira	Imukudoskasvain	70	35	50

Edullinen suoritusmuoto: Tuote 5 (Tsymosanilla aktivoitu plasma)

20 Normaalien koiraseerumin antamisesta inkuboinnin jälkeen tsymosanin kanssa, aineen, jonka tiedetään aktivoivan komplementtisekvenssin ja kehittävän komplementtisivutuotteita, on ollut seurauksena seuraavat in vivo -vaikutukset:

- 25 (a) verisuonien laajeneminen ja aleneminen verenpaineessa ja sydämen tiheälyöntisyydessä;
 (b) sileän lihaksen kouristusta aiheuttavat vaikutukset.

30 Näiden vaikutusten voidaan osaksia katsoa aiheutuneen komplementtisivutuotteista, nimittäin anafylatoksiineista C3a ja C5a.

35 Komplementin aktivoimiseksi normaalissa koiratäysseerumissa tsymosania (5 g) inkuboidaan seerumin (100 ml) kanssa 10 minuuttia 27°C:ssa. Tsymosan poistetaan sitten linkomalla 1 500 x g:ssä 30 minuuttia. Seerumi, jonka komplementti on aktivoitu, tiputetaan sitten laskimonsisäisesti isäntään, jolla on kasvain, nopeudella 10 ml/min.

Eri menetelmissä, joita käytetään itsesyntyisten koirakasvainten hoitoon, on tsymosanilla aktivoitua normaalia koiraplasmaa käytetty terapeuttisena lisämodaliteettina. Kasvainmyrkyllisiä tai kasvainta takauttavia vaikutuksia on ilmennyt, kun tsymosanilla aktivoitua koiraplasmaa on annettu yhdessä (a) kasvainimmunoglobuliinivalmisteeseen, (b) proteiini A-IgG-kompleksien ja (c) hapotetun tai emäksiseksi tehdyn plasman kanssa. Kasvainmyrkyllisiä vaikutuksia tai takautumia on havaittu, kun L-asparaginaasia, syklofosfamidia tai adriamysiiniä annetaan pian jokaisen näistä tuotteista antamisen jälkeen.

Edullinen suoritustyyppi: Proteiini A

Proteiini A on *Staphylococcus aureus* cowans I:n soluseinän aineosa ja sillä on kyky reagoida monien nisäkäslajien Fc-alueen tai immunoglobuliinien kanssa. Kun sitä injektoidaan koiriin, joilla on kasvain, on havaittu kasvainvastaista vaikutusta. Proteiini A:ta infusoitiin 10-80 µg/kg:n annoksissa (menetelmä 8, taulukko XXII). Tästä on ollut seurauksena lyhytaikaisia 5-20 %:n kasvaintakautumia neljässä eläimessä, kun taas yhdessä muussa näkyi kasvainmyrkyllistä vastetta. Kahdessa muussa ei näkynyt mitään vaikutusta.

Moniulotteinen immunoterapia

Näiden tuotteiden käytöstä yksinään, yhdistelmänä toistensa kanssa tai erilaisten kemoterapeuttisten aineiden kanssa on ollut seurauksena hyvin olennaisia kasvainvastaisia reaktioita ja kasvaintakautumia koirissa, joilla on erilaisia itsesyntyisiä kasvaimia. Menetelmät, joita on käytetty näiden vaikutusten aikaansaamiseksi, on esitetty taulukossa XXII ja eri tuotteiden käyttö näissä menetelmissä ja saadut tulokset on selostettu edullisissa suoritustyyloissa.

Taulukko XXII

Yhteenveto hoitomenetelmistä

Hoitomenetelmä	Päivä		4
	1	2	
1	(a) FFE	Hapotettu tai emäksiseksi tehty povistovirtaus (tuote 1) plus proteiini A	L-asparaginaasi syklofosfamidi adiamysiini
2	(a) C'-aktivoitunut seerumi (b) hapotettu tai emäksiseksi tehty si tehty plasma	(P*5) C'-aktivoitunut seerumi hapotettu (P4) plasma	L-asparaginaasi syklofosfamidi
3	(a) C'-aktivoitunut seerumi (b) kasvainimmunoglobuliini (P2)	(P*5) C'-aktivoitunut seerumi anti-kasvainIgG (Cohn-jae)	syklofosfamidi adiamysiini
4	(a) C'-aktoidut seerumi (b) proteiini A-IgG-kompleksit (P3)	(P*5) C'-aktivoitunut seerumi proteiini A-IgG-kompleksit	syklofosfamidi tai adiamysiini
5	(a) L-asparaginaasi (b) syklofosfamidi	hapotettu tai emäksiseksi tehty autologinen plasma plus C'-aktivoitunut seerumi (päivät 2 ja 3)	L-asparaginaasi syklofosfamidi
6	(a) heterologisen anti-kasvain-IgG:n ja proteiini A:n kompleksit (b) C'-aktivoitunut seerumi	heterologisen anti-kasvain-IgG:n ja proteiini A:n kompleksit	L-asparaginaasi adiamysiini syklofosfamidi
7	(a) proteiini A-IgG-kompleksi (P*3) (b) anti-kasvain-IgG (heterologinen)	proteiini A-IgG-kompleksit anti-kasvain IgG (heterologinen)	L-asparaginaasi adiamysiini syklofosfamidi
8	(a) proteiini A		
9	(a) proteiini A-IgG-kompleksi (P*3)		

*Tarkoittaa tuotetta

Tämä keksintö sopii siten hyvin ja on sovitettu ta-
voitteiden saavuttamiseksi ja sillä on mainitut edut ja omi-
naispiirteet sekä myös muita, jotka tässä ovat luontaisia.
Samalla kun kaikki tässä annetut esimerkit ovat itsesynty-
5 sille kasvaimille koirissa, olisi käsitettävä, että nämä
kasvaimet edustavat tunnustettuja ja erinomaisia malleja
niiden vastineista ihmisillä. Terapeuttinen menestys koira-
mallissa käyttäen proteiini-kollodiumhiili-systeemiä (17, 19)
siirrettiin äskettäin ihmisille, joissa objektiivisia kas-
10 vaintakautumia havaittiin neljässä ensimmäisestä viidestä
peräkkäisestä hoidetusta potilaasta (20). Siten tässä esi-
tetyn tiedon koirista, joilla on kasvaimia, odotetaan olevan
menestystä ennustava, kun kohdemenetelmiä ja yhdistelmiä käy-
tetään yhtä hyvin ihmisiin, joilla on itsesyntyisiä kasvai-
15 mia.

Vaikka tämän keksinnön selitys on esitetty nimenomai-
sesti käyttäen happokäsittelyä dissosioivana menetelmänä,
olisi ymmärrettävä, että muita alalla tunnettuja samanarvoi-
sia dissosioivia menetelmiä, kuten edellä lähemmin on selos-
20 tettu, pidetään osana tätä keksintöä ja voidaan käyttää,
kuten alaan perehtynyt helposti ymmärtää.

Kirjallisuusviitteet

1. Bier, M., Electrophoresis, (toim. M. Bier), Academic Press, New York, New York, 1959, s. 263.
2. Bier, M., Membrane Process for Industry, Southern
5 Research Institute, Birmingham, Ala., 1966, s. 218.
3. Bier, M., Sixth Intern. Congress Biochem., New York, 1964.
4. Bier, M., Science 125:1084, 1957.
5. Hanning, K. Electrophoresis, Vol. II, Academic Press,
10 New York, New York, 1967, s. 423.
6. Bier, M., Bruncknew, G.C. ja Roy, H.E. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs 13:227, 1967.
7. Bier, M. ja Mourlek, S.P. Proc. Third Annual American Water Resources Conference, 1967, s. 524.
- 15 8. Bier, M., Bruckner, G.C., Cooper, F.C. ja Roy, H.E. Concentration of Bacteriophage by Electrophoresis, Transmission of Viruses, Water Route, New York, 1967, s. 57.
9. Bier, M. Symposium on Electrodialysis, Electrochemical
20 Society, Boston, Mass., 1968.
10. Bier, M., Beavers, D.C., Merriman, W.G., Merkel, F.K., Eisenman, B. ja Starzl, T.Z. Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs, Vol. XVI, 1970.
11. Forsgren A., Sjoquist J. J. Immunol. 1966, 97:822.
- 25 12. Kronvall G., Frommel D. Immunochem. 1970, 7:124.
13. Kessler, S.W. J. Immunol. 1975, 115:1617.
14. Stalénham G., Gotze O., Cooper N.R., Sjoquist J., Muller-Eberhard, H.J. Immunochem. 1973, 10:501.
15. Vallota, E.H., Muller-Eberhard, H.J. J. Exp. Med. 1973,
30 137:1109.
16. Stalénham, Castensson, S. FEBS Letters 1974, 14:79.
17. Terman, D.S., Yamamoto, T., Mattioli, M., Cook, G., Tillquist, R., Henry, J., Poser, R., Daskal, Y. J. Immunol. 1980 124:795.
- 35 18. Holohan, T., Bowles, C., Deisseroth, A., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., Am. Soc. Clin. Oncol. 21:241 abstract.

19. Terman DS, Yamamoto T, Tillquist RL, Henry JF, Cook CL, Silvers A, Shearer WT. Science 1980, 209:1257.
20. Terman DS, Young YB, Shearer WT, Ayus C, Lehane D, Mattioli C, Espada R, Howell JF, Yamamoto T, Zaleski HI,
5 Miller L, Frommer P, Fedlman L, Henry JF, Tillquist R, Cook G, Daskal Y: N Engl J Med 1981, 305:1195.
21. Young JB, Ayus JC, Miller LK, Webster RO, Miller RR, Terman DS: Circulation 1981, 64:325 abstract.
22. Martin, RR, Crowder, JG, White AJ, J. Immunol. 99 269,
10 1967.
23. Gustafsen, GT, Stalenheim G, Forsgren A, Sjoquist, J, J. Immunol. 100, 530, 1968.
24. Heczko, PB, Grov A, Oeding P, Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B, 81, 731, 1973.
- 15 25. Gustafsen, GT, Sjoquist J, Stalenheim, G., J. Immunol. 98, 1178, 1967.
26. Masuda S ja Kondo I, Microbiol. Immunol. 23, 1223, 1979.
27. Kronvall, G ja Gewurz, Clin. Exp. Immunol. 7, 211, 1970.
28. Stalenheim, G., Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Section
20 B, 79, 665, 1971.
29. Sjoquist J ja Stalenheim, G., J. Immunol. 103, 467, 1969.
30. Stalenheim, G, Gotze O, Cooper N, Sjoquist J, Muller-Eberhard H, Immunochemistry, 10, 501, 1973.
- 25 31. Stalenheim G, Malmheden, Ericksson, I, FEBS Lett. 14 82, 1971.
32. Stalenheim G ja Castensson S, FEBS Lett. 14, 79, 1971.
33. Langone, JJ, julkaisussa Methods in Enzymology, Academic Press, Inc. N.Y., 70, 356, 1980.
- 30 34. Langone, JJ, J. Immunol. Methods. 34, 93, 1980c.
35. Langone, JJ, Boyle, MDP, Borsos, T., J. Immunol. 121, 333, 1987.
36. Lancet D., Isenman D., Sjodahl J., Sjoquist J., Pecht I., Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 608, 1978.
- 35 37. Hallgren, R ja Stalenheim, Immunology, 30, 755, 1976.
38. Hallgren, R ja Stalenheim G., Immunology 35, 13, 1978.
39. Martin RR ja White A, J. Immunol. 102, 437, 1969.

40. Campbell D.S., Luescher E., ja Lerman L.S., Natl. Acad. Sciences 37:575, 1951.
41. Sjogren H.O., Hellstrom I., Bansal S.C. ja Hellstrom K.E., Proc. Natl. Acad. Sciences 68:1372, 1971.
- 5 42. Faldt R., Ankerst J., Int. J. Cancer 26:309, 1980.
43. Dorsett, Iochim, Stolback, Int. J. Cancer 16:779, 1975.
44. Kabat, E.A., Mayer, M.M., Experimental Immunochemistry C.C., Thomas, Springfield, IL, 1948, s. 480.
45. Behring; Kitasato, Dtsch. Med. Wochenschr. 16:113, 1890.
- 10 46. McKhann, C.F.; J. Infect. Dis. 52:268, 1933.
47. McKhann, C.F., Green, A.A.; Coady, H. J. Pediatr. 6:603, 1935.
48. Eley, R.C.; Green, A.A.; McKhann, C.F., J. Pediatr. 8:135, 1936.
- 15 49. Stokes, J., Jr., Maris, E.P.; Gellic, S.S., J. Clin. Invest. 23:531, 1944.
50. Ordman, C.W.; Jennings, C.G., Jr.; Janeway, C.A., J. Clin. Invest. 23:541, 1944.
51. Stokes, J.; Neefe, J.R., J.A.M.A. 127:144, 1945.
- 20 52. Gellis, S.S.; Stokes, J., Jr.; Brother, G.M.; Hall, W.M.; Gilmore, H.R.; Beyer, E.; Morrissey, R.A., J.A.M.A. 128:1062, 1945.
53. Bruton, O.C., Pediatrics 9:722, 1952.
54. Eibl, M., julkaisussa Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations (toim. B.M. Alving, J.S. Finalyson), U.S. Department of Health, and Human Services, s. 23, 1979.
- 25 55. Ochs, H.D., julkaisussa Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations (toim. B.M. Alving, J.S. Finalyson), U.S. Department of Health, and Human Services, s. 9, 1979.
- 30 56. Condie, RM, julkaisussa Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations (toim. B.M. Alving, J.S. Finalyson), U.S. Department of Health, and Human Services, s. 179, 1979.
- 35 57. Skvaril, F., Barandun, S., julkaisussa Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations

- (toim. B.M. Alving, J.S. Finalyson), U.S. Department of Health, and Human Services, s. 201, 1979.
58. Seiler, FR. julkaisussa Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations (toim. B.M. Alving, J.S. Finalyson), U.S. Department of Health, and Human Services, s. 207, 1979.
59. Funakoshi, S., julkaisussa Immunoglobulins: Characteristics and Uses of Intravenous Preparations (toim. B.M. Alving, J.S. Finalyson), U.S. Department of Health, and Human Services, s. 219, 1979.
60. Lindstrom, G.A., Acta Med. Scand. Suppl. 22, 1, 1927.
61. de Carvalho, S., Cancer, 16, 306, 1963.
62. Sekla, B., Holeckova, E., Janele, J., Libansky, J., Jnevkovsky, O., Neoplasma 14, 641, 1967.
63. Tsirimbas, A.D., Pichlmayr, R., Horninung, B., Pfisterer, H., Thierfelder, S., Brendel, W., ja Stich, W., Klin Wschr. 46, 583, 1968.
64. Marsh, B., Flynn, L. ja Enneking, W., J. Bone and Joint Surgery 54A, 1367, 1972.
65. Parks, L.C., Smith, W.J., Beebe, B., Winn, L., Rafajko, R., Rolley, R., ja Williams G., Melville, Proc. Amer. Cancer Res. ja Amer. Soc. Clin. Oncology 16, 134, 1975.
66. Laszlo, J., Buckley, C.E. ja Amos, D.B., Blood, 31, 104, 1968.
67. Djerassi, I., Clinical Pediatrics 7, 272, 1968.
68. Herberman, R.B., Oren, M.E., Rogentine, G.N. ja Fahey, J.L., Cancer 28, 365, 1971.
69. Brittingham, T.E. ja Chaplin, H., Cancer 13, 412, 1960.
70. Skurkovich, S.V., Kisljak, N.S., Machonkova, L.A. ja Begunenko, S.A., Nature 223, 509, 1969.
71. Skurkovich, S.V., Makhaonova, L.A., Reznichenko, F.M. ja Chevonskiy, G.I., Blood 33, 186, 1969.
72. Ngu, V., Brit. Med. J. 1, 345, 1967.
73. Ghose, T. ja Nigam, S.P., Cancer 29, 1398, 1972.
74. Levy, R., Hurwitz, E., Maron, R. ja Sela, M., Cancer Res. 35, 1182, 1975.

75. Vial, A.B. ja Callahan, W., Cancer 10, 999, 1957.
76. Moolton, F.L. ja Cooperband, S.R., Science, 169, 68, 1970.
77. Parker, C.W., Pharmacol. Rev. 25, 325, 1973.
- 5 78. Segerling, M., Ohanian, S.H. ja Borsos, T., Cancer Res. 35, 3195, 1975.
79. Ruddy, S., Gigli I, Austen KF: N. Engl J Med 287:489, 545, 592, 642, 1972.
80. Wilson MR, Arroyave CM, Nakamura RM, Vaughn JH, Tan EM:
10 Clin Exp Immunol 26:11, 1976.
81. Verhaegen H, DeCock W, DeCree J, Verbruggen F: Cancer 38:1608, 1976.
82. Ryan GB, Majno G: Am J Pathol 86:183, 1977.
83. Hugli TE, Muller-Eberhard HJ: "Advances of Immunology",
15 26. New York: Academic Press, 1978, s. 1.
84. Cochrane Cg, Muller-Eberhard HJ: J. Exp Med 127:371, 1968.
85. Lepow IH, Willm-Kretschmer K, Patrick RA, Rosen RS, Am J Pathol 61:13, 1970.
- 20 86. Vallota EH, Muller-Eberhard HJ: J Exp Med 137:1109, 1973.
87. Johnson AR, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ: Immunology 28:1067, 1975.
88. Hugli TE: "The Chemistry and Physiology of Human Plasma Proteins". New York: Pergamon Press, 1979, s. 225.
- 25 89. Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ: J Clin Invest 49:2427, 1970.
90. Chenoweth DE, Hugli TE: J Immunol 124:1517, 1980.
91. Hugli TE: J Biol Chem 250:8293, 1975.
92. Fernandez HN, Hugli TE: J Biol Chem 253:6955, 1978.
- 30 93. Kassel, R.L., Old, L.J., Carswell, E.A., Fire, N.C., Hardy, W.D., J. Exp. Med. 138, 925, 1973.
94. Cohn, E.J., J. Amer Chem Soc 68:459, 1946.
95. Kistler P. ja Nitschmann Hs., Vox Sang 7:414, 1962.
- 35 96. Killingsworth, L.M. ja J. Savoy, 1972 Manual nephelometric methods for immunochemical determination of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in human serum Clin Chem 18:335.

97. Mancini, G., A.O. Carbonara ja J.F. Heremans, 1965
Immunochemical quantitation of antigens by single radial
immunodiffusion. *Immunochem.* 2:235.
- 5 98. Romer, J., A. Gardi ja P. Kistler, 1979 Assay of
anticomplement activity in solutions of immunoglobulins.
Develop. Biol. Standard 44:147.
99. Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins
during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*
232:52.
- 10 100. Ishiyama, H., K. Okuyama, K. Masuda ja J. Yasuda, 1978
Effects of human immunoglobulin preparations on Fc
rosette formation between anti-D coated erythrocytes and
lymphocytes. *Z. Immun.-Forsch* 154:387.
- 15 101. Webster, R.O. ja P.M. Henson 1978 Rapid micromasurement
of neutrophil exocytosis. *Inflammation* 3:129.
102. Anderson, D.C., M.S. Edwards ja C.L. Baker 1980 Luminol-
enhanced chemiluminescence for evaluation of type III
group B streptococcal opsonins in human sera. *J. Infect.*
Dis. 141:370.
- 20 103. Johnston, R.B., Jr., J.E. Lehmeier ja L.A. Guthrie,
1976 Generation of superoxide anion and chemiluminescence
by human monocytes during phagocytosis in contact with
surface bound immunoglobulin G. *J. Exp. Med.* 143:1551.
104. Levy P.C., Shaw, G.M. ja LoBuglio A.F., *J. Immunol.*
25 Vol. 123, No. 2, 594, 1979.
105. Koren, H.S. ja Williams M.S., *J. Immunol.* Vol. 121, No.
5, 1956, 1978.

Patenttivaatimukset:

1. Kasvainimmunivalmiste, t u n n e t t u siitä, että se käsittää plasmaa normaalista isännästä tai isännästä, jolla on kasvain, jolla plasmalla on seuraavat ominaisuudet

(a) se koostuu vallitsevasti IgG:stä ja IgM:stä ja pienemmistä määristä albumiinia,

(b) Clq-sitoutuminen jakeissa, jotka sedimentoituvat 7S:n toisella puolella sakkaroosi-tiheysgradientillä,

(c) kun sitä infusoidaan isäntään, jolla on kasvain, on tuloksena kasvainmyrkyllisiä reaktioita,

(d) kun sitä verrataan käsittelemättömään rikastettuun immunoglobuliini-poistovirtaukseen, joka saadaan tämän plasman pakkovirtaus-sähköforeesista, sillä on alentuneet IgG-, IgM- ja immuunikompleksien tasot sekä lisääntynyt Clq-sitoutuminen jakeissa, jotka sedimentoituvat 7s:n toisella puolella sakkaroosi-tiheysgradientillä, ja

(e) kun plasma on isännästä, jolla on kasvain, ovat kasvainspesifisten vasta-aineiden tiitterit suurempia kuin 20 000.

2. Kasvainimmunoglobuliinivalmiste, joka on peräisin normaalista isännästä tai isännästä, jolla on kasvain, ja joka on t u n n e t t u seuraavista ominaisuuksista

(a) se koostuu immunoglobuliini G:stä ja pienestä määrästä IgA:ta ja on pääasiallisesti vapaa IgM:stä ja komplementista,

(b) se osoittaa lisääntynyttä Clq:ta sitovaa IgG:tä sedimentoitumisjakeissa, jotka ovat 7S:n toisella puolella sakkaroosi-tiheysgradientillä,

(c) sillä on vähäinen anti-komplementaarinen aktiivisuus,

(d) kun sitä annetaan isännille, joilla on kasvain, on seurauksenakasvainmyrkyllisiä reaktioita, ja

(e) verrattuna hapottamattomaan Cohn-fraktionoituun gammaglobuliiniin, sillä on alemmat IgG- ja IgA-tasot, lisääntynyt Clq-sitoutuminen jakeissa 7S:n toisella puolella,

(f) kun tämä valmiste on peräisin isännästä, jolla on kasvain, sillä on kohonneet kasvainspesifiset vasta-ainetasot ja vähemmän anti-komplementaarista aktiivisuutta.

3. Proteiini A-IgG-valmiste, t u n n e t t u seuraavista ominaisuuksista

(a) se koostuu vallitsevasti IgG:n raskas- ja kevyt-ketjuista ja proteiini A:sta polyakryyliamidi-geeli-sähköforeesilla,

(b) se tunnistetaan raskaissa sedimentoituvissa 7S tai >7S jakeissa sakkaroosi-tiheysgradientillä kasvaneen Clq-sitomisaktiivisuuden kanssa,

(c) se dissosioituu pienempimolekyyllipainoisiksi sitoviksi Clq-osasiksi happamissa olosuhteissa,

(d) se voidaan saostaa 5-%:isella polyeteeniglykolilla tai muilla alaan perehtyneiden tuntemilla immunoglobuliinin saostusmenetelmillä,

(e) sillä on anti-komplementaarinen aktiivisuus,

(f) se estää Fc:stä riippuvan imusoluruusukkeen muodostumisen,

(g) se saa neutrofiilit kasautumaan yhteen ja vapauttamaan myeloperoksidaasia, katepsiinia ja superoksidi-anioneja,

(h) se aiheuttaa koira-erytrosyyttien agglutinaation,

(i) se aiheuttaa komplementin aktivoitumisen, jolloin kehittyy anafylatoksiineja,

(j) se aiheuttaa ei-spesifisestä komplementista riippuvaa koiran nisärauhassyöpäsolujen, hiiri-L-solujen ja ihmisen erytrosyyttien sytotoksisuutta, ja

(k) se kehittyy plasman vuorovaikutuksesta joko vapaan tai ei-kovalenttisesti sidotun proteiini A:n kanssa komplementista riippumattomalla mekanismilla ja sitä ei ole läsnä käsittelyä edeltävässä seerumissa.

4. Proteiini A-IgG-valmiste, t u n n e t t u seuraavista ominaisuuksista

(a) se koostuu vallitsevasti IgG:n raskas- ja kevyt-ketjuista ja proteiini A:sta polyakryyliamidigeeli-sähköforeesilla,

(b) se tunnistetaan raskaissa sedimentoituvissa 7S- tai >7S-jakeissa sakkaroosi-tiheysgradientilla lisääntyneen Clq-sitomisaktiivisuuden kanssa,

(c) se dissosioituu pienempimolekyyllipainoisiksi sitoviksi Clq-osasiksi happamissa olosuhteissa,

(d) se voidaan saostaa 5-%:isella polyetyleeniglykolilla tai joillakin muilla alaan perehtyneiden tuntemilla menetelmillä immunoglobuliinien saostamiseksi,

(e) sillä on anti-komplementaarinen vaikutus,

(f) se estää Fc:stä riippuvan imusoluruusukkeen muodostumisen,

(g) se saa neutrofiilit vapauttamaan myeloperoksidiaasia, katepsiineja ja superoksidianioneita,

(h) se saa aikaan koiraerytrosyyttien agglutinaation,

(i) se sisältää vasta-aineita, jotka säilyttävät antigeeni-affiniteettinsä ja joilla on suhteellisesti lisääntyneet sytotoksiset kyvyt komplementin läsnäollessa ja

(j) kun sitä infusoidaan isäntiin, joilla on kasvain, proteiini A-IgG-kompleksien eri moolisuhteilla, on seurauksena kasvainmyrkyllisiä reaktioita ja kasvaintakautumia.

5. Kasvain-immuuni plasmavalmiste, t u n n e t t u seuraavista ominaisuuksista

(a) kasvaimeen liittyvien vasta-aineiden tiitterit määritettynä epäsuoralla immunogluoresenssilla ovat suurempia kuin 10 000 ja 50 000:een asti,

(b) kasvaimeen liittyvät sitoutumistasot määritettyinä radioimmunoanalyysillä lisääntyvät 85 % yli käsittelemättömän plasman tasojen,

(c) lisäyksestä Clq-sitoutumisessa jakeissa, jotka sedimentoituvat 7S:n toisella puolella sakkaroosi-tiheysgradientilla,

(d) lisäyksestä ontelotilavuudessa ja vähennyksestä sisällytetyissä fraktioproteiineissa Sephadex G-200:lla,

(e) kun sitä infusoidaan isäntiin, joilla on kasvain, on tästä kasvainimmuuniplasmasta seurauksena kasvainmyrkyllisiä reaktioita, ja

(f) kun sitä verrataan nautaplasmaan, tällä kasvain-immuuniplasmalla on alentuneet IgG-, IgM-, IgA- ja fibrinogeenitasot, lisääntynyt Clq-sitoutuminen raskaissa sedimentoituviissa jakeissa ja kohonneet proteiinitasot kromatografoidaessa G-200:lla ontelotilavuudessa alentunein tasoin sisällytetyissä jakeissa.

6. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen valmiste-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että plasma
saatetaan sähköiseen kenttään ja altistetaan sähkövirralle
10 antamaan plasmasta poistovirtaus, jossa on immunoglobuliini-
ja sisältävä rikastunut jae, saatetaan poistovirtaus joko
hapotukseen tai se tehdään emäksiseksi riittävästi antigeeni-
vasta-aine-kompleksien dissosioimiseksi vapauttaen siten
kasvain-spesifisiä vasta-aineita, poistovirtaus neutraloi-
15 daan, ja neutraloidusta poistovirtauksesta suodatetaan sakat.

7. Menetelmä patenttivaatimuksen 2 mukaisen valmis-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että hapote-
taan gammaglobuliini normaalista seerumista tai seerumista,
jossa on kasvainta, hapotettu gammaglobuliini neutraloidaan
20 ja sakka suodatetaan eroon neutraloidusta gammaglobuliinista.

8. Menetelmä patenttivaatimuksen 3 mukaisen valmis-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että proteiini
A-IgG-kompleksi eristetään kasvainta sisältävästä tai nor-
maalista plasmasta perfuusion jälkeen liikkumattomaksi tehdyn
25 Staphylococcus aureus -proteiini A:n läpi saostamalla pro-
teiini A-IgG-kompleksi perfusoidusta plasmasta.

9. Menetelmä patenttivaatimuksen 3 mukaisen valmis-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että proteiini
A:ta inkuboidaan IgG:n kanssa.

30 10. Menetelmä patenttivaatimuksen 3 mukaisen valmis-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että proteiini
A:ta inkuboidaan IgG:n kanssa ja eristetään syntynyt proteiini
A-IgG-kompleksi.

11. Menetelmä patenttivaatimuksen 10 mukaisen val-
35 misteen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että IgG:llä
on kasvainspesifisyys.

12. Menetelmä patenttivaatimuksen 6 mukaisen valmiste-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että seerumia
normaalista isännästä tai isännästä, jolla on kasvain, inkuboidaan tsymosanissa ja tsymosan sitten poistetaan.

12. Menetelmä patenttivaatimuksen 6 mukaisen valmiste-
teen tuottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että seerumia
normaalista isännästä tai isännästä, jolla on kasvain, inkuboidaan tsymosanissa ja tsymosan sitten poistetaan.

5 13. Patenttivaatimuksen 13 mukainen valmiste, t u n -
n e t t u siitä, että proteiini A-IgG-valmisteen valmistuk-
seen käytetty proteiini A sisältää stafylokokkienterotox-
siineja.

10 14. Patenttivaatimuksen 3 mukainen valmiste, t u n -
n e t t u siitä, että proteiini A-IgG-valmisteen valmistuk-
seen käytetty proteiini A sisältää stafylokokkienterotox-
siineja A, B, C, E ja F.

Patentkrav:

1. Tumörimmunpreparat, k ä n n e t e c k n a t
därav, att det omfattar plasma från en normal eller en
5 tumörbärande värd, varvid plasmat har nedanstående egen-
skaper,

(a) består övervägande av IgG och IgM med mindre
mängder av albumin

(b) har Clg- bindning i fraktioner, vilka sedi-
10 menterar 7S i sackarostäthetsgradienten,

(c) resulterar i tumöricidana reaktioner vid in-
fusion i den tumörbärande värden,

(d) vid jämförelse med obehandlat, anrikat immuno-
globulinutflöde, vilket deriverats vid tvångsströmmad e-
15 lektrofores av det nämnda plasmat, uppvisar reducerade
halter av IgG, IgM och immunokomplex samt ökad Clq-bind-
ning i fraktionerna som sedimenterar bakom 7S i sacka-
rostäthetsgradienten, och

(e) då plasmat härstammar från en tumörbärande
20 värd, uppvisar titer av tumörspecifika antikroppar över-
stigande 20,000.

2. Tummörimmunoglobulinpreparat, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det deriverats från en normal
eller en tumörbärande värd och har nedanstående egenska-
25 per.

(a) omfattar immunoglobulin G med en mindre mängd
av IgA och är väsentligen fritt från IgM och komplement,

(b) uppvisar ökad Clq-bindande mängder IgG i se-
30 dimenterande fraktioner bakom 7S i sackarostäthetsgra-
dienter,

(c) har minimal anti-komplementär aktivitet,

(d) resulterar i tumöricidala reaktioner vid admi-
nistration åt tumörbärande värder, och

(e) i jämförelse med icke surgjort Cohn-fraktio-
35 nerat gammaglobulin, har lägre halter av IgG och IgA,
ökad Clq-bindning i fraktioner bakom 7S, och

(f) då det nämnda preparatet deriverats från en tumörbärande värd, har ökade halter av tumörspecifika antikroppar och mindre anti-komplementär aktivitet.

5 3. Protein-A-IgG-preparat, k ä n n e t e c k n a t därav, att det har nedanstående egenskaper

(a) omfattar övervägande tunga och lätta IgG-kedjor och protein A genom polyakrylamidgelelektrofores,

10 (b) identifieras av tunga sedimenterande 7S- eller λ 7S-fraktioner i sackarostäthetsgradienten med ökad Clq-bindande aktivitet,

(c) dissocierar i Clq-bindande fragment med lägre molekyylvikt under sura förhållanden,

15 (d) kan utfällas med 5%:ig polyetylenglykol eller andra immunoglobulin-utfällande procedurer som är kända inom denna teknik,

(e) har antikomplementär aktivitet,

(f) hämmar av Fc beroende lymfosytrosettebildning,

(g) inducerar neutrofiler för aggregering och frigöring av myeloperoxidas, katepriner och superoxidanjoner,

20 (h) inducerar hemagglutination av hund-erytocyter,

(i) inducerar komplementaktivering under bildande av anafylatoxiner,

25 (j) inducerar av icke specifika komplement beroende cytotoxitet av lymadenokarcinoma celler av hund, L-celler av möss och mänskliga erytocyter, och

(k) bildas genom växelverkan mellan plasma och antingen fritt eller icke-kovalent binder protein A genom komplementoberoende mekanism och är ej närvarande i förbehandlingsserum.

30 4. Protein-A-IgG-preparat, k ä n n e t e c k n a t därav, att det har nedanstående egenskaper

(a) omfattar övervägande tunga och lätta IgG-kedjor och protein A genom polyakrylamidgelelektrofores,

35 (b) identifieras av tunga sedimenterande 7S- eller λ 7S-fraktioner i sackarostäthetsgradienten med ökad Clq-bindande aktivitet,

(c) dissocierar i Clq-bindande fragment med lägre molekyylvikt under sura förhållanden,

(d) kan utfällas med 5%:tig polyetylenglykol eller andra immunoglobulin-utfällande procedurer som är kända inom denna teknik,

(e) har antikomplementär aktivitet,

(f) hämmar av Fc beroende lymfocyttrosettebildning,

(g) inducerar neutrofiler för frigöring av myeloperoxidas, katepsiner och superoxidanjoner,

(h) inducerar hemagglutination av hund-erythrocyter,

(i) innehåller antikroppar, vilka bevarar sin antigenaffinitet och har relativt ökade cytotoxiska egenskaper i närvaro av komplement, och

(j) resulterar i tumöricidala reaktioner och tumörregressioner vid infusion i tumörbärande värdar vid skilda molgrader av protein-A-IgG-komplex.

5. Tumörimmunplasmapreparat, k ä n n e t e c k n a t därav, att det har nedanstående egenskaper

(a) har titrar av tumörassocierade antikroppar från 10,000 upp till 50,000 vid indirekt immunofluorescens,

(b) har tumörassocierade bindningsnivåer, vilka genom radioimmunomätning överstiger nivåerna i obehandlad plasma med 85%,

(c) har ökad Clq-bindning i fraktioner som sedimenterar över 7S i sackarostäthetsgradienten,

(d) har ökad hålrumsvolym och uppvisar minskad inkludering av fraktionsproteiner på Sephadex G-200,

(e) vid infusion i tumörbärande värdar, resulterar det tumörimmuna plasmat i tumöricidala reaktioner, och

(f) vid jämförelse med boskapsplasma har det tumörimmuna plasmat minskade grader av IgG, IgM, IgA och fibrinogen, ökad Clq-bindning i tunga sedimenterande fraktioner och ökade proteinhalter som kromatograferar vid G-200 i hålrumsvolym med sänkta nivåer av inkluderade fraktioner.

6. förfarande för framställning av preparatet enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att

plasmats utsätts för ett elektriskt fält och en ström som kan drivas för att från plasmats erhålla ett utflöde med en anrikad fraktion, vilken innehåller immunoglobuliner,

5 utflödet utsätts för surgöring och alkalisering i tillräcklig grad för att dissociera antigen-antikroppkomplex, varigenom de tumörspecifika antikropparna frigörs, utflödet neutraliseras, och fällningarna filtreras från det neutraliserade utflödet.

10 7. Förfarande för framställning av preparatet enligt patentkravet 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att gamma-globulin från ett normalt eller ett tumörbärande serum surgörs, det surgjorda gamma-globulinet neutraliseras, och
15 fällningar filtreras från det neutraliserade gamma-globulinet.

8. Förfarande för framställning av preparatet enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att protein-A-IgG-komplexet från ett tumörbärande eller normalt plasma isoleras efter perfusion över immobiliserat staphylococcus aureus-protein A genom utfällning av protein A-IgG-komplexet från det perfuserade plasmats.

9. Förfarande för framställning av preparatet enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att
25 protein A inkluderas med IgG.

10. Förfarande för framställning av preparatet enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att protein A inkuberas med IgG och det resulterande protein A-IgG-komplexet isoleras.

11. Förfarande för framställning av preparatet enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att
30 IgG har tumörspecifitet.

12. Förfarande för framställning av preparater enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att serum från en normal eller en tumörbärande värd inkuberas
35 i zymosan, och att zymosanet därefter avlägsnas.

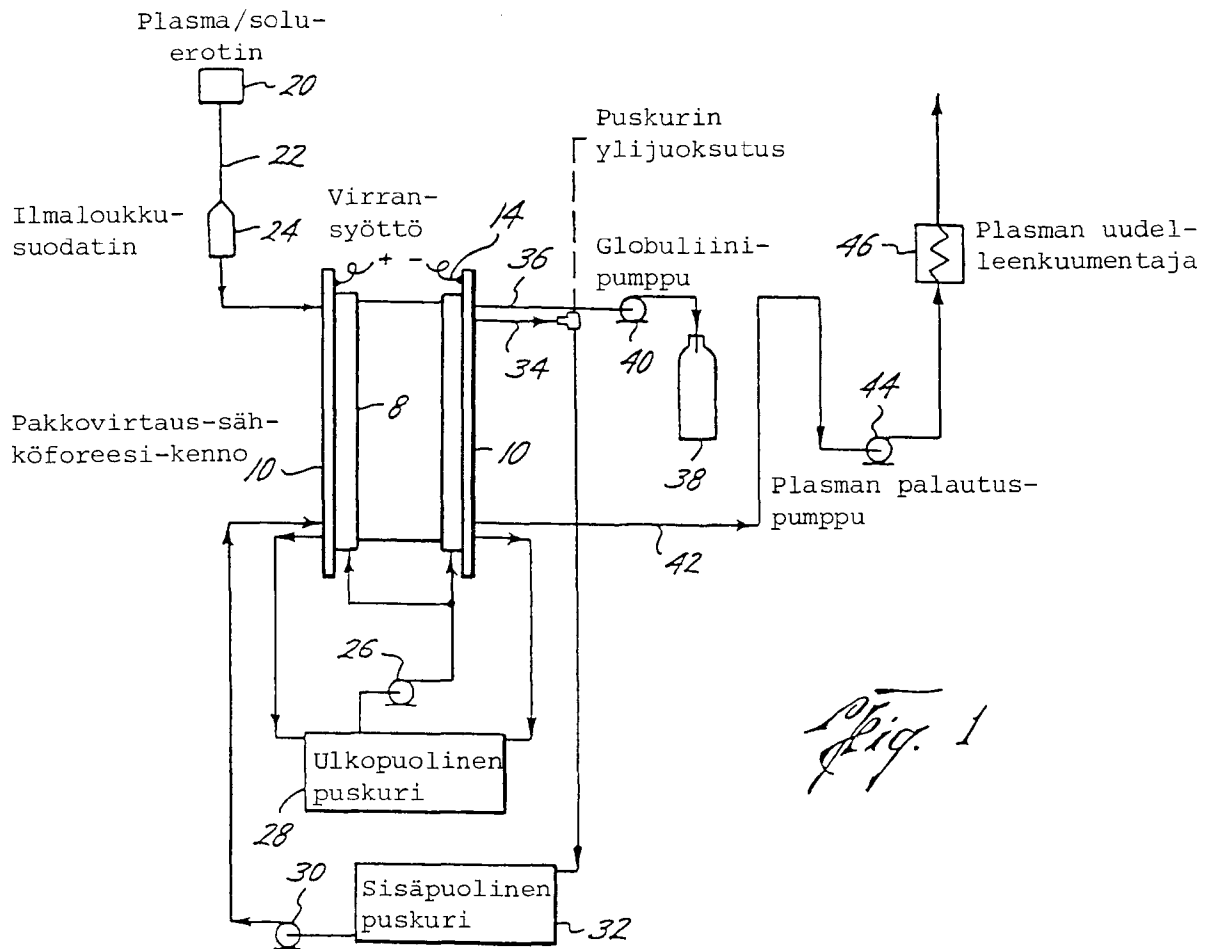


Fig. 1

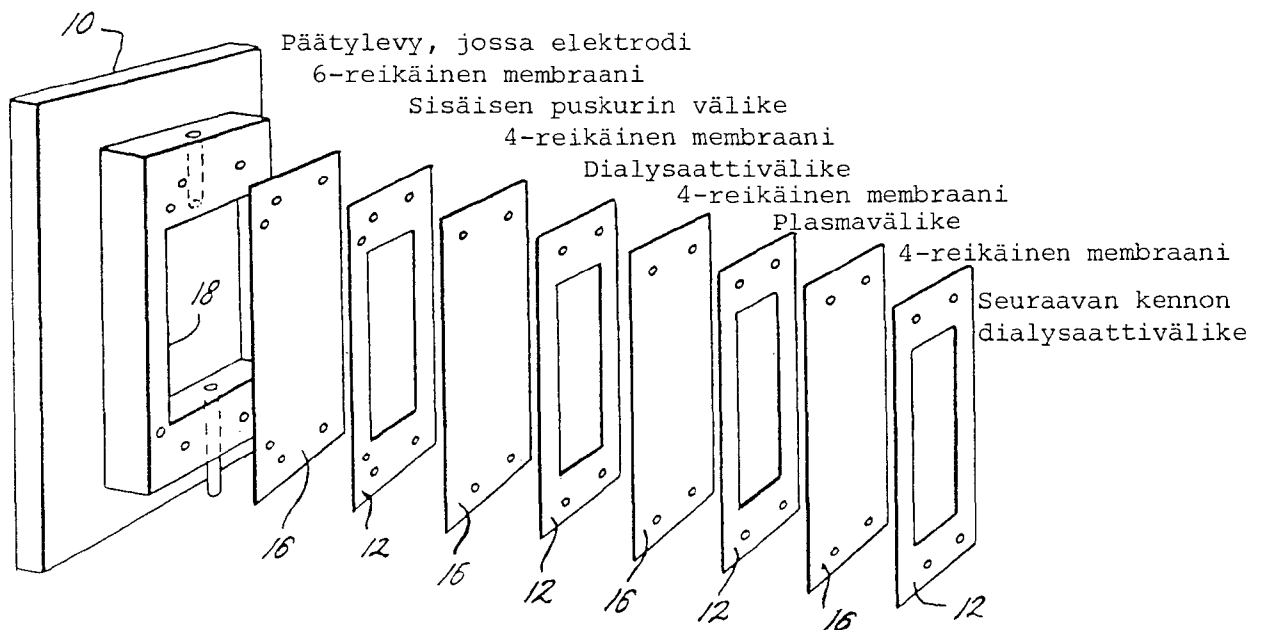


Fig. 2

Hapolla käsitelty koira - IgG

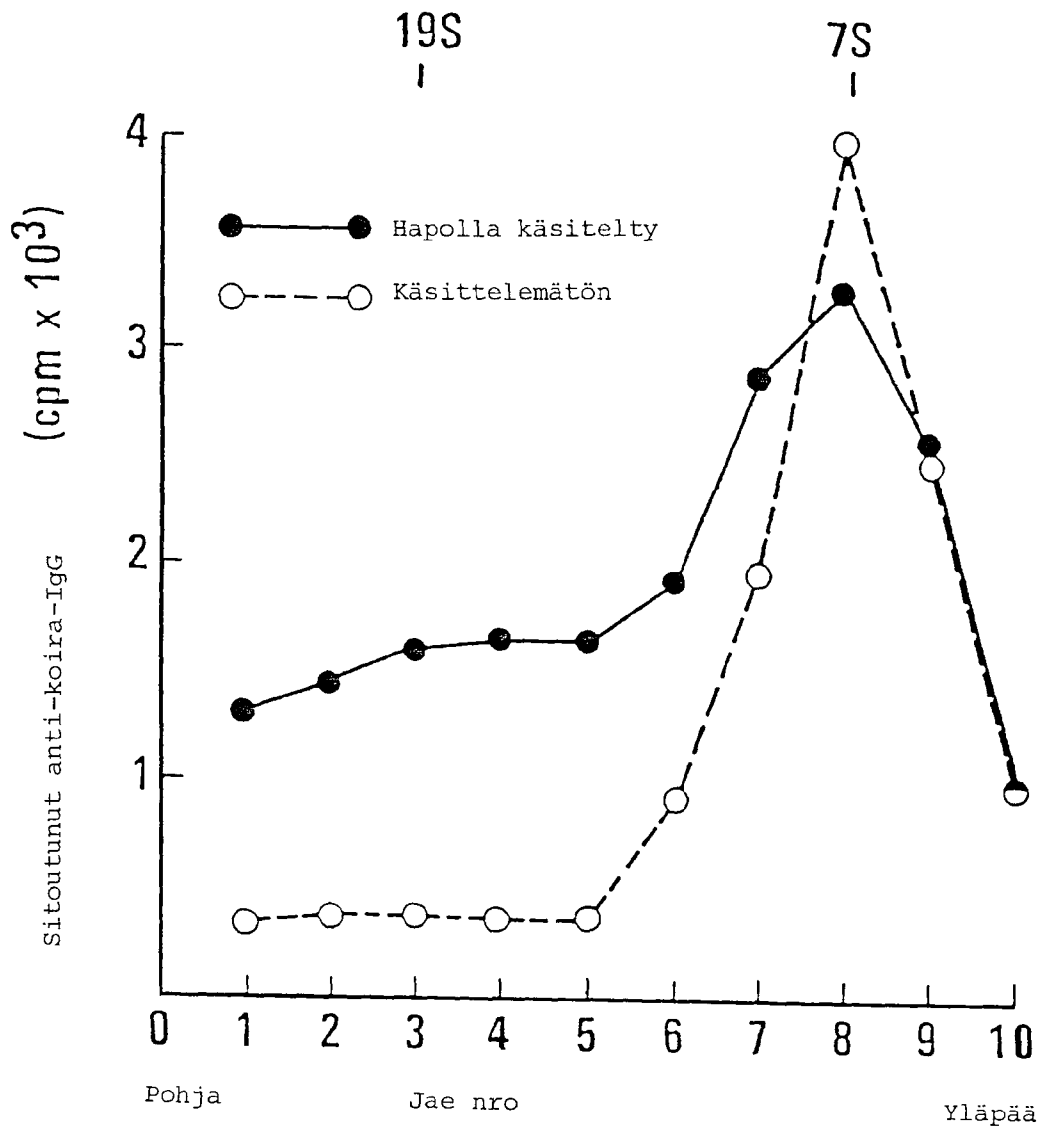
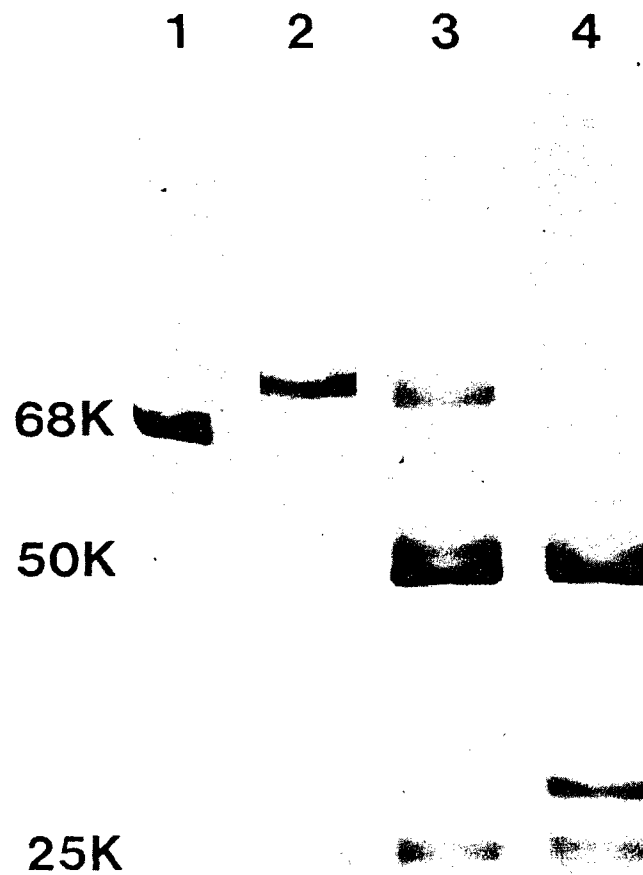
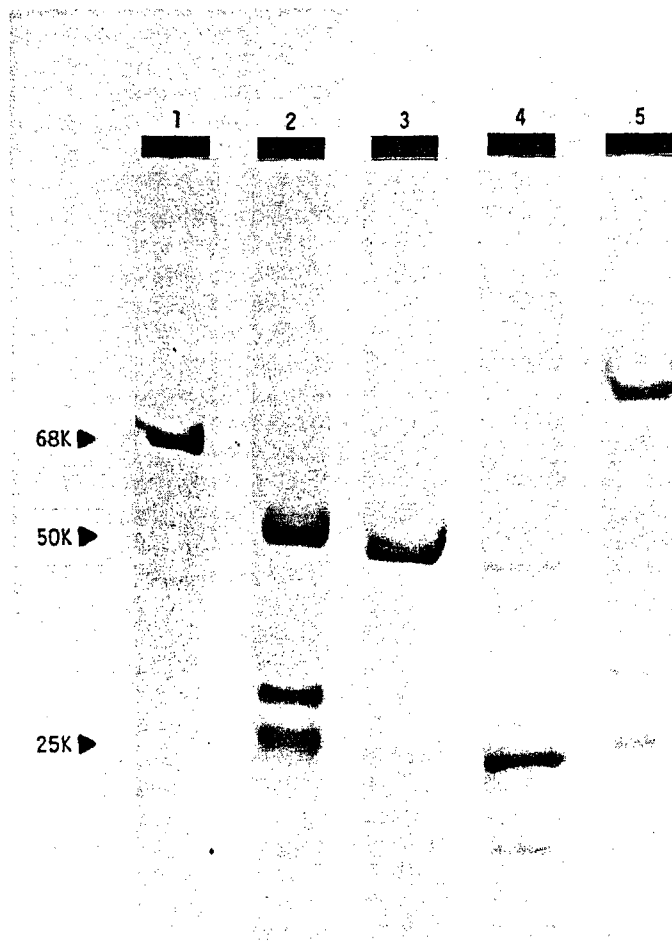


Fig. 3



Suurmolekyyllipainoisen IgG:n, joka on eristetty seerumista perfuusion jälkeen proteiini A-kollodiumhiilen ylitse, polyakryyliamidigeelisähköforeesi (PAGE)

Fig. 4



Proteiini A:n, joka on eristetty seerumista perfuusion jälkeen proteiini A-kollodiumhiilen ylitse, PAGE-profiili

Fig. 5