



F1000100457B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 100457 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.12.97

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

A 61K 35/12, 35/38,
C 07G 17/00, C 12N 5/02

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 893765

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 09.08.89

(24) Alkupäivä - Löpdag 09.08.89

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 11.02.90

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

10.08.88 JP 63-199688 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Bio Defence Institute Co., Ltd, Syouei-kannai Building, 22, Sumiyoshi-cho 2-chome,
Naka-ku, Yokohama-shi, Kanagawa, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Sato, Ichiei, 2413, Ishihara-cho, Takasaki-shi, Gunma, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab, Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä Cohnin V:n fraktion käsittävän koostumuksen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en komposition innefattande Cohn's V fraktion

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 86475 (A 61K 35/12, Nippon Shinyaku Company), EP A 90892 (C 07G 7/00, Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha), US A 4261976 (A 61K 35/12),
Patent Abstracts of Japan, vol. 11, nro 252, Patent Abstracts of Japan, vol. 9, nro 196,
Patent Abstracts of Japan, vol. 8, nro 187

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu menetelmään fysiologisesti aktiivisen, syöpää torjuvan aineen valmistamiseksi. Tässä menetelmässä: nisäkkään vatsaonteloon siirretään syöpäsoluja;
- mainittuun vatsaonteloon laitetaan syöpää torjuvaa ainetta;
- nisäkkäälle, johon on siirretty syöpäsoluja, annetaan suonen sisäisesti normaalisti, saman lajin nisäkkästä saatuja pernasoluja;
- mainittuun vatsaonteloon pidätytyn vesivatsaneste otetaan talteen ennalta määrätyn pituisen ajanjakson kuluttua; ja
- tästä vesivatsanesteestä saatu supernatantineste fraktioidaan Cohnin fraktioinnilla 5. Cohnin fraktion eristämiseksi mainitusta supernatantinesteestä.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av en fysiologiskt aktiv substans med cancerförhindrande verkan i detta förfarande:

- transplanteras cancerceller till maghålan hos ett däggdjur;
- administreras ett cancermotverkande medel i maghålan;
- administreras mjältceller extraherade från ett normalt däggdjur av samma typ intravenöst i venen på det däggdjur, till vilket cancercellerna transplanterats;
- uppsamlas den i maghålan uppsamlade magvätskan efter en förutbestämd tidsperiod; och
- fraktioneras supernatanten av denna magvätska medelst Cohns fraktionering för isolering av fraktionen Cohn V av nämnda supernatant.

Menetelmä Cohnin V:n fraktion käsittävän koostumuksen valmistamiseksi - Förfarande för framställning av en komposition innefattande Cohn's V fraktion

Keksintö kohdistuu menetelmään Cohnin V:n fraktion käsittävän koostumuksen valmistamiseksi. Tällä koostumuksella on syöpää torjuvaa vaikutusta.

Japanilaisessa julkaistussa patenttijulkaisussa 57-140726 kuvataan fysiologisesti aktiivisen aineen, jolla on syöpää torjuvaa vaikutusta, puhdistusmenetelmä. Tämän menetelmän yhtenveto on seuraavanlainen. Fysiologisesti aktiivista proteiinimateriaalia, jolla on syöpää torjuvaa vaikutusta, indusoidaan antamalla nisäkkäälle yhdenlaista tai useampaa kuin kahdenlaista ainetta, jolla on retikuloendoteelijärjestelmää aktivoivaa vaikutusta, mitä seuraa gram-negatiivisista bakteereista peräisin olevan endotoksiinin injektoiminen. Täten saatu fysiologisesti aktiivisen aineen raakaliuos (tai sellaisen fysiologisesti aktiivisen, syöpää torjuvan proteiinimateriaalin raakaliuos, joka proteiinimateriaali on indusoitu lisäämällä gram-negatiivisista bakteereista peräisin olevaa endotoksiinia nisäkkään aktivoituja makrofageja sisältävään kudosisäilytysliuostaan) adsorboidaan emäksiseen ioninvaihtohartsiin, eluoitunut liuos geelisuodatetaan sen materiaalin, jonka molekyylipaino on 30-70 K, ottamiseksi talteen, minkä jälkeen materiaalia käsitellään edelleen tarvittaessa affiniteettikromatografisesti käyttäen tuotetta Sieber chromic blue-F3G-A edellä mainittua, fysiologisesti aktiivista proteiinimateriaalia sisältävän fraktion saamiseksi, jolloin saadaan puhdistettua, fysiologisesti aktiivista proteiinimateriaalia, jolla on syöpää torjuvaa vaikutusta.

Syövän hoitamiseen on käytettävissä kahteen luokkaan kuuluvia, syöpää torjuvia aineita. Yhden luokan muodostavat niin kutsutut "kemoterapeuttiset aineet", jotka tuhoavat syöpäsoluja

suoran kosketuksen seurauksena syöpää sairastavassa organismissa, ja toisen luokan muodostavat niin kutsutut "immuuniadoptoivat terapeuttiset aineet", jotka vahvistavat ja elvyttävät syöpäsolujen (tai syöpäkudoksen) lisääntymisen seurauksena heikentyneen, syöpää sairastavan organismin biologista torjuntamekanismia.

Kemoterapeuttisella aineella voi olla haitallisia sivuvaikutuksia. Se voi esimerkiksi vahingoittaa normaaleja soluja syöpäsoluja vastaan tarkoitetulla sytotoksisella vaikutuksellaan, ja sen annokset on pidettävä pieninä, mikä voi aiheuttaa tehotomuutta syöpäsoluja vastaan niiden sijainnista riippuen, tai minkä seurauksena syöpäsolut voivat kehittää vastustuskykyä näitä aineita vastaan.

Näiden ongelmien ratkaisemiseksi alalla on yritetty siirtää syöpää torjuva aine primäärin kohdan osaan suurena pitoisuutena. Alalla on esimerkiksi kokeiltu monoklonaaliseen vasta-aineeseen konjugoitua syöpää torjuvaa ainetta, joka vaikuttaa syövän tähän osaan.

Toisaalta immunologista hoitavaa ainetta ("immuuniadoptoiva terapeuttinen aine") käytettäessä tavoitteena on ollut kasvainta torjuvan vaikutuksen aikaansaaminen sytokiinin avulla kuten esimerkiksi lymfokiinin avulla tai monokiinin avulla, joka on indusoitu aktiivisella syövän inaktivoimalla tai inhiboimalla immuunijärjestelmää.

Näin ollen immunologisella hoitavalla aineella on harvoin normaaleihin soluihin kohdistuvaa haitallista vaikutusta sitä pitkäaikaisesti annettaessa. Koska tämä aine ei vaikuta suoraan syöpäsoluihin (eikä syöpäkudokseen), niin sen haittana on välittömän tehokkuuden puuttuminen.

Oheisen keksinnön puitteissa on tutkittu laajasti sellaisen fysiologisesti aktiivisen aineen immuuniaktivoivaa vaikutusta, jota ainetta muodostui nisäkkään vesivatsassa (ascites) syöpä-

solujen istuttamisen jälkeen. Keksinnössä on saatu aikaan sopiva tekniikka fysiologisesti aktiivisen, syöpää torjuvan aineen tuottamiseksi syöpää sairastavan organismin vesivatsasta.

Näin ollen keksinnön mukaisesti on aikaansaatu menetelmä Cohnin V:n fraktion käsittävän koostumuksen valmistamiseksi, jossa menetelmässä syöpäpotilaan, jonka tila on kohentunut immuunitarkkailuhoidon seurauksena, vatsaontelosta otetaan talteen vesivatsanestettä, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että mainitusta talteenotetusta vesivatsanesteestä saatu supernatanttinen fraktioidaan Cohnin fraktioinnilla Cohnin V:n fraktion eristämiseksi supernatanttineesteestä.

Keksinnössä saadaan aikaan fysiologisesti aktiivisen, syöpää torjuvan aineen eristäminen uuttamalla V:stä Cohnin fraktios- ta, joka on peräisin immuunitarkkailuhoidolla kunnostetun syöpäpotilaan vatsaontelosta saadun vesivatsanesteen supernatanteista.

Todettiin, että syöpäpotilaan, jolle annettiin etukäteen syöpää torjuvaa ainetta ja sitten annos oheisen keksinnön mukaisesti saatua, biologisesti aktiivista ainetta sisältävää fraktiota, ilmeinen elinaika piteni tällä tavalla käsittelemättömiin syöpäpotilaisiin verrattuna, mitattuna määrittämällä elinaikaa merkittävästi pidentävän kemoterapian tarve. Tämä tulos paljasti fysiologisesti aktiivisen aineen, jolla on syöpää merkittävästi torjuvaa vaikutusta, läsnäolon edellä mainitussa fraktiossa.

Näin ollen keksinnössä saadaan aikaan hyvin hyödyllinen aine, jolla on syöpää torjuvaa vaikutusta.

Seuraavat, käytännön sovellutuksia kuvaavat esimerkit havainnollistavat keksintöä yksityiskohtaisesti, keksinnön rajoittumatta kuitenkaan näihin esimerkkeihin.

Kuviot 1A - 3D ovat oheisen keksinnön mukaisilla, fysiologisesti aktiivisilla aineilla saatuja eloonjääntikäyriä sekä vertailuryhmien käyriä, jotka havainnollistavat keksinnön mukaisen, biologisesti aktiivisen aineen kasvainta torjuvia vaikutuksia.

Esimerkki 1

1. Syöpäsoluja sisältävän vesivatsan valmistaminen

Solujen lisäämiseksi hiiren rintasyövän solulinjan soluja eli MM46-soluja siirrettiin C3H/He-hiirien (8 viikon ikäisiä uros-puolisia hiiriä) vatsaonteloon solumäärän ollessa 1×10^5 - 10^6 solua/hiiri. Kymmenen vuorokautta myöhemmin hiirien vatsaonteloon pidättynyt vesivatsaneste otettiin talteen ja sentrifugoitiin (800 rpm 10 minuutin ajan) MM64-solujen eristämiseksi. Sitten MM46-solukasaumat suspendoitiin fysiologiseen suola-liuokseen punaisten verisolujen poistamiseksi sentrifugoimalla nopeudella 800 rpm 10 minuutin ajan kahteen tai kolmeen kertaan. Solukasaumat suspendoitiin jälleen fysiologiseen suola-liuokseen siten, että solutiheys oli 2×10^5 solua/ml. Edellä kuvattu käsittely toteutettiin steriileissä olosuhteissa jäissä jäähdyttäen.

2. Pernasolujen valmistaminen

BALB/c-hiiren pernasolut käsiteltiin tavalliseen tapaan, eli normaalista BALB/c-hiirestä (8 viikon ikäinen uroshiiri) steriileissä olosuhteissa eristetty perna murskattiin välittömästi ja upotettiin Hank:in liuokseen, suodatettiin ruostumattoman seulan läpi (200 mesh) halkaisijaltaan 60 millimetrin petri-maljaan vapaita soluja sisältävän liuoksen saamiseksi, joka liuos pestiin sitten Hank:in liuoksella ja sentrifugoitiin.

Sitten liuos, joka sisälsi 0,83-prosenttista ammoniumkloridia NH_4Cl ja 0,17 molaarista Tris-HCl-puskuria suhteessa 9:1 (pH 7,65), steriloidtiin suodattamalla. Pernasolujen kasaamaan li-sättiin 10-kertainen määrä mainittua puskuriliuosta. Nopean sekoittamisen jälkeen tämä seos sentrifugoitiin nopeudella 1000 rpm 10 minuutin ajan alhaisessa lämpötilassa, ja tämän

jälkeen jäljelle jäänyt, punaisten verisolujen pigmentti poistettiin pesemällä kolme kertaa fysiologisella suolaliuoksella pernasolupreparaatin saamiseksi, jota preparaattia käytettiin fysiologiseen suolaliuokseen suspendoituna 4 °C:n lämpötilassa 16 tunnin aikana.

3. Fysiologisesti aktiivisen aineen valmistaminen

Kohdassa 1 kuvatulla tavalla saatuja MM46-soluja siirrettiin 8 viikon ikäisten C3H/He-hiirien vatsaonteloon (2×10^4 solua/-hiiri), ja sitten kolmen vuorokauden kuluttua vatsaonteloon laitettiin syöpää torjuvana aineena tuotetta "Aclacinon" (yhtiön Yamanouchi Pharmaceutical Co. valmistama aklarbisiini-hydrokloridi, josta käytetään seuraavassa lyhennettä "ACR") määränä 3 mg/kg). Kun solujen siirtämisestä oli kulunut 4-6 vuorokautta, edellä kohdassa 2 valmistettuja BALB/c-hiiren pernasoluja annettiin edellä mainittujen C3H/He-hiirten häntälaskimoon määränä 1×10^4 solua/hiiri. Kun siirtämisestä oli kulunut 21-25 vuorokautta, C3H/He-hiirten vatsaonteloon pidätynyt vesivatsaneste otettiin talteen (verta sisältäviä vesivatsanesteitä ei käytetty seuraavissa kokeissa). Seuraavassa vaiheessa mainitun vesivatsanesteen sisältämät solujäännökset, kuten MM46-solut ja hiiren verisolut, poistettiin sentrifugoimalla nopeudella 10000 rpm 20 minuutin ajan, supernatantineste pakastekuivattiin ja väkevöitiin, ja tämä tiiviste jaettiin fraktioiksi Cohn'in fraktioinnilla (fraktiointi orgaanisella liuottimella), jolloin saatiin 5. fraktio.

Kasvainta torjuva koe

Seuraavat kokeet toteutettiin edellä kuvatulla menetelmällä saadun 5. Cohn'in fraktion (jota kutsutaan seuraavassa "vesivatsan johdannaiseksi") kasvainta torjuvan vaikutuksen selvittämiseksi.

Koemenetelmät

Edellä kuvatulla menetelmällä valmistettiin kolmentyyppisiä vesivatsan johdannaisia ja kaksi erilaista vesivatsan johdannaista valmistettiin vertailunäytteiksi (taulukko 1).

Vesivatsan johdannainen, jota taulukossa 1 merkitään näytteenä 1, on vertailu, joka saatiin käsittelemällä edellä kuvatun menetelmän 3 mukaisesti sellaista vesivatsanestettä, joka oli saatu C3H/He-hiirten vatsaonteloista 21. vuorokautena MM46-solujen siirtämisen jälkeen ilman, että hiirille oltaisiin annettu tuotetta ACR tai pernasoluja.

Huomautettakoon, että hiirissä, joihin oli siirretty vain MM46-soluja, vesivatsan neste pysyi vatsaontelossa, ja suurin osa näistä hiiristä kuoli (pääasiassa seerumin vesivatsaisuuteen) suunnilleen 18. tai 19. vuorokautena, joten vesivatsan nestettä saatiin talteen vain muutamasta hiirestä.

Taulukko 1

Vesivatsan johdannaisten valmistaminen

Näytteen numero	vesivatsa otettu vuorokautena	vesivatsa otettu hiiristä, jotka oli käsitelty	hiirten lkm., joista vesi-vatsa otettiin	saanto (mg)
1	21. vrk	vain MM46-soluilla	4	879
2	21. vrk	MM46-soluilla ja (3 vrk:n kuluttua) ACR:llä	9	1671
3	21. vrk	MM46-soluilla, (3 vrk:n kuluttua) ACR:llä ja (4 vrk:n kuluttua) pernasoluilla	11	1796
4	21. vrk	MM46-soluilla, (3 vrk:n kuluttua) ACR:llä ja (6 vrk:n kuluttua) pernasoluilla	8	1620
5	21. vrk	MM46-soluilla, (3 vrk:n kuluttua) ACR:llä ja (6 vrk:n kuluttua) pernasoluilla	4	522

Vesivatsan johdannainen, jota taulukossa 1 merkitään näytteenä 2, on vertailu, joka saatiin käsittelemällä edellä kuvatun menetelmän 3 mukaisesti sellaista vesivatsanestettä, joka oli saatu C3H/He-hiirten vatsaonteloista 21. vuorokautena MM46-solujen siirtämisen jälkeen, joille hiirille oli annettu tuotetta ACR (3 mg/kg) 3 vuorokauden kuluttua MM46-solujen siir-

tämisen jälkeen.

Näytteet 3, 4 ja 5 ovat vesivatsan johdannaisia, jotka on fraktioitu edellä olevassa esimerkissä kuvatulla tavalla siten, että kunkin näytteen tapauksessa eripituisen ajanjakson annettiin kulua MM46-solujen siirtämisen jälkeen ennen pernasolujen antamista (4-6 vrk) tai vesivatsan ottamista talteen (21-25 vrk).

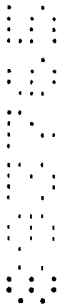
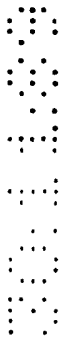
Vesivatsasta saadut näytteet 3, 4 ja 5 ovat väriltään keller-täviä, ja runsaasti MM46-soluja sisältävän liuoksen sameus oli vähäisempää kuin näytteissä 1 ja 2 (mikäli hiiristä talteen-otettu vesivatsaneste sisälsi hemoglobiinia, sitä ei käytetty Cohnin fraktiointiin).

Seuraavassa vaiheessa edellä kuvatun menetelmän 1 mukaisesti valmistettuja MM46-soluja siirrettiin (2×10^4 solua/hiiri) koe-ryhmiin kuuluvien, 8 viikon ikäisten urospuolisten C3H/He-hiirien vatsaonteloon ja sitten niiden vatsaonteloihin annettiin seuraavana päivänä tuotetta ACR (10 mg/kg), vastaavasti.

Edelleen, seuraavana päivänä vesivatsan johdannaisia, eli näytteitä 1-5, annettiin vastaavasti (12,5 mg/kg) jatkuvasti 10 vuorokauden ajan kuolemantapausten toteamiseksi seuraavien 45 vuorokauden aikana. Tulokset esitetään taulukossa 2 (1-i, i-j, 1-k).

Sama toimenpide suoritettiin vertailuna niille hiirille, joille ei oltu annettu tuotetta ACR, sekä hiirille, joille oli annettu kaupallisesti saatavaa albumiinia (Sigma Co., Ltd, eränumero 45F-9339) (12,5 mg/kg) hiiren vesivatsan johdannaisen sijasta ACR:n antamisen jälkeen.

Koetulokset määritettiin syövän hoidossa tavanomaisten tehokkuusmääritysten mukaisesti elossapysymisajan mediaanin (josta käytetään seuraavassa lyhennettä "MST") tai elinvuorokausien keskimääräisen lukumääräsuhteen (T/C %) ja elinvuorokausien keskimääräisen lukumäärän sekä mediaanihiiren (5. kuolleen hiiren) elinvuorokausien lukumäärän määrittämiseksi.



Taulukko 2

MM46-syöpää vastaan vaikuttavien preparaattien erilaisten yhdistelmien kasvaimia torjuvat tehokkuudet hiiressä

1. koe

1. koe

Vrk Ryhmä		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	45	Elinpäiv. keskimäär. 1km. + SD	Eloon- jään. hiirt. 1km.	Mediaa- nihi- ren elinpv:t	M.S.T	T/C %
		1	2	4	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20.9±0.7	0	21	21.6
1-a	MM46		1	2	4	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20.9±1.4	0	21	21.8	101
1-b	+ Näyte 3	1		3	2	3	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21.3±1.0	0	21	21.9	101
1-c	+ Näyte 5		1		5	3	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	26.8±1.3	0	27	27.5	
1-d	+ ACR							1		3	3	2	1	/	/	/	/	/	/	/	28.0±1.8	1	28	29.3	
1-e	+ACR+Näyte1								1	1	2	1	2	1	1						28.0±2.3	1	29	29.5	107
1-f	+ACR+Näyte2								2	1	1		3	1		1					24.5±2.8	0	25	25.5	
1-g	+ ACR	1				1		1	5		1		1	/	/	/	/	/	/	/	26.7±3.0	1	27	27.8	109
1-h 1-h	+ACR +Kaupalli- nen tuoteA					1	1			2	2	2					1				*	4	30	31.5	124
1-i	+ACR+Näyte3				1			1		1		1		1	1						*	4	28	32.5	127
1-j	+ACR+Näyte4						1		2	1		1				1					*	4	29	30.5	120
1-k	+ACR+Näyte5									1	3		1	1							*	4	29	30.5	120

* Ei voitu laskea, koska eloonjääneitä hiiriä oli liikaa
SD Standardipoikkeama

Koetulokset (taulukko 2)

Vertailuryhmään (1-a) kuuluvien hiirien tapauksessa, joihin hiiriin oli siirretty vain MM46-soluja, vesivatsanestettä todettiin kerääntyvän vatsaonteloon nopeasti noin 10. vuorokaudesta lähtien, ja hiiret alkoivat kuolla noin 19. vuorokautena solujen siirtämisen jälkeen. Kaikki hiiret olivat kuolleet 22. vuorokautena.

Vertailuryhmään (1-b tai 1-c) kuuluvien hiirien, joille vesivatsan johdannaisia (näyte 3 tai 5) annettiin jatkuvasti 10 vuorokautta MM46-solujen siirtämisen jälkeen tuotetta ACR antamatta, elinvuorokausien lukumäärä ei ollut merkittävästi erilainen kuin edellä mainittuun käsittelemättömään ryhmään kuuluvien hiirien tapauksessa, eli noin 21 vuorokautta, joten näissä tapauksissa ei todettu kasvainta merkittävästi torjuvaa vaikutusta.

Elinaikaa pidentävää vaikutusta ei siis todettu pelkillä oheisen esimerkin mukaisilla vesivatsan johdannaisilla MM46-soluja käsitävissä hiirissä.

Vertailuryhmien (1-d ja 1-g) hiiret, joihin oli siirretty MM46-soluja ja joille oli annettu ACR-tuotetta seuraavana päivänä, mutta joille ei oltu annettu vesivatsan johdannaisia, pysyivät elossa monta vuorokautta kauemmin kuin edellä mainittuihin vertailuryhmiin (1-b ja 1-c) kuuluvat hiiret, joille oli annettu vesivatsan johdannaisia muttei tuotetta ACR, ja kaikki ryhmien (1-d ja 1-g) olivat kuolleet 29. vuorokautena.

Kulloinkin yksi hiiri jäi eloon vertailuryhmästä (1-e), johon kuuluville hiirille annettiin vesivatsan johdannaisena näytettä 1 jatkuvasti 10 vuorokauden ajan MM46-solujen siirtämisen jälkeen ja tuotetta ACR seuraavana päivänä, vertailuryhmästä (1-f), johon kuuluville hiirille annettiin vesivatsan johdannaisena näytettä 2 jatkuvasti 10 vuorokauden ajan, sekä vertailuryhmästä (1-h), johon kuuluville eläimille annettiin kaupallisesti saatavaa ihmisen seerumin albumiinia jatkuvasti 10 vuorokauden ajan. Näiden tulosten perusteella näytteellä 1 ei to-

dettu missään tapauksessa elinaikaa pidentävää vaikutusta.

Ryhmiin (1-i, 1-j, 1-k) kuuluvat hiiret, joille annettiin tuotetta ACR ja vesivatsan johdannaisia (näytteet 3, 4 ja 5), pysyivät elossa vuorokausia, eloonjäämisasteen ollessa suuri vielä 45 vuorokauden jälkeen. Näytteiden 3, 4 ja 5 aiheuttamat pidentyneet elinajat eivät eronneet merkittävästi toisistaan.

Edellä kuvattuihin kokeisiin liittyvät, tyypillisillä ryhmillä saadut eloonjäämiskäyrät on esitetty kuvioissa 1A-1D.

Tämän jälkeen valmistettiin näytteenä 3'₁ ja 3'₂ vesivatsan johdannaiset samalla tavalla kuin näyte 3, ja näillä näytteillä toteutettiin kokeet 2 ja 3 samalla tavalla kuin koe 1. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Näissä kokeissa vertailuryhmiksi valittiin ryhmä, jonka eläimille annettiin fysiologista suolaliuosta jatkuvasti 10 vuorokauden ajan samansuuruisena annoksena (joka kerran 0,1 ml/hiiri) kuin koenäytteitä MM46-solujen siirtämisen jälkeen, ryhmä, jonka eläimille annettiin tuotetta ACR MM46-solujen siirtämisen jälkeen, sekä ryhmä, jolle annettiin kaupallisesti saatavaa ihmisen seerumin albumiinia vesivatsan johdannaisten sijasta jatkuvasti 10 vuorokauden ajan.

2. koe

MM46-syöpää vastaan vaikuttavien preparaattien erilaisten yhdistelmien kasvaimia torjuvat tehokkuudet hiiressä

Ryhmä	7	8	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	45	Elinpäiv. keskimäär. 1km. $\pm$ SD	Eloojään. hiirten 1km. $\times$ ($\odot\odot\Delta\times$)	Mediaani- hiirten elinpvi:t	M.S.T	T/C %
2-a MM46 + suola- liuos			1	1	5	2			1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21.2 $\pm$ 1.2	0	2 1	21.7	
2-b + ACR					2		3	3	1											23.1 $\pm$ 1.3	1(0.0,1.0)	2 3	23.2	
2-c + ACR + C.p. A					1			1	2	1	2		1							25.5 $\pm$ 2.2	2(0.0,2.0)	2 6	27.3	118
2-d + ACR + C.p. A						2			2	1	1	1		1						25.1 $\pm$ 2.4	3(3.0,0.0)	2 6	27.5	119
2-e + ACR + Spl. 3'							1	1	1		2								*	*	6(2.3,0.1)	*	*	*
2-f + ACR + Spl. 3'	1						1	1	2	2									*	*	3(1.0,0.2)	2 5	26.3	113
2-g + ACR + Spl. 3'								1	2	1					1				*	*	5(2.1,1.1)	3 0	*	*
2-h + ACR + Spl. 3'									1	2	2	2	1	1	1	/	/	/	/	26.7 $\pm$ 1.8	0	2 6	27.3	118

3. koe

Ryhmä	7	8	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	45	Elinpäiv. keskimäär. 1km. $\pm$ SD	Eloojään. hiirten 1km. $\times$ ($\odot\odot\Delta\times$)	Mediaani- hiirten elinpvi:t	M.S.T	T/C %
3-a MM46 + suola- liuos					3	1	5	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	21.4 $\pm$ 1.0	0	2 2	22.3	
3-b + ACR						1	1	1	2	3				1						24.2 $\pm$ 2.1	1(0.0,0.1)	2 4	25.2	
3-c + ACR + C.p. A							1		2	3	1	1	1							25.1 $\pm$ 1.7	1(1.0,0.0)	2 5	25.8	102
3-d + ACR + C.p. A						1	1	2		3	2			1	/	/	/	/	/	24.5 $\pm$ 2.2	0	2 5	25.5	101
3-e + ACR + Spl. 3'	1						1		1	1	1	1							*	*	4(3.0,1.0)	2 7	*	*
3-f + ACR + Spl. 3'													2						*	*	8(2.2,2.2)	*	*	*
3-g + ACR + Spl. 3'										2	1	2		1					*	*	4(2.1,0.1)	2 6	29.5	117
3-h + ACR + Spl. 3'									1	4	1	1	1	1					/	24.6 $\pm$ 1.3	3(0.2,1.0)	2 4	26.5	105

* Ei voitu laskea, koska eloonjääneitä hiiriä oli liikaa

○ Immunoitu hiiri; ○ Ihon alla oli 1 mm:n kasvaimia

x Jätetty pois (ihon alla oli 4 mm:n tai sitä suurempia kasvaimia)

Δ Epäselvä (ihon alla todettiin 2-3 mm:n kasvaimia

Cp. Kaupallinen tuote; Spl. Näyte

Koetulokset (taulukko 3)

Vertailuryhmillä (2-b ja 3-b), joiden eläimille annettiin tuotetta ACR MM46-solujen siirtämisen jälkeen, todettiin hieman voimakkaampaa elinaikaa pidentävää vaikutusta kuin vertailuryhmillä (2-a ja 3-a), joiden eläimille annettiin vain fysiologista suolaliuosta, mutta lopulta vain yksi hiiri jäi eloon kustakin ryhmästä (2-b ja 3-b). Edelleen, vertailuryhmillä (2-a ja 3-a) ei todettu lainkaan elinaikaa pidentävää vaikutusta injektioneulan pistoärskykkeenä todettuna.

Vertailuryhmillä (2-c ja 3-c), joiden eläimille annettiin tuotetta ACR ja kaupallisesti saatavaa ihmisen seerumin albumiinia MM46-solujen siirtämisen jälkeen, todettiin jonkin verran voimakkaampaa elinaikaa pidentävää vaikutusta kuin vertailuryhmillä (2-b ja 3-b), mutta loppujen lopuksi eloon jäi vain yksi tai kaksi hiirtä.

Toisaalta ryhmien (2-d, 2-e, 3-d ja 3-e), joiden eläimille annettiin tuotetta ACR ja edellä kuvatulla menetelmällä valmistettuja vesivatsan johdannaisia (näyte 3'₁ tai 3'₂), tapauksessa menehtyminen tapahtui myöhemmin kuin muiden edellä mainittujen vertailuryhmien tapauksessa, koska eloonjääneiden eläinten lukumäärä 45 vuorokauden kuluttua solujen siirtämisestä oli suurempi, ja näin ollen niiden elinaikaa pidentävät vaikutukset olivat hyvin huomattavat.

Kuvioissa 2 ja 3 on esitetty edellä mainituista 2. ja 3. koikesta saadut elinajan pitenemiskäyrät tyypillisten ryhmien tapauksessa.

Näiden tulosten perusteella on ilmeistä, että oheisen esimerkin mukaisella menetelmällä valmistetuissa vesivatsan johdannaisissa muodostuu sellaista fysiologisesti aktiivista ainetta, jolla on huomattavaa syöpää torjuvaa vaikutusta.

Esimerkki 2

Immuunitarkkailuhoitoa (niinkutsuttu "Sato:n hoito", joka on kuvattu tutkimusselostuksessa "Research Report, 1979: Research

on Cancer Immune Surveillance Therapy", julkaisija Gan Men-eki Shinkoh Zaidan (Cancer Immunity Promotion Foundation), Japani] sovellettiin syöpäpotilaisiin ja vesivatsanestettä otettiin potilaiden, jotka osoittivat paranamisen merkkejä, vatsaonteloista. Tämän jälkeen solujätteet poistettiin vesi-vatsanesteestä sentrifugoimalla noudattaen edellä kuvatun esi-merkin 1 mukaista menetelmää, ja saatu supernatantti pakaste-kuivattiin ja Cohn:in fraktiointi toteutettiin 5. Cohn:in frak-tion saamiseksi.

Seuraavat tapaukset I-III osoittavat tässä 5. Cohn:in fraktios-sa läsnäolevan fysiologisesti aktiivisen aineen (BRP) spesi-fisen kasvaimia torjuvan vaikutuksen.

Tapaus I

Sukupuoli: nainen

Ikä: 44

Sairaus: A.T.L.A.

Kliiniset löydökset ja hoito:

- (1) Kuumeen ja järjestelmällisen uupumuksen perusteella diagnosoitu A.T.L.A.-sairaudeksi
- (2) Saatettu sairaalahoitoon ja tutkittu.
- (3) Potilaalle annettu injektoimalla tuotteita Aclarcinon 10 mg, Pepleo 10 mg, MMC 2 mg, Oncolin 1 mg, Predonin 20 mg (i) 2. vuorokautena, (ii) 5. vuorokautena ja (iii) 9. vuorokautena tutkimuksen jälkeen.
- (4) Potilaalle annettu infuusiona 11. vuorokautena tis-lattua vettä 24 ml, joka sisälsi 1,25 % esimerkissä 2 saatua BRP-valmistetta.
- (5) Potilaan verenkuvaa sekä alla olevien käsittelyjen immuunivaste todettiin normaaliksi, ja potilas lähe-tettiin kotiin 77. vuorokautena BRP-hoidon jälkeen täysin parantuneena.

Tutkimustulokset

	Tutkimus- vrk.	Seur. vrk.	5 vrk. myöh.	9 vrk. myöh.	10 vrk. myöh.	11 vrk. myöh.	34 vrk. myöh.	59 vrk. myöh.	73 vrk. myöh.	88 vrk. myöh.
Punaiset verisolut	500×10 ⁴				419		317	257	251	388
Valkoiset verisolut	50.000				34.100		21.400	6.200	4.100	4.300
Verihiutaleet	24×10 ⁴						12	17	33	23
Hemoglobiini	100%				85%		62%	49%	49%	77%
Verisolujen tilavuusarvo	45%				37%	Tippana 24 ml	28%	23%	22%	36%
Monosyytti	1	Aclarcinon 10 mg				tislat- tua	1	3	1	6
Lymfosyytti	90	Pepleo 10 mg				vettä, joka sisäl- tää	82	35	7	22
Neutrofiili (sauva)	0	MMC 2 mg					2.5	2.0	9.0	17
Neutrofiili (polymorfi- nen tuma)	8.0	Oncobin 1 mg				1,25 % BRP- valmis- tetta	16.5	9.0	83	52 52 52
Basosyytti	0.5	Predonin 20 mg Injektio.								
CD8	6.9%				1.2%		1.8%		17.3%	42.3%
CD4	99.1%				94%		96%		72.6%	43.2%
CD4/CD8	109				78		53		4.2	1.02
T P A	110				120		125		61	97
CA19-9	13				120		164		44	26

Tapaus II

Sukupuoli: nainen

Ikä: 38

Sairaus: Vasemman rinnan syövästä johtuva etäispesäke keuhkoissa.

Anamneesi: 11 vuoden ja 8 kuukauden kuluttua vasemmassa rinnassa esiintyvän syövän radikaalileikkauksen jälkeen molemmissa keuhkoissa todettiin suurenevia etäispesäkkeitä.

Seuraavana vuonna kummassakin keuhkossa todettiin nesteentumautumista keuhkopussiin.

Myöhemmin kummankin keuhkon alaosista löydettiin kasvainvarjostumia ja vesirintaisuutta.

Hoito:

- (1) Potilas saatettu sairaalahoitoon.
- (2) Potilaalle annettiin 31. vuorokauden kuluttua suonen sisäisesti 24 ml injektoitavaa tislattua vettä, joka sisälsi 1,25 % esimerkissä 2 saatua BRP-valmistetta.
- (3) BRP-valmisteen suonen sisäisen injektoinnin jälkeen potilaassa todettiin edullista paranemista, kuten keuhkon kaventunut varjostuma, parempi verenkuva 2 viikon kuluttua, normaaliksi muuttunut CD4/CD8 sekä heikentynyt kasvaintunnistin.

Tutkimustulokset:

	1. tutkimus- vuorokausi	16 vrk:tta myöhemmin	31 vrk:tta myöhemmin	47 vrk:tta myöhemmin
Punaiset verisolut	367 x 10 ⁴	378 x 10 ⁴	suonen sisäises- ti injektoitiin 24 ml tislattua vettä, joka sisälsi 1,25 % BRP-valmistetta	430 x 10 ⁴
Valkoiset verisolut	117 x 10 ²	69 x 10 ²		69 x 10 ²
CD4/CD8	1,15	0,99		1,2
CEA	2,0	1,9		0,9
IAP	338	390		283
CA 19-9	280	300		91
CA 125	410	310		290

Tapaus III

Sukupuoli: mies

Ikä: 47

Sairaus:

1. Yläkurkun syövästä johtuva etäispesäke keuhkoissa
2. oikeanpuoleinen syöpäinen keuhkopussintulehdus
3. etäispesäkkeitä oikeassa reidessä ja maksassa.

Tausta ja kliiniset löydökset sairaalaan tuotaessa:

Yläkurkun syöpä leikattiin, mitä seurasi radioaktiivinen hoito.

Kahden vuoden ja kahden kuukauden kuluttua potilaan yskösnäyte tutkittiin, ja oikeasta keuhkosta löydettiin onkalomainen varjostuma. Tämä osoitti syövän levinneen keuhkoon.

Kahdeksan kuukautta myöhemmin etäispesäke löydettiin oikeasta reidestä luun tuiketutkimuksella ja rinnan varjostuma oli laajentunut.

Kuukautta myöhemmin potilas sai yskän ja kärsi ysköksistä sekä oikeasta rinnasta oikeaan olkapäähän ulottuvista kivuista.

Rinnan röntgenkuva paljasti hajallisen varjostuman oikeassa keuhkossa ja oikean rinnan röntgenkuvassa näkyi luuhajoama, jonka halkaisija on 2 cm.

Hoito:

- (1) Potilas saatettu sairaalahoitoon.
- (2) 12 vuorokautta ensimmäisen tutkimuksen jälkeen potilaalle annettiin suonen sisäisesti injektoimalla 24 ml injektoitavaa tislattua vettä, joka sisälsi 1,25 % esimerkissä 2 saatua BRP-valmistetta.
- (3) 62 vuorokautta ensimmäisen tutkimuksen jälkeen potilaan vatsaonteloon injektoitiin 24 ml injektoitavaa tislattua vettä, joka sisälsi 1,25 % esimerkin 2 mukaisesti saatua BRP-tuotetta.
- (4) 33 vuorokautta ensimmäisen tutkimuksen jälkeen rintakipu alkoi vähitellen lieventyä ja hengittäminen helpottui. Nämä vaivat katosivat 117 vuorokauden kuluessa.

Tutkimustulokset

	1. tutkimus- vrk.	12 vrk. myöhemmin	33 vrk. myöhemmin	62 vrk. myöhemmin	62 vrk. myöhemmin	105 vrk. myöhemmin
CD4/CD8	0.55	Laskimon- sisäisesti injektoidaan 24 ml tislattua vettä, joka sisältää 1,25 % BRP-val- mistetta	0.66	Vatsaonte- loon in- jektoidaan 24 ml tislattua vettä, joka si- sisältää 1,25 % BRP-val- mistetta	0.73	0.82
C E A	1.2		1.2		0.9	0.9
α -FP	3.0		2.7		2.6	2.6
Vesirintai- suus tutkitaan			Luokka III		Luokka II	Luokka I

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä Cohnin V:n fraktion käsittävän koostumuksen valmistamiseksi, jossa menetelmässä syöpäpotilaan, jonka tila on kohentunut immuunitarkkailuhoidon seurauksena, vatsaontelosta otetaan talteen vesivatsanestettä, **tunnettu** siitä, että mainitusta talteenotetusta vesivatsanesteestä saatu supernatanttineste fraktioidaan Cohnin fraktioinnilla Cohnin V:n fraktion eristämiseksi supernatanttinesteestä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitusta talteenotetusta vesivatsanesteestä saatu supernatanttineste sentrifugoidaan solujätteen poistamiseksi ennen Cohnin fraktiointia.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en komposition innefattande Cohn's V fraktion, i vilket förfarande askites uppsamlas från bukhålan av en cancerpatient, vars tillstånd förbättrats till följd av immunövervakningsterapi, **kännetecknat** av att supernatantvätska erhållen från nämnda uppsamlade askites fraktioneras medelst Cohn's fraktionering för isolering av Cohn's V fraktion från supernatantvätskan.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att supernatantvätskan erhållen från nämnda uppsamlade askites centrifugeras för avlägsnande av cellrester före Cohn's fraktionering.

FIG. 1A

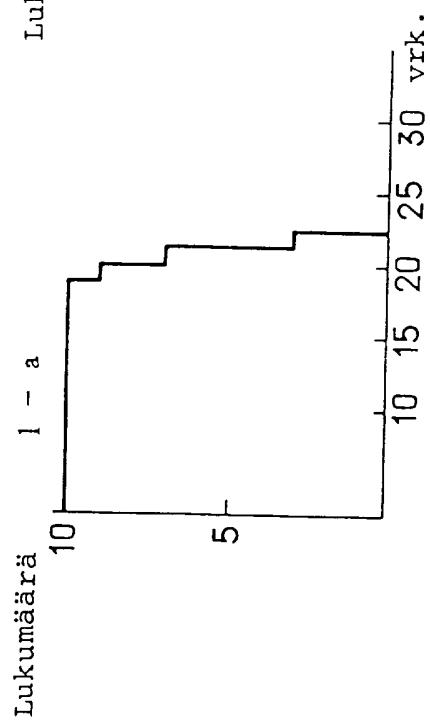


FIG. 1B

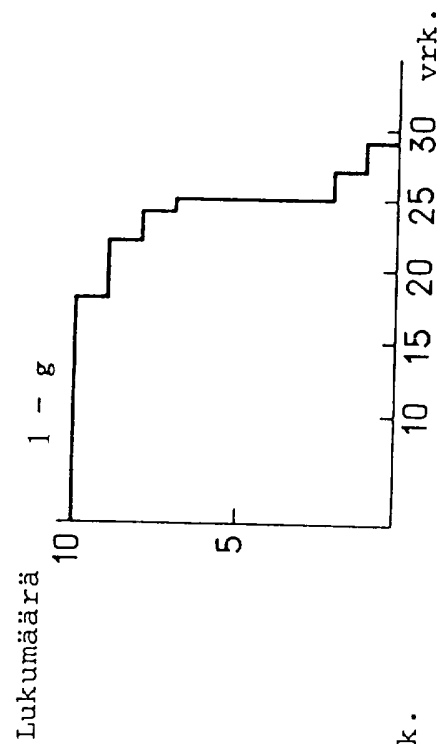


FIG. 1C

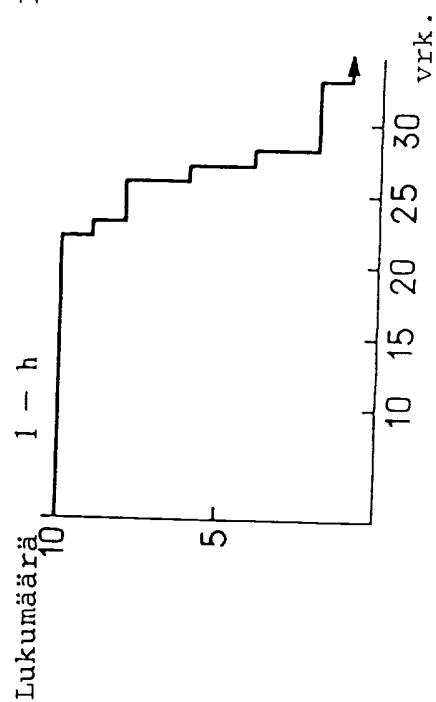


FIG. 1D

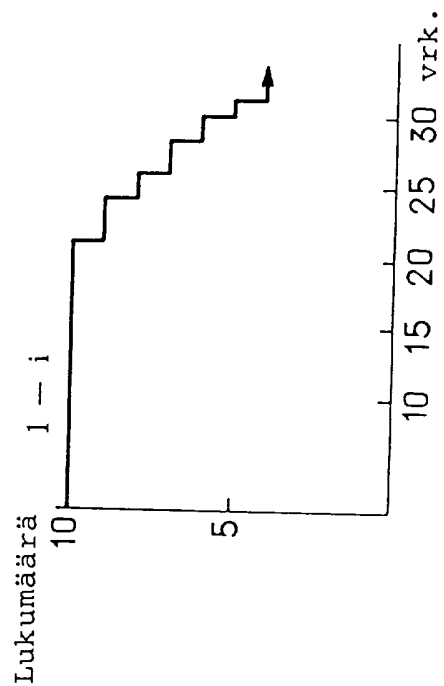


FIG. 2A

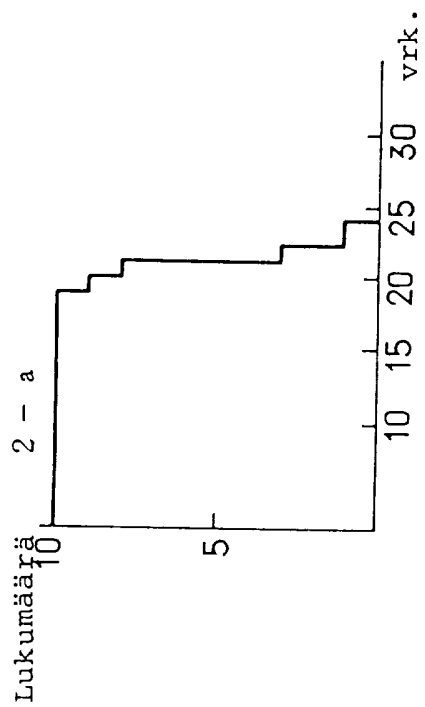


FIG. 2B

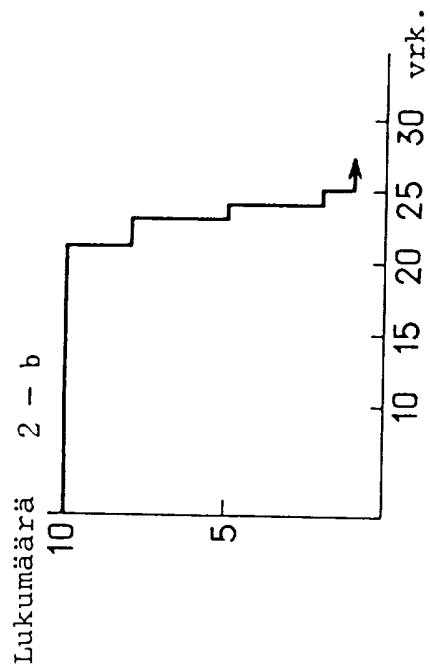


FIG. 2C

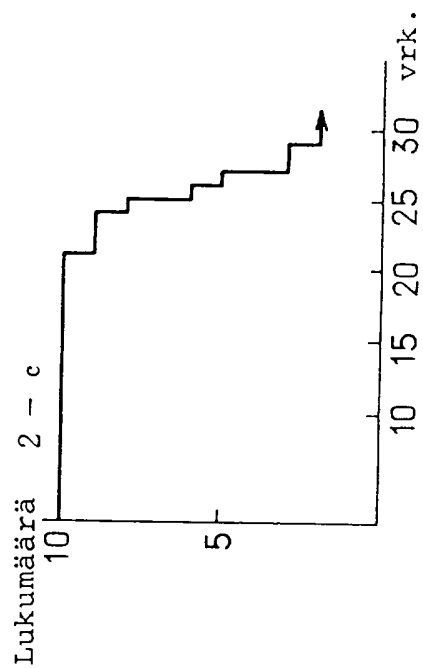


FIG. 2D

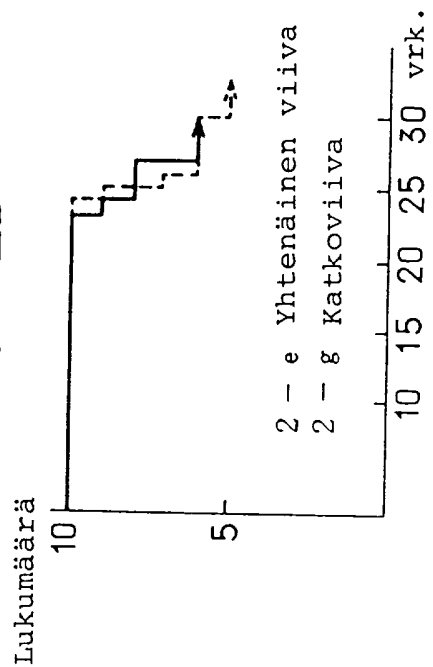


FIG. 3A

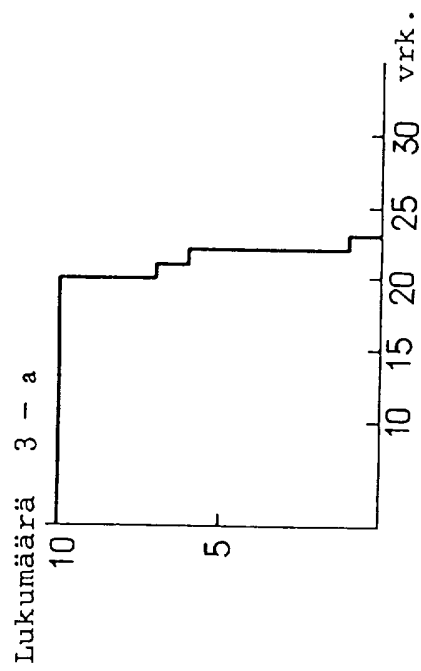


FIG. 3B

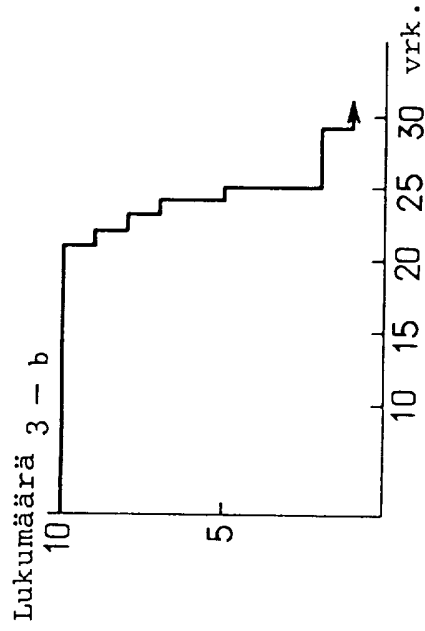


FIG. 3C

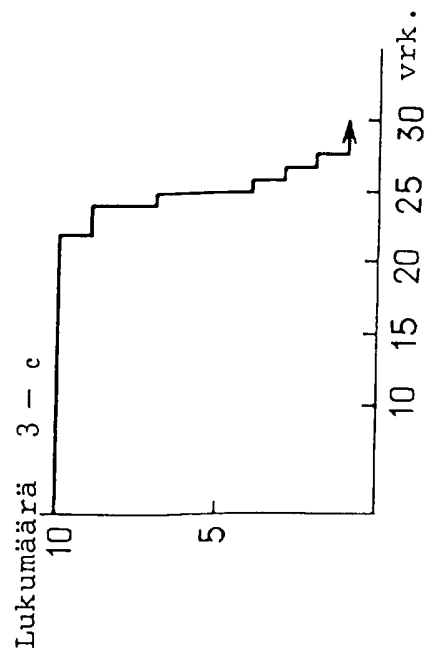


FIG. 3D

