



F1000097304B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****97304****C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 11 1996**

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12Q 1/00, G 01N 33/68, 33/577

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning

945391

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

16.11.94

(24) Alkuperäpäivä - Löpdag

16.11.94

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

17.05.96(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad**15.08.96**

(71) Hakija - Sökande

1. **Locus Genex Oy**, Verkkoosaarekatu 4, 00580 Helsinki, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Härkönen, Matti**, Harjuviita 14 C 24, 02100 Espoo, (FI)(74) Asiamies - Ombud: **Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä mahasyövän riskin seulonnaksi
Förfarande för screening av magkancerrisk**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

1. Cancer, vol. 59, 1987, pp 952-958,
2. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1991, 26 (Suppl. 186), pp 109-116,
3. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1991, 26 (suppl. 186), pp 117-123,
4. Chemical Abstracts, vol. 119, 1993, 6252f,
5. Tiivistelmä julkaisusta Jpn J Cancer Res (Japan), 84 (8), pp 844-51, August 1993,
6. Tiivistelmä julkaisusta Ital J Gastroenterol (Italy), 23 (4), pp 194-6, May 1991,
7. Tiivistelmä julkaisusta Dig Dis Sci (USA), 29 (9), pp 785-9, September 1984,
8. Tiivistelmä julkaisusta Clin. Chem., vol. 31, 1985, nro 1, pp 76-82,
9. Chemical Abstracts, vol. 108, 1988, 69407d,
10. Chemical Abstracts, vol. 109, 1988, 106842k,
11. Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, 171607q,
12. Chemical Abstracts, vol. 106, 1987, 151936t

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmä mahasyöpäriskin seulomiseksi käyttäen seerumin pepsinogeeni I:n, gastriini-17:n ja tukena helicobacter pylori -vasta-aineiden määrittämistä veriseerumista yhdistelmänä osoittamaan joko korpus-alueen atrofiaa, antrum-alueen atrofiaa tai koko mahan limakalvon atrofiaa sekä sen aiheuttajana olevaa helicobacter pylori -infektiota, jolloin mahasyövän riski voidaan arvioida ja tarvittava gastroskopiointi ja seuranta suunnitella.

Förfarande för screning av magkancer genom bestämning i kombination av serumets pepsinogen I, gastrin-17 och som stöd *Helicobacter pylori* antikroppar från blodserum för påvisning av antingen atrofi i korpus-område, atrofi i antrum-området eller atrofi i hela magens slemhinna och dess förorsakare *Helicobacter pylori* -infektion, varvid risken för magkancer kan utvärderas och nödvändig gastroskopering och uppföljning planeras.

Menetelmä mahasyövän riskin seulonnaksi

Tausta

Seuraavassa esitetään taustaa menetelmille mahasyövän riskin seulonnaksi käyttäen ensisijaisesti pepsinogeeni I:n ja gastriini-17:n määrittämistä verinäytteestä.

Vaikka uusien mahasyöpätapauksien esiintyminen onkin vähentynyt viime vuosina, on mahasyöpä edelleen yksi tavallisimmista maligniteeteista. Suomessa uusia syöpätapauksia rekisteröidään n. 250-300 tapausta / milj. henkilöä / vuosi. Yli 50-vuotiaiden ikäryhmässä Suomessa on arviolta 2350 mahalaukun syöpätapausta, joka on noin 3 promillea ikäryhmän väestöstä (Finnish Cancer Registry - The Institute for Statistical and Epidemiological Cancer Research 1993). Suomen lisäksi Islannissa, Etelä-Amerikassa ja erityisesti Japanissa on korkea mahasyöpäinsidenssi.

Mahasyövän prognoosi on yleensä huono, koska spesifistä hoitoa ei ole. Tällä hetkellä ainoa mahdollisuus hoitaa mahasyöpä menestyksellisesti on sen varhaistoteaminen ja totaali poistaminen kirurgisin toimenpitein.

Mahasyöpä ei varhaisvaiheessa anna välttämättä mitään oireita. Oireiden myöhäinen esiintyminen luonnollisesti viivästyttää potilaan hoitoon hakeutumista. Toisaalta mahasyövän varhaisvaiheessa kliiniset löydökset ovat usein epäspesifisiä. Mahasyövän primaari diagnostinen menetelmä tällä hetkellä on gastroskopia ja siihen liittyvät biopsiat, irtosolu- ja aspiraatio-sytologia. Koska rutiinigastroskopiat suoritetaan oireiden, kuten ylävatsavaivojen tai maha-suolikanavan verenvuotojen selvittämiseksi, on näin löydetty oireinen mahasyöpä yleensä jo pitkälle edennyt ja siten inoperaabeli. Primaaridiagnostiikkaa on yritetty parantaa myös monin immunologisin menetelmin. Kuitenkaan ei ole onnistuttu kehittämään riittävän spesifistä immunologista mahasyöpämarkkeria.

Keskeistä on löytää keinot, joilla voitaisiin helposti ja kohtuullisin kustannuksin tunnistaa yleis-

väestöstä ne oireettomat henkilöt, joilla saattaa olla alkuvaiheen mahasyöpä. Nämä henkilöt tulisi heti tunnistuksen jälkeen tutkia gastroskopiolla. Samalla voidaan tunnistaa ne henkilöt, joiden mahassa on seurantaa vaativia premaligneja muutoksia.

Mahasyöpää voi edeltää joukko erilaisia mahasairauksia tai tiloja (ns. precancerous conditions), joita ovat krooninen atrofinen gastriitti, pernisiöösi anemia, ventrikkeliulcus, polyypimaha sekä Ménétrier'n tauti (giant hypertrophic gastritis). Selkeästi tunnistettavia limakalvon muutoksia ovat dysplasia ja adenooma. Edellä mainittuihin tautitiloihin liittyy keskimäärin noin 4-5-kertainen suhteellinen syöpäriski verrattuna väestöön yleensä. Riskin on todettu välittyvän lähes kaikissa taudeissa kroonisen atrofisen gastriitin välityksellä.

Kroonisella gastriitilla tarkoitetaan mahan limakalvon pitkäaikaista tulehdustilaa. Tauti voidaan jakaa karkeasti ns. superficiellisiin ja atrofiseen muotoon. Superficiellissa gastriitissa tulehdus-solulintraatio keskittyy pintaepiteelin alle. Mikäli tulehdus etenee diffuusisti myös mahan spesifisten sekretoivien rauhasen väliin, puhutaan kroonisesta atrofisesta gastriitista. Tällöin mahalaukun limakalvon normaalit rauhasrakenteet korvautuvat ainakin osittain metaplastisilla muutoksilla.

Suomalaisesta syöpäaineistosta laskettu suhteellinen mahasyöpän riski mahan korpus-alueen atrofisesta gastriitista kärsivillä potilailla on arvioitu n. 4-5-kertaiseksi terveen limakalvon omaaviin henkilöihin verrattuna. Lisäksi tähän tilaan liittyy vaara saada intrinsic-factorin puutoksesta ja B12-vitamiinin imeytymishäiriöstä johtuva pernisiöösi anemia. Antrumien alueen vaikeassa atrofiassa riski on peräti 18-kertainen. Jos atrofisia muutoksia esiintyy sekä antrumien että korpuksen alueella (pangastriitti), voi riski kohota jopa 80-90 prosenttiin (Sipponen, Kekki, Haapakoski, Ihamäki & Siurala 1985).

Mahasyöpän esiasteiden seulonta seerumista tehtävillä pepsinogeeni- ja gastriini-17 -määrityksillä

Mahan pepsinogeenit

Ihmisen mahan limakalvossa voidaan erottaa elektroforeettisesti 7 erilaista pepsinogeenia (Samloff 1969). Näistä viisi nopeinta muodostaa immunologisesti yhtenäisen pepsinogeeni I -ryhmän. Muut kaksi muodostavat pepsinogeeni II -ryhmän. Ryhmän I pepsinogeenieja syntetisoidaan ainoastaan mahan korpus-alueen rauhasen pääsoluissa ja limaa erittävissä soluissa. Sen sijaan ryhmän II pepsinogeenieja muodostuu koko mahalaukun alueella sijaitsevissa rauha-

sissa sekä jossain määrin myös duodenumin yläosan Brunnerin rauhasissa (Samloff & Liebman 1973; Weinstein, Lechago, Samloff et al 1977). Terveen ihmisen seerumissa pepsinogeeni I -pitoisuus on n. 6-kertainen verrattuna pepsinogeeni II -pitoisuuteen (Samloff 1982). Mahan korpus-osan atrofisessa gastriitissa seerumin pepsinogeeni I -pitoisuus laskee, kun taas seerumin pepsinogeeni II -pitoisuus säilyy entisellä tasolla. Näin ollen seerumin pepsinogeeni I -pitoisuus kuvastaa melko selvästi mahan korpus-osan pepsinogeenia erittävien solujen määrää ja niiden tilaa. Mitä vaikeampi atrofinen gastriitti mahan korpus-osassa on, sitä matalampi on seerumin pepsinogeeni I -pitoisuus (Tamm, Villako, Härkönen & Karonen 1984; Kekki, Samloff, Varis & Ihamäki 1991). Matala seerumin pepsinogeeni I -pitoisuus ilmaisee vaikean atrofisen korpusgastriitin yli 90 %:n sensitiivisyydellä ja lähes 100 %:n spesifisyydellä (Varis, Kekki Härkönen, Sipponen & Samloff 1991).

Suomalaisessa tutkimuksessa (Varis, Sipponen, Laxén, Härkönen & Heinonen, vielä julkaissut työ), jossa seulottiin yli 50-vuotiaita oireettomia tupakoivia miehiä matalan seerumin pepsinogeeni I -pitoisuuden avulla gastroskopiastutkimusta varten, todettiin gastroskopoitujen keskuudessa 4.7 %:lla (5.8 %:lla atrofista gastriittia sairastavista potilaista) neoplastinen muutos ja 1 %:lla oireeton alkuvaiheen syöpä (taulukko 1 ja taulukko 2). Tämän tutkimuksen perusteella matalan seerumin pepsinogeeni I -määrityksen avulla voitiin tunnistaa joukko välitöntä operaatiota vaativia mahasyöpätapauksia ja myöhempää gastroskopiaseurantaa vaativia syövän esiastetapauksia (dysplasia). Samalla voitiin määrittellä se väestöryhmä, jolla on vaara saada pernisiösi anemia ja jonka veriarvoja tulee tästä syystä jatkossa seurata.

Epidemiologiset tutkimukset osoittavat, että vain n. 25 %:lla mahasyöpäpotilaista on vaikea atrofinen korpusgastriitti, joka on todettavissa matalasta seerumin pepsinogeeni I -tasosta (Sipponen, Kekki, Haapakoski, Ihamäki & Siurala 1985). Mahasyövästä siis n. 75 % ei liity atrofiseen korpusgastriittiin.

Taulukko 1: Mahasyövän seulontatutkimuksen tulos suomalaisilla tupakoivilla yli 50-vuotiailla miehillä seerumin matalan pepsinogeeni I (S-PG I) -tason perusteella.

Seulontatulokset	Lukumäärä	% edellisestä	% gastroskopoituista
Tutkittujen lukumäärä	22431		
Matala S-PG I	2215	9.9	
Gastroskopoitiin	1347	60.8	
Atrofisen korpusgastriitti	1092	81.1	
Karsinooma	63	5.8	4.7

Taulukko 2. Mahalaukun limakalvon neoplastiset (kasvaimenomaiset) muutokset seerumin pepsinogeeni I määrityksen perusteella Suomessa tutkituilla yli 50-vuotiailla miehillä (ks. taulukko 1).

Neoplasiatyyppe	Lukumäärä
Kohtalainen dysplasia (epänormaali kasvu)	42
Vaikea dysplasia	7
Karsinooma	11 (alkava 70 %)
Karsinoidituumori	3
Kokonaismäärä	63

Antrum-alueen gastriini

Gastriinia erittyy maha-suolikanavasta ainakin kolmessa eri muodossa, joiden yhteinen ns. immunoreaktiivinen aktiviteetti mitataan määritettäessä seerumin gastriiniarvo (seerumin totaali gastriini). Gastriinin alalajeja ovat ns. minigastriini (G-14), pikkugastriini (G-17) ja isogastriini (G-34) (Gregory 1974). Fysiologisesti tärkeimmät ovat G-17 ja G-34. G-17:n vaikutus suolahapon eritykseen on 6 kertaa suurempi kuin G-34:n vaikutus (Walsh, Isenberg, Ansfield & Maxwell 1976). Gastriinia erittyy ns. G-soluista, joita tavataan sekä antrumissa että duodenumissa. Gastriinin erityksen tärkeimmät kiihdyttäjät ovat vagus-hermon tonus ja proteiinien hajoamistuotteet. Gastriinin eritystä jarruttaa pH:n lasku alle 2.5 (Walsh, Richardson & Fordtran 1975). Antrumista erittyvä gastriini on yli 90-prosenttisesti G-17-tyyppiä, kun taas duodenaalinen gastriini on pääosin G-34-tyyppiä (Berson & Yalow 1971). Paastotilanteessa seerumissa tavataan etupäässä G-34:ä, kun taas aterian jälkeen seerumin gastriini on G-17-tyyppiä (Lamers, Harrison, Ippoliti & Walsh 1979). Gastriini-17:n eritystä voidaan tutkia myös ns. proteiinistimulaatiokokeella. Siinä otetaan aamulla paastoverinäyte, jonka jälkeen potilas nauttii proteiinipitoisen standardiaterian ja verinäytteet otetaan 15 min välein kahden tunnin ajan. Maksimisuus havaitaan n. 20 min kuluttua.

Atrofisessa antrumgastriitissa antrumien limakalvo atrofioituu ja näin ollen sen gastriini-17:n erityks vähenee ja pitoisuus seerumissa on pienentynyt. Alentunut G-17 -seerumitaso osoittaisi siten antrumien atrofian ja tämän alueen lisääntyneen syöpäriskin. Atrofioituneessa antrumien limakalvossa on alentunut vaste myös proteiinistimulaatiokokeessa, joka on ilmeisesti herkempi atrofian osoittaja kuin pelkkä pitoisuusmääritys.

Mahalaukun helicobacter pylori infektio

Helicobacter pylori on spiraalinmuotoinen, gram-negatiivinen bakteeri, joka viihtyy mahan limakalvon pintaepiteelisolujen välittömässä läheisyydessä limassa ja solujenvälisessä liitoskohdassa. Bakteeri siirtyy ilmeisesti peroraalista tietä ihmisestä toiseen. Bakteerin vaikutus mahan limakalvoon on tulehdusreaktio, joka välittyy komplementin kautta vapauttamalla voimakkaita tulehduksen välittäjäaineita. Akuutin vaiheen jälkeen tulehdus muuttuu krooniseksi gastriitiksi. Kroonista gastriittia sairastavilla potilailla todetaan 70-90-prosenttisesti *helicobacter pylori* -infektio (Calam 1994). Koska *helicobacter pylori* -infektio ja mahalaukun krooninen gastriitti liittyvät hyvin läheisesti toisiinsa, on ajateltu, että tämä bakteeri-infektio olisi eräs etiologinen tekijä mahalaukun syövän synnylle. Tämän vuoksi on mahdollista, että *helicobacter pylori* -bakteerien hävittäminen tulehduksen alkuvaiheessa voisi estää krooniseen gastriittiin liittyvän atrofian synnyn ja siten vähentää syöpäriskiä.

Mahasyövän riskin seulonta käyttäen kombinoitua pepsinogeeni I - gastriini-17 - helicobacter pylori -vasta-ainemääritystä seerumista

Seulontaan voidaan käyttää sopivimmin menetelmää, jossa kuoppalevyllä samanaikaisesti voidaan määrittää seerumin pepsinogeeni I ja gastriini-17-pitoisuus sekä *helicobacter pylori* -vasta-aineet. Tällöin on mahdollista diagnosoida joko korpusgastriitti, antrumgastriitti tai pangastriitti sekä atrofian eräs aiheuttaja, *helicobacter pylori* -infektio. On huomattava, että vaikeassa atrofisessa gastriitissa *helicobacter pylori* -bakteereita ei enää löydy mahalaukun limakalvolta ja myös vasta-aineet seerumissa ovat normalisoituneet.

Pepsinogeeni I -määritystä varten on ihmisen mahalaukun limakalvolta eristetty pepsinogeeni I -antigeeni. Se on kiinnitetty karboanhydridimenetelmällä kanin ja lampaan punasoluihin ja tällä on immunisoitu klassiseen tapaan kanit ja lampaat tuottamaan vasta-ainetta pepsinogeeni I:tä kohtaan. Spesifinen vasta-aine gastriini-17:ää kohtaan on tuotettu samalla tekniikalla kiinnittämällä gastriini-17:stä saatu gastriinifragmentti 1-13 kanin autologisiin punasoluihin karboimiditekniikalla ja immunisoimalla normaaliin tapaan kanit tuottamaan spesifistä vasta-ainetta gastriini-17:ää kohtaan. Spesifiset vasta-aineet on puhdistettu proteiini-A-affiniteetikromatografialla tai joissakin tapauksissa pepsinogeeni I- tai gastriini-17-affiniteetikromatografialla. Puhdistettu IgG-fraktio on leimattu entsyymillä (peroksidaasi tai alkalinen fosfataasi). Kuoppalevyn kuopat on päällystetty leimatulla antiseerumilla käyttäen passiivista adsorptiota. Seuraavassa yksityiskohtaisempi kuvaus eräästä sopivimmin käytettävästä menetelmästä.

1. Kuopat päällystetään vasta-aineella inkuboimalla yli yön +4°C:sa.
2. Kuopat tyhjennetään ja pestään pesuliuksella.

3. Lisätään näyte sopivana laimennoksena, inkuboidaan maksimaalisesti 1 h +37°C:ssa.
4. Pestään kuopat.
5. Lisätään entsyymileimattu vasta-aine sopivana laimennoksena, inkuboidaan maksimaalisesti 1 h +37°C:ssa.
6. Pestään kuopat.
7. Lisätään substraatti (kromogeeninen, fluoresoiva tai luminoiva substraatti), ja inkuboidaan maksimaalisesti 30 min huoneenlämmössä.
8. Pysäytetään reaktio ja luetaan absorbanssi, fluoresenssi tai luminisenssi, ja verrataan sitä kalibraatiokäyrään.

Menetelmää voidaan nopeuttaa inkuboimalla näyte ja entsyymileimattu vasta-aine yhtäaikaan ns. one-step-Elisa-menetelmänä. On myös muita vaihtoehtoja, joita voidaan soveltaa.

Vaihtoehto 2 (kilpailu-Elisa)

1. Leimataan antigeeni entsyymileimalla.
2. Inkuboidaan näytettä ja vasta-ainetta koeputkessa, jolloin näytteen antigeeni sitoutuu vasta-aineeseen.
3. Lisätään tunnettu määrä leimattua antigeenia, joka kilpailee näytteen sisältämän antigeenin kanssa vapaasta vasta-aineesta.
4. Siirretään liuos kuoppalevyn kuoppaan, joka on päällystetty kakkos-vasta-aineella (anti-kani-vasta-aine) ja inkuboidaan maksimaalisesti 1 h.
5. Pestään sitoutumaton materiaali pois.
6. Lisätään substraatti ja inkuboidaan maksimaalisesti 30 min huoneenlämmössä.
7. Pysäytetään reaktio ja luetaan tulokset vertaamalla kalibratiokäyrään.

Tässä menetelmässä voidaan kilpailutilanne järjestää myöskin leimatulla vasta-aineella.

Helicobacter pylori -vasta-aineiden määrittämistä varten on saatavana useita kaupallisia "kittejä" (mm. Orion Pyloriset EIA-G, Pyloriset EIA-A, Rochen EIA 2G, Whittaker Bioproductsin Pyloristat). *Helicobacter pylori* -bakteereista voidaan valmistaa antigeeneja eri tavoin (katso Lelwala-Guruge, Nilsson, Ljungh, Wadström 1992) ja niitä on myös kaupallisesti saatavana. Käyttämämme menetelmä *Helicobacter pylori* -vasta-aineiden määrittämiseen on yleisesti tunnettu ja siinä kiinnitetään bakteereista happamalla glysiinillä uutettu antigeeni adsorptiolla kuoppalevyn kuoppiin. Kakkosvasta-aine (rabbit anti-human IgG) on leimattu entsyymillä (alkalinen fosfataasi tai joissakin tapauksissa peroksidaasi). Entsyymin substraattina käytetään p-nitrofenyylifosfaattia (absorbanssi) tai umbelliferyylifosfaattia (fluoresenssi), jolloin voidaan mitata absorbanssi (405 nm) tai fluoresenssi (360 nm/460 nm).

Mittausherkkydet

Seerumin pepsinogeeni I -määrityksessä cut-off-arvo atrofiselle gastriitille on aikaisempien tutkimustemme mukaan 20 - 30 µg/l sovitusta menetelmän spesifisyydestä ja herkkyudesta riippuen, joka vastaa noin 450 - 690 pmol/l (Varis, Sipponen Laxén, Härkönen & Heinonen, vielä julkaisematon työ). Normaalitilanteessa seerumin gastriini-17:n pitoisuudet ovat välillä 2 - 25 pmol/l. Näin ollen gastriini-17:n pitoisuus seerumissa on noin 100 kertaa pienempi kuin pepsinogeeni I:n pitoisuus. Koska atrofisessa antrumgastriitissa mitataan tästäkin matalampia arvoja edellyttää tämä kehitetyltä menetelmältä erittäin suurta herkkyyttä. Antrum-alueen atrofiassa cut-off-arvo on seerumin gastriini-17 -määrityksessä välillä 0.1 - 2 pmol/l. Riittävän suuri herkkyys on mahdollista saavuttaa entsyymileimalla ja käyttämällä herkkää detektointijärjestelmää esim. luminisenssimittausta. Herkkyyttä voidaan edelleen lisätä suorittamalla ns. entsyymaattinen recycling reaktio, jota olemme soveltaneet mm. steroidien määrittämisessä (Härkönen, Adlercreutz & Groman 1974). Tässäkin tapauksessa syntynyt produkti voidaan mitata joko fluoresenssitekniikalla tai luminisenssillä. *Helicobacter pylori* -positiivisuudelle cut-off-tiitteri on 200 - 500.

Taulukossa 3 on patentoitava yhdistelmämenetelmä kuvattu kaavamaisesti.

Taulukko 3 Seerumin pepsinogeeni I ja gastriini-17 -yhdistelmämenetelmä mahalaukun vaikeasteisen korpus-alueen, antrum-alueen tai koko mahalaukun limakalvon (pangastriitti) atrofisen gastriitin toteamiseksi.

Vaikea-asteisen atrofian sijainti mahalaukussa	Seerumin pepsinogeeni I µg/l	Seerumin gastriini-17 pmol/l	Seerumin gastriini-17 pitoisuuden nousu (vaste) proteiinistimulaatiossa
Korpus	< cut-off-arvo	> viitearvojen yläraja	normaali tai suurentunut vaste
Antrum	> cut-off-arvo	< cut-off-arvo	voimakkaasti pienentynyt vaste
Koko mahalaukun limakalvo (korpus ja antrum)	< cut-off-arvo	viitearvojen alarajalla	pienentynyt vaste
Viitearvot:	Seerumin pepsinogeeni I Seerumin gastriini-17		25 - 120 µg/l 2 - 25 pmol/l
Cut-off-arvot:	Seerumin pepsinogeeni I Seerumin gastriini-17		20 - 30 µg/l 0.1 - 2 pmol/l

Kirjallisuus

Berson SA & Yalow, RS (1971) Nature of immunoreactive gastrin extracted from tissues of gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 60:215-222

Calam, J (1994) *Helicobacter pylori* (Review) *Eur. J Clin Invest* 24: 501-510

Gregory, RA (1974) The gastrointestinal hormones: a review of recent advances. *J Physiol.* 241: 1-32

The Finnish Cancer Registry - The Institute for Statistical and Epidemiological Cancer Research (1993) *Cancer Incidence in Finland 1991. Cancer Statistics of the National Research and Development Centre for Welfare and Health*

Härkönen, M, Adlercreutz, H & Groman, EV (1974) Enzymatic techniques in steroid assay. *J. Steroid Biochem.* 5: 717-725

Kekki, M, Samloff, IM, Varis, K & Ihamäki, T (1991) Serum pepsinogen I and serum gastrin in the screening of severe atrophic corpus gastritis. *Scand J Gastroenterology* 26 (suppl 186):109-116

Lamers, C, Harrison, A, Ippoliti, A & Walsh, J (1979) Molecular forms of circulating gastrin in normal subjects and duodenal ulcer patients. *Gastroenterology* 76: 1179

Lelwala-Guruge, J, Nilsson, I, Ljungh, Å & Wadström, T (1992) Cell surface proteins of *Helicobacter pylori* as antigens in an ELISA and a comparison with three commercial ELISA. *Scand J Infect Dis* 24: 457-465

Samloff, IM & Liebman, WM (1972) Purification and immunochemical characterization of group II pepsinogens in human seminal fluid. *Clin Exp Immunol* 11:405-414

Samloff, IM (1969) Slow moving protease and the seven pepsinogens. Electrophoretic demonstration of the existence of eight proteolytic fractions in human gastric mucosa. *Gastroenterology* 57:659-69

Samloff, IM (1982) Pepsinogens I and II: purification from gastric mucosa and radioimmunoassay in serum. *Gastroenterology* 82:26-33

Sipponen, P, Kekki, M, Haapakoski, J, Ihamäki, T & Siurala, M (1985) Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *Int J Cancer* 35:173-77

Tamm, A, Villako, H, Härkönen, M & Karonen, S-L (1984) Serum pepsinogen I and the state of gastric mucosa in an Estonian population sample. *Scand. J. Gastroenterol.* 19: 1091-1094.

Varis, K (1993) Mahan eritystoiminta. Kirjassa: Kliininen gastroenterologia (toim. Miettinen, T, Seppälä, K & Sivula, A). Duodecim, Jyväskylä ss. 55-69

Varis, K, Kekki, M, Härkönen, M, Sipponen, P & Samloff, IM (1991) Serum pepsinogen I and serum gastrin in the screening of atrophic pangastritis with high risk of gastric cancer. Scand J Gastroenterology 26 (suppl 186): 117-123

Varis, K, Sipponen, P, Laxén, F, Härkönen, M & Heinonen O-P, julkaisematon työ.
Walsh, JH, Isenberg JI, Ansfield, J & Maxwell, V (1976) Clearance and acid-stimulating action of human big and little gastrins in duodenal ulcer subjects. J Clin Invest 57: 1125-1131

Walsh, JH, Richardson, CT & Fordtran, JS (1975) pH dependence of acid secretion and gastrin release in normal and ulcer subjects. J Clin Invest 55: 462-468

Weinstein, WM, Lechago, J, Samloff, IM et al. (1977) Pepsinogens in human gastric cardiac and esophageal glands (abstr). Clin Res 25:690

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä mahalaukun syövän riskin seulomiseksi veriseerumista toteamalla
5 mahalaukun korpus- tai antrum-osan atrofia tai koko mahan limakalvon atrofia, **tunnettu siitä, että seerumista määritetään kvantitatiivisesti pepsinogeeni I ja gastriini-17 -pitoisuudet ja verrataan saatuja arvoja kulloisenkin määriteltävän aineen menetelmäspesifiseen cut-off-arvoon.**
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että lisäksi mitataan seerumin gastriini-17 -pitoisuus käyttämällä proteiinistimulaatiokoetta mittaamalla sanottu pitoisuus basaalitilanteessa ja proteiinipitoisen standardiaterian jälkeen.**
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 ja 2 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että käytetään kombinoitua immunologista pepsinogeeni I- ja gastriini- 17 -menetelmää muovi-, lasi- tai selluloosa-alustalla.**
- 20 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että alusta on kuoppalevy.**
- 25 5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että pepsinogeeni I- ja gastriini- 17 -määrittämiseen käytetään absorbanssi-, fluoresenssi- tai luminesenssidetektio-menetelmää.**
- 30 6. Jonkin patenttivaatimuksen 3 - 5 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että pepsinogeeni I -pitoisuuden määrittämiseksi käytetään polyklonaalista tai monoklonaalista vasta-ainetta pepsinogeeni I:tä vastaan.**
7. Jonkin patenttivaatimuksen 3-6 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että gastriini-17 -pitoisuuden määrittämiseksi käytetään spesifistä poly- tai monoklonaalista vasta-ainetta gastriini-17:ää vastaan.**

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polyklonaalinen vasta-aine gastriini- 17:ää vastaan saadaan immunisoimalla eläin, kuten kani, lammas tai sika, gastriinifragmentilla 1-13, tai käyttämällä jonkin eläimen, kuten sian, tai ihmisen mahalaukusta eristettyä gastriini-17:n antigeeniä.

5

9. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että se on yhdistetty *Helicobacter pylori* -vasta-ainemääritykseen.

Patentkrav

1. Förfarande för screening av magsäckskancer från blodserum genom detektering av atrofi i korpus- eller antrum-området eller atrofi i hela magens slemhinna,
5 **kännetecknat** därav, att pepsinogen I- och gastrin-17 -koncentrationerna bestäms kvantitativt och de erhållna värdena jämförs med det förfarandespecifiska cut-off-värdet för varje ämne som skall bestämmas.
2. Förfarande enligt kravet 1, **kännetecknat** därav, att dessutom bestäms gastrin-
10 17 -koncentrationen i serum genom användning av ett proteinstimulansprov genom mätning av den nämnda koncentrationen i basaltillståndet och efter ett proteinhaltigt standardmål.
3. Förfarande enligt kravet 1 eller 2, **kännetecknat** därav, att ett kombinerat immunologiskt pepsinogen I- och gastrin-17 -förfarande på plast-, glas- eller cellulosa-
15 saunderlag används.
4. Förfarande enligt kravet 3, **kännetecknat** därav, att underlaget är en gropskiva
- 20 5. Förfarande enligt något av kraven 1-4, **kännetecknat** därav, att vid bestämning av pepsinogen I och gastrin-17 används ett absorbans-, fluorescens- eller luminescensdetektionsförfarande.
6. Förfarande enligt något av kraven 3-5, **kännetecknat** därav, att för bestämning
25 av pepsinogen I -koncentrationen används polyklonala eller monoklonala antikroppar mot pepsinogen I.
7. Förfarande enligt något av kraven 3-6, **kännetecknat** därav, att för bestämning
30 av gastrin-17 -koncentrationen används en specifik poly- eller monoklonal antikropp mot gastrin-17.

8. Förfarande enligt kravet 7, **kännetecknat** därav, att den polyklonala antikroppen mot gastrin-17 erhålls genom immunisering av djur såsom kanin, får eller svin med gastrinfragment 1-13 eller genom användning av gastrin-17 -antigen som isolerats från människans magsäck.

5

9. Förfarande enligt något av de ovanstående kraven, **kännetecknat** därav, att det är kombinerat med en *Helicobacter pylori* -antikropp-bestämning .