

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningssskrift nr. 122457

Int. Cl. G 01 n 33/16 Kl. 42 1-3/54

Patentsøknad nr. 170.132 Inngitt 14.X 1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII. 1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 28.VI 1971

Prioritet begjært fra: 21.X-66 Sverige,
nr. 14397/66

Pharmacia AB,
Björkgatan 30, Uppsala, Sverige.

Oppfinnere: Rolf Erik Axel Verner Axén,
Simonsbo, Upplands Bälinge,
Jerker Olof Porath, Karlsrogatan 42,
Uppsala og Leif Edvin Wide, Champinjonvägen 14,
Uppsala, Sverige.

Fullmektig: Mag. scient. Knud-Henry Lund.

Fremgangsmåte for kvalitativ eller kvantitativ bestemmelse
av vitamin B₁₂ samt reagens til bruk ved utførelse av fremgangsmåten.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for kvalitativ eller kvantitativ bestemmelse av vitamin B₁₂ i vannholdige prøver, f.eks. fra kroppsvæsker som blodserum samt et hjelpemiddel hertil.

Fremgangsmåten er karakterisert ved at man bringer partikler av i vann uoppløselige polymere, hvortil det ved hjelp av kovalente bindinger er bundet et vitamin B₁₂ bindende stoff fortrinnsvis ventrikkelfaktor i berøring med prøven og med en viss mengde av vitamin B₁₂ merket med en radioaktiv isotop, fortrinnsvis av kobolt, hvorefter når reaksjonen mellom vitamin B₁₂ og det på partiklene festede vitamin B₁₂-bindende stoff har funnet sted, partiklene separeres fra prøvevæsken og radioaktiviteten bestemmes i

partikkelmaterialet og/eller i væsken.

Metoden kan utnyttets for såvel kvalitativ som kvantitativ bestemmelse.

Med vitamin B_{12} -bindende stoff forstås her et stoff inneholdende protein eller polypeptid eller eventuelt kullhydrat med spesifikk evne til å binde vitamin B_{12} . Et velkjent eksempel på slikt stoff er ventrikkelfaktor, et mucoprotein fra maveslimhinnen. Et annet eksempel er en vitamin B_{12} -bindende proteinfraksjon fra blodplasma.

Oppfinnelsen er basert på at det finnes stoffer, eksempelvis ventrikkelfaktor, som spesifikt binder vitamin B_{12} og at denne binding skjer uansett om vitamin B_{12} er merket med en radioaktiv isotop eller ikke. Bindingen av merket og ~~umerket~~ vitamin B_{12} til det vitamin B_{12} -bindende stoffet, f.eks. ventrikkelfaktor, skjer i forhold til konsentrasjonen av merket resp. umerket vitamin B_{12} .

Den store fordelen med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er at det vitamin B_{12} -bindende stoffet ikke er i oppløsning, men er meget fast bundet til en uoppløselig bærer, og at således det merkede vitamin B_{12} , som ved bestemmelsen reagerer med og bindes til det vitamin B_{12} -bindende stoffet, lett kan separeres fra det ikke bundne merkede vitamin B_{12} , f.eks. ved enkel sentrifugering, eller filtrering. Forsøket er lett å utføre da kjente mengder av partikler med derpå festet vitamin B_{12} -bindende stoff på forhånd kan porsjoneres i f.eks. reagensglass og kan oppbevares uten at bindingsevnen går tapt. Hele prosedyren, inklusive separeringen av fritt merket vitamin B_{12} og bundet merket vitamin B_{12} kan utføres i ett og samme reagensglass uten noen ytterligere tilsetning av feltningsmidler eller lignende.

Merkningen av vitamin B_{12} med en radioaktiv isotop kan foregå på konvensjonell måte, idet en for formålet egnet isotop velges. Spesielt hensiktsmessig er det å velge en radioaktiv isotop av kobolt. Vitamin B_{12} merket med en radioaktiv isotop av kobolt finnes kommersielt tilgjengelig og mange sykehuslaboratorier har nå utrustning for å kunne måle denne isotop.

Som bærer av det vitamin B_{12} -bindende stoff anvendes partikler av i vann uoppløselige polymere. Polymeren velges således at den inneholder eller kan utstyres med egnede reaktive grupper, f.eks. aminogrupeer, hydroksylgrupper og karboksylgrupper, for lett

å muliggjøre en binding av det vitamin B_{12} -bindende stoff, f.eks. ventrikkelfaktor, til den polymere ved broer av bindinger av kovalent karakter.

Spesielt egnet er det å velge polymerpartikler bestående av et tredimensjonalt nettverk, sammenholdt av kovalente bindinger. Slike partikler er, selv om de er svellbare i vann, helt uoppløselige og kan derved ikke slippe ifra seg noe av polymermaterialet eller derpå kovalent bundet stoff, f.eks. ved vaskingsprosedyrer. Eksempler på slike polymerpartikler er korn av polymerisat dannet ved tverrbinding av stoffer inneholdende et flertall hydroksylgrupper som kullhydrater og sukkeralkoholer, f.eks. dextran, stivelse, dextriner og andre polysakkarider, samt polyvinylalkohol med et bifunksjonelt stoff, f.eks. bifunksjonelle stoffer av typen $X - R - Z$, der eksempelvis X og Z er halogen eller epoksygrupper og R er resten av det bifunksjonelle stoff, f.eks. et alifatisk radikal inneholdende 3 til 10 karbonatomer.

For formålet kan det eksempelvis anvendes korn av det kommersielt tilgjengelige produktet "Sephadex", som består av dextran tverrbundet med glycerin-eter-broer, dannet ved behandling av dextran med epiklorhydrin. "Sephadex" og på lignende måte fremstilte produkter er i vann svellbare, men oppløselige gelkorn. De inneholder hydroksylgrupper og kan derved lett substitueres også med andre grupper, f.eks. slike inneholdende aminogruupper eller karboksylgrupper og egner seg derved godt for brodannelse med kovalente bindinger til det vitamin B_{12} -bindende stoff, f.eks. ventrikkelfaktor.

Et annet eksempel er reaktive polymerderivater dannet ved behandling av en copolymer av dextran og epiklorhydrin ("Sephadex") med halogencyaner, f.eks. bromcyan. Slike reaktive derivater kopler lett til ventrikkelfaktor.

Hensiktsmessig velges små partikler, således at det fåes en stor kontaktoverflate.

Til disse bæreparkikler bindes med kovalente bindinger det vitamin B_{12} -bindende stoff under så milde betingelser, at dets reaktivitet ikke vesentlig minskes. Gjennom denne kovalente binding kan det vitamin B_{12} -bindende stoff ikke løsne og vaskes bort fra partiklene. Ved den kjemiske binding mellom det vitamin B_{12} -bindende stoff og polymerpartiklene utnyttes reaktive grupper i disse som aminogruupper, hydroksylgrupper og karboksylgrupper, idet det slås

en bro med kovalent binding fra det vitamin B₁₂ bindende stoffet (P) til polymerpartiklen, f.eks. av typen:

P - NH . CS . NH . polymerpartikkel

P - NH . CO . NH . polymerpartikkel

P - N = N - polymerpartikkel

Broen mellom det vitamin B₁₂-bindende stoff, f.eks. ventrikkelfaktor, og den polymere behøver ikke være strukturbestemt og kan velges av meget forskjellig type, da den bare har til hensikt å hindre at det vitamin B₁₂-bindende stoff vaskes bort fra den uoppløselige polymer.

Ved analysen anvendes dessuten hensiktsmessig en oppløsning av vitamin B₁₂ med kjent konsentrasjon som standard.

Radioaktivitetsbestemmelsene kan skje ved vanlige metoder, f.eks. ved hjelp av scintillationsdetektorer.

Mengden partikler med vitamin B₁₂-bindende stoff velges bl.a. med tanke på det ved forsøket nødvendige følsomhetsnivå.

Mengden av ved reaksjonen tilsatt merket vitamin B₁₂ velges eksempelvis således at ca. 40-60% av merket vitamin B₁₂ bindes til det vitamin B₁₂-bindende stoff, da ingen konkurrerende og umeret vitamin B₁₂ finnes nærværende. Inkubasjonen kan gjøres ved forskjellige temperaturer, men gjøres fortrinnsvis ved temperaturer mellom +4 og 25°C. Det er ikke nødvendig at reaksjonen mellom vitamin B₁₂ og det vitamin B₁₂-bindende stoff går helt til avslutning. Inkubasjonen avbrytes etter f.eks. 2 timer, men kan også avbrytes senere, f.eks. etter 24 timer. Det er av betydning at reaksjonstiden og temperaturen velges likt for prøveoppløsninger og standardoppløsninger.

Ved at metoden er enkel, hurtig og praktisk og gir nøyaktige analyseresultater egner den seg godt for kvantitative bestemmelser også ved rutinebruk og tillater bestemmelse av også meget små mengder prøvestoff.

Metoden bestemmer fritt vitamin B₁₂. I eksempelvis serum er vitamin B₁₂ bundet til et protein. Ved bestemmelsen frigjøres derfor vitamin B₁₂ før bestemmelsen, f.eks. ved oppvarmning med saltsyre.

Også f.eks. overskudd av vitamin B₁₂ bindende protein i serum kan bestemmes ved hjelp av foreliggende metode ved at et ubehandlet serum utstyres med partikler med påkoplede vitamin B₁₂ bindende stoff og egnet mengde merket vitamin B₁₂, hvorefter, når

partiklene er fraskilt, radioaktiviteten måles på disse.

Oppfinnelsen skal i det følgende belyses nærmere med et detaljert utførelseseksempel vedrørende vitamin B₁₂-bestemmelse i blodserum.

Oppfinnelsen vedrører også et reagens, som er beregnet til å anvendes for bestemmelse av vitamin B₁₂, inneholdende partikler, hvortil ved hjelp av kovalente bindinger det er bundet et vitamin B₁₂ bindende emne, i tørket, eller frystetørket form.

Oppfinnelsen vedrører også en lukket ampulle, som inneholder det angitte reagens.

En tillempling av oppfinnelsen omfatter en prøvesats for bestemmelse av vitamin B₁₂, hvori inngår en eller flere til-lukkede ampuller inneholdende partikler av vannuoppløselige polymere, hvortil ved hjelp av kovalente bindinger det er bundet et vitamin B₁₂-bindende stoff, i tørket, f.eks. frystetørket form og en eller flere ampuller med vitamin B₁₂ merket med en radioaktiv isotop i tørket form, f.eks. frysetørket form.

Eksempel 1.

Bestemmelse av vitamin B₁₂ i blodserum.

A. Fremstilling av partikler med kovalent bundet vitamin B₁₂ bindende stoff.

Som utgangsmateriale anvendtes finkornede partikler av produktet "Sephadex" ("G 25, superfine") bestående av dextran tverrbundet med glycerineter-broer og som er substituert med p-nitro-fenoksy-hydroksypropyl-etergrupper til en substitusjons-grad av 200, μ mol nitrogrupper pr. g tørrstoff. 10 g av det sub-stituerte "Sephadex"-produkt innføres sammen med 50 ml vann i en tohalset rundkolbe, hvorefter temperaturen i blandingen holdes ved 35°C. Blandingens omrøres og samtidig tilføres 25 ml 5-n natronlut og 6 g natriumditionit for reduksjon av nitrogruppene til amino-grupper. Etter ca. 30 min. tilføres ytterligere 5 g natriumditionit. Reduksjonen avbrytes etter ca. 1 time, hvorefter det nøytraliseres med fortynnet saltsyre, det faste stoff frafiltreres og vaskes med destillert vann på et sugefilter.

10 g av det ovenfor dannede med p-amino-fenoksy hydroksy-propylgrupper substituerte "Sephadex"-produkt innføres i en reak-sjonskolbe sammen med 100 ml 10%-ig oppløsning av tiofosgen i karbontetraklorid. Kolben lukkes med en kork og blandingen rystes ca. 2 timer. Den dannede blanding avkjøles i isbad, hvorefter kolben åpnes og innholdet filtreres. Filterresiduet vaskes med 0,1 mol

natriumhydrogenkarbonatoppløsning, destillert vann og aceton. Den tørkes deretter i tørkeskap ved 60-80°C.

2 g av det i henhold til det ovennevnte med p-iso-tio-cyanato-fenoksy-hydroksypropylgrupper substituerte "Sephadex"-produkt svelles i 6 ml 0,1 molar natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Omrøreren startes, hvorefter 4 ml av samme natriumhydrogenkarbonatoppløsning inneholdende 95 mg ventrikkelfaktor tilføres dråpevis. Blandingen omrøres i 1 døgn ved 20°C, hvorefter det filtreres.

Filterresiduet vaskes med 0,5 molar natriumhydrogenkarbonatoppløsning for å fjerne ikke koplet stoff. Produktet kan tørkes forsiktig, f.eks. gjennom frysetørkning.

B. Bestemmelse.

Analysene utføres hensiktsmessig i glass eller plastrør med dimensjonene 50 x 10 mm. Som fortynningsvæske anvendes 0,05 M tris-puffer med pH 7,4 inneholdende 0,9% NaCl, 0,1% bovint serumalbumin og 0,01% natriumazid. Før analysen frigjøres vitamin B₁₂ i serum fra serumeggehvite ved oppvarming med saltsyre på følgende måte: 0,5 ml serum + 0,5 ml 0,9% NaCl-oppløsning blandet med 2 mikrogram NaCN pr. ml + 1 ml 0,1 n HCl plasseres i kokende vannbad i 20 min. hvorefter oppløsningen avkjøles med rennende kaldt vann.

Heretter utføres bestemmelsen eksemplvis i henhold til følgende:

1. 0,25 ml av serumoppløsningen behandlet i henhold til det ovenstående tilsettes to rør.
2. 0,25 ml av standardoppløsningen med forskjellige konsentrasjoner av vitamin B₁₂ f.eks. 1000, 400, 100, 40, 10 samt 0 pg/ml fortynnet i ovennevnte puffer med tilsetning av 2 mikrogram NaCl pr. ml tilsettes hvert annet rør.
3. 0,1 ml av oppløsningen inneholdende 1 µgram Co₅₈ merket vitamin B₁₂ pr. ml fortynnet i puffer med tilsetning av 2 µg NaCN/ml tilsettes samtlige rør.
4. 1 ml homogenisert suspensjon av polymerpartiklene (1 mg/ml) hvortil ventrikkelfaktor er bundet med kovalente bindinger tilsettes alle rør.
5. Inkubering i 3 timer ved værelsetemperatur eller 4°C, idet rørene langsomt roteres.
6. Partiklene sentrifugeres ned ved 3000 omdr./min. i 5 min.
7. Partiklene vaskes to ganger med 0,9% koksaltoppløsning. Etter siste frasuving av den øvre væske plasseres rørene i regnerør for

122457

måling av strålingen fra bundet merket vitamin B₁₂.

8. Antall "counts" på en viss tid fra standardrørene innprikkes på et "counts-dos" diagram på lin-log-skala, hvorfra deretter vitamin B₁₂-mengden i de ukjente prøver kan beregnes.

Alternativt kan etter sentrifugering i punkt 6 1 ml av den overliggende væske overføres i regnerør, hvorefter strålingen fra fritt merket vitamin B₁₂ kan måles. "Counts" fra standardrørene kan på samme måte innprikkes på et "count-dos" diagram i lin-log skala og deretter kan vitamin B₁₂-mengden i de ukjente prøver beregnes grafisk på samme måte som ovenfor.

Eksempel 2.

Bestemmelse av vitamin B₁₂ i vannholdig prøve.

- A. Fremstilling av partikler med kovalent bundet vitamin B₁₂-bindende stoff.

10 g copolymer av dextran og epiklorhydrin ("Lephodex G 25", superfine) svelles under omrøring i 3 min. med 200 ml BrCN-oppløsning, inneholdende 10 g BrCN pr. 100 ml vann. Heretter tilsettes 5 M NaOH vannoppløsning under omrøring til en pH-verdi på 10,7. Denne pH-verdi holdes konstant i 8 min. Temperaturen holdes ved 20°C under hele prosedyren. Deretter overføres blandingen på glassfilter og vaskes nøye med vann til nøytral reaksjon. De frafiltrerte partikler krympes ved vasking med aceton. Partiklene tørkes forsiktig og kan oppbevares ved f.eks. -20°C.

2 g av de i henhold til det ovenstående med brom-cyanaktiviserte partikler svelles i 6 ml 0,1 molar natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Omrøreren koples på, hvorefter 4 ml av samme natriumhydrogenkarbonat-oppløsning inneholdende 100 mg ventrikkelfaktor tilføres dråpevis. Blandingen omrøres i 1 døgn, hvorefter det filtreres. Filterresiduet vaskes med 0,5 molar natriumhydrogenkarbonatoppløsning for å fjerne ikke koblede stoffer. Produktet kan tørkes forsiktig, f.eks. gjennom frysetørkning.

- B. Bestemmelse.

Denne utføres på lignende måte som under eksempel 1 B.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåte for kvalitativ eller kvantitativ bestemmelse av vitamin B₁₂ i en vannholdig prøve, eksempelvis fra kroppsvæsker, k a r a k t e r i s e r t ved at man bringer partikler av i vann uoppløselige polymere hvortil det ved hjelp av kovalente bindinger er bundet et vitamin B₁₂ bindende stoff, fortrinnsvis ventrikkelfaktor, i berøring med prøven og med en viss mengde av vitamin B₁₂ merket med en radioaktiv isotop, fortrinnsvis av kobolt, hvoretter, etterat reaksjonen mellom vitamin B₁₂ og det på partiklene festede vitamin B₁₂ bindende stoff har funnet sted, partiklene separeres fra prøvevæsken og radioaktiviteten bestemmes i partikkelmaterialet og/eller i væsken.

2. Reagens til bruk ved utførelsen av fremgangsmåten ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t ved at det består av partikler av vannuoppløselige polymere, hvortil det ved hjelp av kovalente bindinger er bundet et vitamin B₁₂-bindende stoff og at det foreligger i tørket, f.eks. frysetørket form.

Anførte publikasjoner:

Norsk patent nr. 107.884

Analytical Chemistry, Vol. 35, No. 12, Nov. 1963 pp 1950-53