

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 762790 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 762790

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07G

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.09.1976**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.09.1976**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.04.1977**

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

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

02.10.1975 DE 2543994

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Behringwerke Aktiengesellschaft, 3550 Marburg, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Bohn, Hans, BRD, SAKSA, (DE)

2 • Weinmann, Ernst, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Raskaudelle ominaisen B1-glykoproteiinin johdannaisia, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niitä sisältävät valmisteet

Derivat av för havandeskap specifikt B1-glykoprotein, förfarande för deras framställning och desamma innehållande preparat

Menetelmä raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisten valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av derivat av för havandeskap specifikt β_1 -glykoprotein

Keksinnön kohteena on menetelmä raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisten valmistamiseksi. Näitä johdannaisia voidaan käyttää rokotteina raskauden ehkäisemiseen.

FI-patentti ^{53312 (C95 700)} ~~53312 (C95 700)~~ 2662/72 on kuvattu raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini ja sen eristämismenetelmä. Lähtöaineina eristämisessä käytetään ihmisen elimiä tai kehon nesteitä. Immunoitaessa selkärangaisia ihmisestä peräisin olevalla raskaudelle ominaisella β_1 -glykoproteiinilla, löytyy immunoitujen eläinten plasmas-
ta raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin vastaista vasta-ainetta, joka pystyy reagoimaan lähtöantigeenin kanssa tyypillisellä tavalla.

Raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia (SP 1) voidaan luonnehtia seuraavilla parametreilla:

a) elektroforeettinen liikkuvuus agargeelissä on ihmisplasmaproteiinien β_1 -globuliinialueella,

- b) ultrasentrifugissa sedimentoitumisvakio on $4,6 \pm 0,58$,
- c) geelisuodatuksella määritetty molekyylipaino on $100\ 000 \pm 15\ 000$,
- d) ekstinktiokerroin $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 11,6 \pm 0,5$ (278 nm 1/15-molaarinen fosfaattipuskuri, pH 7,0),
- e) hiilihydraattipitoisuus on $28,05 \pm 1,55$.

FI-patenttihakemuksessa 2649/74 on esitettyjen kokeiden perusteella, joiden mukaan raskaudelle ominaisten β_1 -glykoproteiinien vasta-aineilla on mahdollista saada aikaan raskauden esto tai vastaavasti keskenmeno kädellisillä, ehdotettu raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin käyttöä kädellisten aktiiviseen immunointiin tai passiivisesti käytettyjen vasta-aineiden avulla raskauden ehkäisyyn tai vastavasti aiheuttamaan keskenmeno. Kun passiivisella vasta-aineiden antamisella saadaan tyydyttäviä tuloksia, on aktiivisessa immunoinnissa toivomisen varaa siinä suhteessa, että homologista raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia käytettäessä muodostuu usein vain vähäisiä määriä vasta-aineita, jotka eivät riitä varmaan raskaudenehkäisyyn. Ehdotetun immunoivan aineen vaikutusteho ei siten ole täysin tyydyttävä käytettäessä homologista, so. samasta lajista peräisin olevaa raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia immunointiin.

On tunnettua, että raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia vastaavaa glykoproteiinia voidaan eristää myös apinoista. Annettaessa tätä ihmiselle voitiin ihmisen veressä odottaa muodostuvan riittävässä määrin vasta-aineita, jotka reagoivat ihmisen raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin kanssa. Lähtöainetta raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin valmistamiseen apinoista ei kuitenkaan ole saatavana kuin rajoitetusti. Sensijaan, kuten FI-patenttihakemuksessa ⁵³¹⁷2662/72 esitetään, raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia voidaan tyydyttävässä määrin valmistaa ihmisen syväjäädetyistä istukoista tai raskaana olevien naisten seerumista.

Siten ongelmana oli menetelmän kehittäminen raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin, joka edullisesti oli eristetty ihmisistä, modifioimiseksi siten, että ihmiskeho pitää tätä modifioitua β_1 -glykoproteiinia keholle vieraana, ja tämä siten soveltuu glykoproteiinin vastaisten vasta-aineiden muodostamiseen.

Keksinnön mukaan ongelma on ratkaistu valmistamalla uusia raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisia, joita voidaan käyttää aineosina immunoivissa, raskauden ehkäisyyn ja keskenmenojen aikaansaamiseen tarkoitetuissa valmisteissa.

Yllättäen keksittiin, että monilla eri kemiallisilla menetelmillä suoritettut raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin muutokset johtavat myös näin saatujen johdannaisten immunologisen suhtautumisen muuttumiseen siten, että ne pystyvät synnyttämään vasta-aineita homologisessa systeemissä.

Keksinnön kohteena ovat siten raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaiset, jotka on valmistettu reaktiossa yhdisteen kanssa, jolla proteiini voidaan modifioida.

Tämänkaltaisissa reaktioissa on kaksi pääperiaatetta. Ne johtavat kumpikin proteiinin alkuperäisen rakenteen muuttumiseen ja siten proteiinin denaturoitumiseen:

1. Menetelmät raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin kemialliseksi muuttamiseksi reagenssien avulla, jotka johtavat siinä olevien kemiallisten ryhmien muuttumiseen.

2. Menetelmät, joilla saadaan aikaan raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin kemiallinen muutos viemällä molekyyliin uusia ryhmiä, tai joilla molekyyli saadaan liittymään pieni- tai suurimolekyyliin.

Mainittuihin menetelmiin on luettava sellaiset, joissa muutetaan proteiineissa yksi tai useampi seuraavista ryhmistä: amino, guanidyyli, imidatsoli, indoli, alifaattinen hydroksyyli, amidi, tioetteri, disulfidi, sulfhydryyli, fenoli ja karboksyyli. Lukuisia tällaisia reaktioita tunnetaan kirjallisuudesta, ja niissä käytetään pääasiassa seuraavia reagensseja esimerkein mainituissa olosuhteissa.

1.1. Hapetus jodosobentsoaatilla, porfyriidiinillä, ferrosyanidilla tai jodilla, jolloin hapetusainetta tavallisesti käytetään 0,001-0,01-molaarisena pH:n ollessa 7, lämpötilan 0-25°C ja reaktioajan 5-30 minuuttia. Hapetus jodilla suoritetaan käyttäen mukana jodidia suurena pitoisuutena ja pH:ssa 1-7. Hapetus voidaan suorittaa myös vetyperoksidilla. Edulliset olosuhteet ovat tällöin: hapetusaineen väkevyys noin 0,005-m, pH noin 6,6, lämpötila noin 25°C ja reaktioaika 0,5-40 tuntia.

1.2. Pelkistys kysteiinillä, tioglykolihapolla, tioglykolilla, syanidilla tai sulfidilla edullisesti seuraavissa olosuhteissa: pelkistysaineen väkevyys 0,001-0,1-m, pH 7-8, lämpötila noin 25°C ja reaktioaika 0,5-4 tuntia.

Reaktio-olosuhteiden yksityiskohdat löytyvät kirjallisuudesta. Niitä ovat esittäneet esimerkiksi H.S.Olcott ja H.Fraenkel-Conrat, Chem. Rev. 41, s. 151 (1947). Lisäksi osa reagensseista ja menetelmäolosuhteista löytyy viitteessä: H.E. Schultze ja J. F. Heremans, Molecular Biology of Human Proteins (1966), s. 40-41 sekä siinä sivulta 58 alkavissa kirjallisuusviitteissä.

Liittämällä raskaudelle ominaiseen β_1 -glykoproteiiniin uusia ryhmiä valmistetaan johdannaisia, joita immunologiselta näkökannalta yleensä nimitetään hapteeni-yhdisteiksi. Hyväksytyn määritelmän mukaan "hapteeni" on proteiini-vapaa aine, joka voi reagoida erityisen, konfiguraationsa vastaisen vasta-aineen kanssa, mutta joka ei kuitenkaan pysty aiheuttamaan havaittavissa määrin vasta-

ainemuodostusta. Hapteenilla saadaan immuunivaste vain kantajaproteiinin yhteydessä. Useimmat haptteenit ovat pienimolekyyllisiä yhdisteitä, joiden molekyylipaino on alle 1000. Kuitenkin myös makromolekyylijä, kuten pneumokokkipolysakkarideja pidetään haptteeneina. Hapteeni-proteiiniyhdiste johtaa tavallisesti kahden eri tyyppisen vasta-aineen muodostumiseen, jolloin syntyy erikoisvaikutus haptteeniryhmittymää vastaan ja proteiinikantajaa vastaan. Raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin ollessa kysymyksessä tämän haptteeniyhdisteet synnyttävät myös kantajaproteiinia vastaan vasta-aineita homologisessa systeemissä.

*kurkkaan
pinttyis-
kohtais-
sa tahon
akamuk-
seen*

Keksinnössä käytettävänä haptteeneina tulevat kysymykseen kirjallisuudessa tällaisiksi kuvatut kemialliset ryhmät ja yhdisteet. Näitä ovat erityisesti aromaattiset rengassysteemit, steroidit, peptidit, puriinit, pyrimidiinit, penisilliini ja sen johdannaiset, mutta myös yksittäiset molekyylit, kuten jodi sekä raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin kantaja-aineeseen sitoutuvan aineen tässä esitetyn laajennetun määritelmän mukaisesti myös suurimolekyylliset peptidi-, proteiini- tai hiilihydraattiyhdisteet, jotka itsekin ovat antigeenisia.

Menetelmät raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisten valmistamiseksi mainitulla perusperiaatteella (2.) haptteeneja käyttäen ovat tunnettuja yleisesti käytettyinä reaktioina proteiineja modifioivien kemiallisten ryhmien ja haptteenien viemiseksi proteiineihin, jolloin näiden kemiallisten aineiden ja proteiinien välille muodostuu kovalenttinen sidos. Tällöin tulevat kysymykseen varsinkin reaktiot, joita on kuvattu proteiinimolekyylien yksittäisten ryhmien modifioimiseen. Myös nämä reaktiot on esitetty Olcott'in ja Fraenkel-Conrat'in sekä Schultze-Heremans'in artikkeleissa. Esimerkkejä tällaisista menetelmistä ovat:

- 2.1. Alkylointi jodiasetaatilla, jodiasetamidilla (0,05-0,1-m, pH 7-8, 0-25°, 0,5-2 tuntia) tai dinitrofluoribentseenillä (0,17-m, pH 7-8, 25°, 2 tuntia).
- 2.2. Asylointi keteenillä (pH 5-8, 0-25°, 5-30 min), etikkahappoanhydridillä (pH 7-8, 0°, 30 min), hiilisuboksidilla (pH 5-8, 0,25°, 5-30 min), atsideilla, bentsoyyli-, karbobentsoksi- tai bentseenisulfonyylikloridilla (pH 7-9, 0-25°, 0,5-2 tuntia) typpihapokkeella (1-m, pH 4, 30 min), jodilla (pH 5-11, -5°-25°, 0,5-3 tuntia, reaktio eroaa yllä kuvatusta hapetuksesta siten, että käytetään pienempiä jodimääriä ja alhaisempaa jodidipitoisuutta), formaldehydillä (1-2-m, 25°, pH 7-8:ssa, 1 tunti, pH 11:ssa 10 min), epoksidoilla (1-2-m, pH 5-6:ssa 1-4 vrk), sinappikaasulla (pH 5-6, 25°, 0,5-4 tuntia),

hapolla alkoholissa (mineraalihapolla abs. alkoholissa, 0,01-0,1-m, 0-25°, 1-2 vrk), metyyliidiatsosaatilla, diatsosaetamidilla (pH 5 (esteri) pH 6 (amidi), 0°), p-kloorimerkuribentsoaatilla (10⁻⁵-10⁻²-m, pH 7, 25°, 5-30 min) diatsoniumyhdisteillä (pH 7-9, 25°, 30 min) tai o-metyyli-isovirtsa-aineella (0,5-m, pH 10,5, 0°, 3 vrk).

Menetelmää kuvataan seuraavassa lähemmin joidenkin edellä mainittujen ryhmien suhteen:

a) Jodaus (kirjallisuus: Kabat and Mayer's Experimental Immunochimistry sec. edition 1961, 816-818)

Jodi saatetaan reagoimaan jodinaattina proteiinin tyrosiinitähteiden kanssa, jolloin tyrosiinimolekyyliin liittyy yksi tai kaksi jodiatomia ja syntyy jodiproteiini. Samalla tavalla voidaan valmistaa raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin jodiyhdiste.

b) Diatsotointi ja liittämisreaktio (kirjallisuus: Kabat and Mayer's Experimental Immunochimistry, sec. edition 1961, 798-799).

Tässä menetelmässä aromaattisen aminoryhmän sisältävä yhdiste, esimerkiksi arsaniilihappo tai sulfaniilihappo, diatsotoidaan ja diatsoniumyhdiste naatetaan sitten reagoimaan proteiinin kanssa. Tällöin etupäässä proteiinin tyrosiiniryhmät, mutta myös histidiini- ja lysiinitähteet muodostavat kovalenttisia sidoksia aromaattisen komponentin kanssa. Tällä menetelmällä voidaan valmistaa raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin diatsosaarsaniilihappo- tai diatsobentseenisulfonihappo-yhdiste.

c) Reaktio vinyylisulfonihappoyhdisteen kanssa vastaa sellaisten reaktiiviväriaineiden selluloosan tai villan kanssa tapahtuvaa reaktiota, jotka sisältävät reaktiivikomponenttina vinyylisulfoniryhmän). Alifaattiset tai aromaattiset vinyylisulfonijohdannaiset ja β -hydroksietyylisulfonion rikkihappopuoliesterit voidaan saattaa reagoimaan proteiinin aminoryhmien ja/tai hydroksyyli-ryhmien kanssa. Tällä tavoin voidaan saada esimerkiksi raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin hapteeniyhdiste 1-aminobentseeni-4 β -hydroksietyylisulfonirikkihappoesterin kanssa.

d) Reaktio isosyanaatti- ja isotiosyanaatti-yhdisteiden kanssa (kirjallisuus: Kabat and Mayer's Experimental Immunochimistry, sec. edition 1961, 809-811). Tässä reaktiossa, jossa proteiinin vapaat aminoryhmät reagoivat, saadaan analogisesti proteiinkemian tunnettujen menetelmien kanssa vastaavan kemiallisen ryhmittymän omaavat hapteenit reagoimaan myös raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin kanssa.

e) Dinitrofenylointi (kirjallisuus: Carsten, M.E; Eisen, H.N., J.Am.Chem. Soc. 77, 1273 (1955). Tavallisesti dinitrobentseenisulfonaattia tai dinitrofluoribentseeniä käyttäen suoritettussa reaktiossa proteiinin vapaat aminoryhmät reagoivat ja muodostuu dinitrofenyylijohdannaisia. Tällä tavoin saadaan

dinitrofenyloitua raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia.

f) Reaktio seka-anhydridien kanssa (kirjallisuus: Kabat and Mayer 's, Experimental Immunochemistry, sec. edition 1961, 813-815). Tämä menetelmä sopii, liitettäessä monia erilaisia hapteneja, jotka ensin on muutettava asyloimalla seka-anhydridiksi, proteiinin aminoryhmiin. Lisäksi voidaan proteiinien suorassa reaktiossa anhydridien kanssa valmistaa tunnetulla tavalla yleisen kaavan $-R-CO-NH-CH_2-$ proteiini mukaisia happoamideja, jossa kaavassa R on mielivaltainen hapteeni. Tämän reaktion avulla voidaan valmistaa esimerkiksi raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini-hapteeni-yhdiste, jossa hapteenina R on bentisyli.

g) Reaktio karbodi-imidien kanssa (kirjallisuus: Makino, T. et al., Contraception 8 (2), 133 (1973). Yleisen kaavan $R-N=C=N-R$ (R= mielivaltainen orgaaninen tähde) mukaiset karbodi-imidit soveltuvat karboksyyli-ryhmiä sisältävien hapteenien liittämiseen proteiinien aminoryhmiin. Myös tässä saadaan reaktiotuotteeksi yhdiste $R-CO-NH-$ proteiini, jossa R on mielivaltainen hapteeni, joka sisältää karboksyyli-ryhmän. Tämän reaktion avulla saadaan esimerkiksi raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin hapteeniyhdiste, jonka hapteenina on sykloheksaanikarboksyylihappo.

Raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin immunologista suhtautumista voidaan keksinnön mukaan muuttaa myös liittämällä glykoproteiini peptidiin tai proteiiniin. Liittäminen voidaan suorittaa joko kovalenttisesti tai kompleksinmuodostuksella. Reaktiokomponentteina voidaan tässä käyttää peptidejä, esimerkiksi sellaisia, joilla on oma biologinen funktio, esimerkiksi decapeptidejä, kuten LRF (Luteinisoivan hormonin releasing factor). LRF voidaan liittää raskaudelle ominaiseen β_1 -glykoproteiiniin esimerkiksi siten kuin T. Makino et al., Contraception 8, 2(1973), s. 133, ovat kuvanneet tämän liittämistä albumiiniin. Perustana olevan reaktion lähtökohtana on karboksyyli-ryhmien karbodi-imidiaktiivointi karbodi-imidiyhdisteillä.

Eräänä toisena mahdollisuutena raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin immunologisen suhtautumisen muuttamiseksi on proteiinin liittäminen toiseen proteiiniyhdisteeseen tavalla, joka tunnetaan esimerkiksi entsyymien liittämistä proteiineihin, jolloin raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini voi reaktiossa korvata jommankumman reaktion osanottajan. Kahden proteiinin liittämiseen toisiinsa tunnetaan monia menetelmiä. Niissä käytetään aktiivisten aineiden, kuten esimerkiksi karbodi-imidien, syanuurikloridin, p,p-difluori-m,m-dinitrofenyylisulfonin tai glutaaridialdehydin yksittäisiä ryhmiä. Raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini voidaan esimerkiksi käyttää apuna glutaaridialdehydiä liittää analogisesti gammaglobuliinin peroksidaasiin erilaisiin proteiineihin liittämisen kanssa (S. Avrameas: Immunochemistry 6, 1969, 43-52), keksinnön mukaisessa menetelmässä liitetään immunoivak-

si aineeksi tarkoitettu raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini proteiiniin, joka on itsessään vaikuttava rokotekomponenttina, kuten esim. tetanustoksoidiin.

Edellä esitetyllä on tahdottu osoittaa, että kaikki kirjallisuudessa kuvatut proteiinien johdannaisten muodostamistavat soveltuvat keksinnön mukaisten tuotteiden valmistukseen.

Keksinnön kohteena ovat yleisesti ottaen menetelmät raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisten valmistamiseksi, ja tälle menetelmälle on tunnusomaista, että raskaudelle ominaiselle β_1 -glykoproteiinille suoritetaan sellainen hapetus-, pelkistys-, alkylointi- tai asylointireaktio, jota käytetään proteiinien ja hapterien tai proteiinien välisten kovalenttisten sidosten aikaansaamiseen.

Saadut reaktiotuotteet muutetaan tunnetuilla menetelmillä parenteraaliin injektioon sopivaan muotoon, jolloin niihin mahdollisesti lisätään, kuten rokoteaineisiin yleensä, stabiloivia lisäaineita ja epäorgaanisia tai orgaanisia immuunijohdantteja, jotta niitä tässä muodossa voitaisiin käyttää aktiivisesti immunoivina aineina syntyvyssäännöstelyssä. Stabiloivina lisäaineina tulevat kysymykseen sellaiset aineet, jotka parantavat valmisteiden säilyvyyttä, varsinkin pienimolekyyliset hiilihydraatit tai valkuaisaineet tai näiden johdannaiset, kuten hajotettu ja jälleen verkkoutettu kollageeni, esimerkiksi tavaramerkillä Haemaccel[®] markkinoitu gelatiinituote, ja mahdollisina muina lisäaineina voidaan käyttää aminohapposuoloja, esim. natriumglutaminaattia. Tällaisten lisäaineiden määrä on tarkoituksemukaisesti 0,5-5 %, joskus jopa 10 %:iin asti. Immunoiva valmiste voi käyttöönsä ottaa joko nestemäinen tai kuiva, edullisesti lyofilisoitu. Viimeksi mainittu on ennen käyttöä liuotettava veteen tai fysiologisesti hyväksyttävään väliaineeseen.

Seuraavat kokeet, jotka on suoritettu esimerkin 1 tai 2 mukaan valmistetuilla tuotteilla, osoittavat keksinnön mukaisilla raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisilla apinojen aktiivisessa immunoinnissa saadut hyvät tulokset.

Kokeen kuvaus:

Sukukypsät naarasapinat (Cynomolgus) immunoitiin 6 viikon aikana antamalla niille vuorotellen suonensisäisesti ja ihonalaisesti kaikkiaan 3 mg raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaista (ks. taulukko 1) isotonisessa keittosuolaliuoksessa, jossa adjuvanttina oli hienojakoista alumiinihydroksidia. Kaikilla eläimillä kehittyi raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin vastaista vasta-ainetta, joka osoitettiin kvalitatiivisesti geelidiffusiokokeessa raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin avulla ja määritettiin kvantitatiivisesti säteittäisellä immuunidiffusiolla. Keskimääräiseksi titteriksi saatiin tällöin 0,09 mg vasta-ainetta/ml. Immunoinnin jälkeen naaraseläimet saatettiin suunnilleen ovulaation ajankohdaksi 3 vuorokauden ajaksi siitoskykyisten uroseläinten kanssa parittelumaan ja siten tutkittiin parittelun tulos. Puolet eläimistä sai kuukausittain parittelujen

välissä tai vastaavasti raskauden aikana tehosteinjektioita (0,4 mg proteiinia). Raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia vastaan immunoitujen naarasapinoiden lisääntymiskyky oli verrattuna käsittelemättömien kontrollieläinten lisääntymiskykyyn suuresti estynyt. Immunoiduilla eläimillä saadut tulokset nähdään taulukossa 1. Joillakin apinoilla ei raskaus alkanut useammakaan parittelun jälkeen, toiset tulivat raskaiksi vasta kolmannen tai neljännen parittelun jälkeen. Niillä apinoilla, jotka tulivat raskaiksi ensimmäisen tai jonkin seuraavan parittelun tuloksena, tapahtui keskenmeno lähes kaikilla raskauden ensimmäisenä tai toisena kolmanneksena. Vain yhdellä ensimmäisessä parittelussa raskaaksi tulleista apinoista oli normaali raskaus ja normaali synnytys. Eräällä toisella apinalla oli kolmannen parittelun jälkeen normaali raskaus.

Taulukko 1

Antigeeni	Apina	Vasta-aine- titteri mg/ml	Parittelu ja hedelmöitty- mistulos	+ kyllä - nein	A = keskenmeno () = raskausaika vuorok.
Esimerkin 2 mukainen raskau- delle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannainen	2	0,10	-	-	+ A (35)
	3	0,05	-	-	-
	4	0,09	-	-	-
	5	0,05	+A (40-135)	-	-
	6	0,15	-	+A (34-45)	+A (29-36)
	7	0,29	+		
	10	0,05	+A (110)		
Esimerkin 1 mukainen raskau- delle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannainen	12	0,09	+A (104)		
	13	0,05	-	-	
	14	0,05	+A (20-34)	+A (21-29)	
	15	0,05	+A (92)		
	16	0,05	-	-	+
					synnytys
					synnytys

Samankaltaisia tuloksia saadaan, kun raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini hapetetaan jodilla, pelkistetään tioglykolihapolla, alkyloidaan jodiasetamidilla, asyloidaan toisella diatsoniumyhdisteellä, liitetään toiseen hapteeniin tai liitetään proteiiniin, kuten esim. tetanus-toksoidiin.

Vertailuna käytetyt kontrollit:

39 apinasta oli viimeistään kolmannen parittelun jälkeen 31, so. 80 % raskaina. Näistä vain yksi raskaus päättyi itsestään keskenmenoon, kaikki muut sujivat normaalisti.

Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin keksintöä.

Esimerkki 1

Raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin modifiointi diatsotoidulla sulfaniilihapolla

a) Diatsoniumsuolan valmistus

1 g sulfaniilihapoa liuotetaan huoneen lämpötilassa 100 ml:aan 0,1-n HCl:ää, liuos jäädytetään jäävedessä sekoittaen 0°C:seen. Tällöin sulfaniilihapo saostuu suolana. Suspensioon tiputetaan sitten hitaasti (1 tunnin kuluessa) ja sekoittaen 50 ml kylmää 1-%:ista natriumnitriitin vesiliuosta. Reaktiion päättymisen todetaan kaliumjodidi-tärkkelyspaperin siniseksi värjäytymisestä.

b) Hapteeni-yhdisteen valmistus

Raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin ja diatsotoidun sulfaniilihapon yhteen liittäminen tapahtuu heikosti alkalisisessa pH:ssa. Tällöin 100 mg raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia liuotetaan 10 ml:aan 0,2-molaarista natriumfosfaattipuskuria, jonka pH on 8,2, ja liuos jäädytetään 4°C:seen. Sitten lisätään 0,57 ml diatsoniumsuolaliuosta (raskaudelle ominaisen β_1 -proteiinin ja diatsotoidun sulfaniilihapon moolisuhde reaktioseoksessa on tässä tapauksessa 1:20) ja sekoitetaan 4 tuntia 4°C:ssa. pH-arvoa, joka ei saa laskea alle 8,0, säädetään tällöin lisäämällä 0,2-n NaOH:ta. Tämän jälkeen liuoksen annetaan seistä 15 tuntia 4°C:ssa. Modifioitu proteiini dialysoidaan sitten useamman vuorokauden ajan vettä vastaan ja lopuksi lyofilisoidaan.

Raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin reaktio diatsotoidun sulfaniilihapon kanssa saa aikaan proteiinin muuttumisen oranssinväriseksi. Lisäksi happamien ryhmien liittäminen aiheuttaa elektroforeettisen liikkuvuuden muuttumisen. Elektroforeesissa agarissa tai polyakryyliamidi-(PAA)-geelissä modifioitu proteiini vaelttaa anodille nopeammin kuin alkuperäinen raskaudelle ominainen β_1 -glykoproteiini.

Esimerkki 2

Hapteeniyhdisteen valmistaminen 1-aminobentseeni-4 β -hydroksietyyylisulfonirikkihappoesterin kanssa

Lähtöainena on 1-aminobentseeni-4 β -hydroksietyyylisulfonirikkihappoesteri,

josta alkalisella pH-alueella (pH 9-10) lohkeaa rikkihappoa, jolloin siitä saadaan reaktiokykyistä aromaattista vinyylisulfoniyhdistettä ns. "parabaasia", joka reagoi proteiinin amino- tai hydroksyyli-ryhmien kanssa.

100 mg raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia liuotetaan 10 ml:aan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:n 2,5-%:ista liuosta (pH 9,25). Tähän lisätään sekoittaen huoneen lämpötilassa 3,1 ml 1-%:ista "parabaasi"-esterin vesiliuosta (raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin ja "parabaasin" moolisuhde = 1:100). Sekoitetaan 4 tuntia huoneen lämpötilassa pitäen pH:n koko ajan 9,2:ssa lisäämällä 0,1-n NaOH:ta. Sitten seos saa seistä 15 tuntia 4°C :ssa, se dialysoidaan perusteellisesti vettä vastaan ja modifioitu proteiini lyofilisoidaan.

Esimerkki 3

Raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin liittäminen tetanus-toksoidiin

19 mg raskaudelle ominaista β_1 -glykoproteiinia ja 54 mg tetanus-toksoidia (formaliinikäsitteltyä tetanus-toksiinia) liuotetaan 5,4 ml:aan vettä, liuoksen pH säädetään 5,0:aan lisäämällä 0,1-n HCl:ää, sitten lisätään sekoittaen 6,3 mg N-etyyli-N'-(3-dimetyyliaminopropyyli)-karbodi-imidi-HCl:ää. Seos saa seistä noin 20°C :ssa 3 tuntia, sitten sitä sekoitetaan 15 tuntia $+4^\circ\text{C}$:ssa, se neutraloidaan ja dialysoidaan isotonista keittosuolaliuosta vastaan.

Patenttivaatimus:

Menetelmä raskaudelle ominaisen β_1 -glykoproteiinin johdannaisten valmistamiseksi, tunnettu siitä, että glykoproteiini, jolla on seuraavat parametrit:

- a) elektroforeettinen liikkuvuus agargeelissä on ihmisplasma-proteiinien β_1 -globuliinialueella,
 - b) ultrasentrifugissa sedimentoitumisvakio on $4,6 \pm 0,5S$,
 - c) geelisuodatuksella määritetty molekyylipaino on $100\,000 \pm 15\,000$,
 - d) ekstinktiokerroin $E_{1\text{ cm}}^1\% = 11,6 \pm 0,5$ (278 nm, 1/15-molaarinen fosfaattipuskuri, pH 7,0),
 - e) hiilihydraattipitoisuus on $28,05 \pm 1,55$,
- yhdistetään hapteen tai proteiinin kanssa kovalenttisella sidoksella.

Patentkrav:

Förfarande för framställning av derivat av havandeskapsspecifikt β_1 -glykoprotein derivat, k ä n n e t e c k n a t därav, att glykoproteinet som har följande parametrar:

- a) elektroforetisk mobilitet i agargel i humanplasma-proteinernas β_1 -glubulinområde,
 - b) en sedimentationskonstant i ultracentrifug av $4,6 \pm 0,5S$,
 - c) en genom gelfiltrering bestämd molekyylvikt av $100\,000 \pm 15\,000$,
 - d) en extinktionskoefficient av $E_{1\text{ cm}}^1\% = 11,6 \pm 0,5$ (278 nm; 1/15-molar fosfatbuffert, pH 7,0),
 - e) en kolhydrathalt av $28,05 \pm 1,55$,
- förenas med ett haptent eller en protein.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

2649/74 (67 G 7100), 1383/74, 1371/77

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

Suomi - Finland P 54997 (67 G 7100)

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

79-05-17 Hely Commi

Allekirjoitus